HAL
open science

Développement de méthodes de diagnostic rapide d'erreurs innées du métabolisme associées à des troubles neurologiques

Aurélien Lo

To cite this version:

Aurélien Lo. Développement de méthodes de diagnostic rapide d'erreurs innées du métabolisme associées à des troubles neurologiques. Chimie analytique. Université Paris Saclay (COmUE), 2017. Français. NNT : 2017SACLS504 . tel-01779568

HAL Id: tel-01779568

https://theses.hal.science/tel-01779568v1

Submitted on 26 Apr 2018

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.

NNT : 2017SACLS504

Développement de méthodes de diagnostic rapide d'erreurs innées du métabolisme associées à des troubles neurologiques

Thèse de doctorat de l'Université Paris-Saclay
préparée à l'université Paris Sud

École doctorale n°571 Sciences chimiques : molécules, matériaux, instrumentation et biosystèmes (2MIB)
Spécialité de doctorat : Chimie

Thèse présentée et soutenue à Orsay, le 14/12/2017, par

LO Aurélien

Composition du Jury :

DELAUNAY Nathalie Chargée de recherche, ESPCI Paris (LSABM)	Rapporteur
FRANCOIS Yannis Maitre de conférences, Université de Strasbourg (LSMIS)	Rapporteur
CHAMINADE Pierre Professeur, Université Paris Sud (Lip(Sys)^2)	Examinateur
COUDERC Rémy Docteur, Hôpital Armand-Trousseau (Service de biochimie)	Examinateur
HERRENKNECHT Christine Professeur, Université de Nantes (UFR Pharmacie)	Examinateur
MAITRE Philippe Directeur de recherche, Université Paris Sud (LCP)	Président du jury
MOUSSA Fathi Professeur, Université Paris-Sud (Lip(Sys)^2)	Directeur de thèse
BONOSE Myriam Maitre de conférences, Université Paris-Sud (Lip(Sys)^2)	Co-Directrice de thèse

Thèse de doctorat

Table des matières

Remerciements 7

Liste des publications et des communications 9

Introduction générale 10

PARTIE 1 : Rappel bibliographique de quelques notions concernant la dopamine, la sérotonine, les ptérines et les folates dans les fluides biologiques. 13

Chapitre I : Fonctions biologiques et métabolisme 14

I.1. Dopamine 14

I.1.1. Structures et fonctions biologiques de la dopamine et de ses métabolites 14

I.1.2. Métabolisme de la dopamine 15

I.2. Sérotonine 17

I.2.1. Structure et fonctions biologiques de la sérotonine et de ses métabolites 17

I.2.2. Métabolisme de la sérotonine 17

I.3. Tétrahydrobioptérine (BH4) 19

I.3.1. Structure et fonctions biologiques de la tétrahydrobioptérine 19

I.3.2. Métabolisme de la tétrahydrobioptérine 19

I.3.3. État des connaissances sur l'oxydation de la tétrahydrobioptérine 22

I.3.3.1. Oxydation à l'air libre 22

I.3.3.2. Oxydation chimique de Fukushima 23

I.3.3.3. Oxydation électrochimique 23

I.4. Folates 24

I.4.1. Structure et fonctions biologiques des folates 24

I.4.2. Métabolisme des folates 25

I.5. Conclusion 26

Chapitre II : Symptômes, diagnostic et traitements actuels 27

II.1. Amines biogènes 27

II.1.1. Symptômes et diagnostic 28

II.1.1.1. Déficit en phénylalanine hydroxylase (PAH) 28

II.1.1.2. Déficit en tyrosine hydroxylase (TH) 28

II.1.1.3. Déficit en tryptophane hydroxylase (TPH) 28

II.1.1.4. Déficit en acide aminé décarboxylase (AADC) 28

II.1.1.5. Déficit en pyridoxamine phosphate oxydase (PNPO) 29

II.1.1.6. Déficit en dopamine bêta-hydroxylase (DBH) 29

II.1.1.7. Déficit en monoamine oxydase (MAO) 29

II.1.1.8. Déficit en catéchol-O-méthyl transférase (COMT) 30
II.1.1.9. Troubles des transporteurs de la dopamine (DTDS) 30
II.1.2. Traitements actuels 30
II.1.2.1. Traiter la phénylcétonurie (PCU) 30
II.1.2.2. Médicaments dopaminergiques 31
II.1.2.3. Médicaments sérotoninergiques 33
II.2. Ptérines 34
II.2.1. Symptômes et diagnostic 34
II.2.1.1 Déficit en guanosine triphosphate cyclohydroxylase (GTP-CH) 34
II.2.1.2. Déficit en pyruvoyl tétrahydroptérine synthase (PTPS) 35
II.2.1.3. Déficit en sépiaptérine réductase (SR) 35
II.2.1.4. Déficit en ptérine carbinolamine déhydratase (PCD) 35
II.2.1.5. Déficit en dihydroptéridine réductase (DHPR) 36
II.2.2. Traitements actuels 36
II.3. Déficit cérébral en folates 36
II.3.1. Symptômes et diagnostic 37
II.3.1.1. Déficit en récepteur au folate (FRα) 37
II.3.1.2. Déficit en 5,10-Méthylènetétrahydrofolate (MTHFR) 37
II.3.1.3. Déficit en dihydrofolate réductase (DHFR) 37
II.3.1.4. Déficit en acide aminé décarboxylase (AADC) et en dihydroptéridine réductase (DHPR) 38
II.3.2. Traitements actuels 38
II.4. Conclusion 38

Chapitre III : Méthodes actuelles de quantification des amines biogènes, des ptérines et des folates... 40
III.1. Méthodes actuelles de dosage des amines biogènes par chromatographie 40
III.1.1. Chromatographie en phase liquide avec détection électrochimique 40
III.1.2. Chromatographie en phase liquide avec détection par spectrométrie de masse 41
III.1.3. Chromatographie en phase gazeuse avec détection par spectrométrie de masse 41
III.2. Méthodes actuelles de dosage des ptérines 42
Abstract 43
Introduction 44
Earlier studies on BH4 oxidation 47
HPLC–FD methods 48
HPLC-ECD-FD methods 50
HPLC-MS methods 51
Parameters affecting the CSF concentration of pterins 52
Conclusion 52

References 54

III.3. Méthodes actuelles de dosage du 5-MTHF par chromatographie en phase liquide..... 57

III.3.1. Détection par spectroscopie ultra-violet 57

III.3.2. Détection électrochimique 57

III.3.3. Détection par spectrométrie de masse 57

III.3.4. Détection par fluorescence 58

III.4 Conclusion 58

PARTIE 2 : Partie expérimentale. 60

Chapitre IV : Mécanisme d'oxydation de la tétrahydrobioptérine 61

IV.1. Introduction 61

IV.2. Oxydation à l'air libre (ou auto-oxydation) de la tétrahydrobioptérine (article) 63

Abstract 63

Introduction 64

Methods 66

Results and discussion 68

Concluding remarks and perspectives 73

Supplementary information 77

IV.3. Oxydation électrochimique de la tétrahydrobioptérine 82

IV.3.1. Matériels et méthodes 82

IV.3.2. Étude de l'oxydation de la BH2 et de la BH4 en voltammétrie cyclique 83

IV.3.3. Étude de l'oxydation de la BH2 et de la BH4 en chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse après oxydation électrochimique post-colonne 86

IV.4. Conclusion générale sur l'auto-oxydation et l'électro-oxydation de la tétrahydrobioptérine 91

Chapitre V : Développement et validation d'une méthode du dosage simultané des métabolites de la dopamine, de la sérotonine et des ptérines par chromatographie liquide couplée à une détection séquentielle électrochimique et fluorimétrique (article) 95

Abstract 99

Introduction 100

Results and discussion 102

Conclusions 115

Methods 117

References 122

Supporting information 125

Chapitre VI : Dosage simultané de la dopamine, de la sérotonine, des ptérines et des folates par chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse 135

VI.1. Introduction **135**
VI.2. Matériels et méthode **136**
VI.3. Résultats et discussion **137**
VI.3.1. Optimisation de la méthode de dosage en UHPLC-MS 137
VI.3.2. Validation de la méthode 141
VI.4. Conclusion **146**

Conclusion générale et perspectives **147**

Bibliographie **149**

Liste des abréviations **159**

Remerciements

Je tiens à remercier Mme DELAUNAY Nathalie, à M. FRANCOIS Yannis et Mme HERRENKNECHT Christine qui m'ont fait l'honneur de juger mes travaux.

Je tiens à remercier mon directeur de thèse MOUSSA Fathi sans qui cette présente thèse n'aurait jamais pu exister. Cela a été trois (et très longues !) années à tes côtés. Trois années que je ne regrette pourtant pas. Malgré tes exigences et ton impatience (j'aurais pu utiliser d'autres termes comme « gueulante », « hurlement »… mais ça, ça reste entre nous, ok ?), j'ai beaucoup appris durant cette thèse. Oui, cela a été une expérience professionnelle très enrichissante où j'ai appris à gérer les hauts et les bas (surtout les bas d'ailleurs…). Mais, ne t'inquiète pas. Je ne t'en veux pas. J'essaierai à l'avenir de répondre plus souvent à tes appels téléphoniques. Dans tous les cas, Fathi, merci pour tout.

Je tiens à remercier également ma co-directrice de thèse antillaise, CROSNIER DE BELLAISTRE Myriam. Tu as toujours la pêche, toujours le sourire. Jamais je ne t'ai vue en colère. Mais comment fais-tu ? Dans tous les cas, merci pour ton implication dans cette thèse, pour ta gentillesse et pour ta disponibilité. J'ai passé de bons moments avec toi. J'aimais écouter tes anecdotes. Elles sont toujours intéressantes. Pour finir, n'oublie pas de prendre soin d'Ulrich-Lita !

Je vais maintenant m'adresser au reste du LETIAM. Je remercie TCHAPLA Alain, le doyen de notre équipe, et HERON Sylvie pour leurs conseils et leur attention. Cela m'a fait chaud au cœur. Merci également à BLETON Jean (alias Jeannot) pour la pause thé. C'était un moment agréable où on pouvait souffler et discuter avec les collègues. Cette tradition n'a malheureusement pas été perpétuée après ton départ à la retraite. Merci également à MEJANELLE Philippe pour son aide et son ironie. Merci aussi à DE PERSON Marine, la provinciale orléanaise, qui mange toujours un plat industriel à l'heure du déjeuner (ce n'est pas bien !). Toi aussi, tu as toujours des histoires à raconter. Sois heureuse et assume ton âge ! Merci à PAOLI Yvonne pour ta gentillesse et ta tendresse, et merci à ATIG Samia pour la préparation des TPs. Merci également à Zhu. C'était sympa de travailler avec toi sur les acides organiques. J'ai beaucoup appris sur la culture chinoise. Malheureusement, mon niveau en chinois est toujours aussi déplorable. Je tiens aussi à remercier les (anciens) doctorants qui ont égayé ces trois années de thèse à savoir : GUIBAL Pierre (sans toi, cette thèse n'existerait pas), PEREZ VASQUEZ Naira (la péruvienne toujours enjouée), Murphy, Arnaud, HMIDA Dorra, Kaouther, BENNIA Seif (le musicien qui m'a fait découvrir le oud, et qui un rire communicatif), KEYKHOSRAVI Sanaz (notre jeune maman iranienne !) et CHIPEAUX Caroline (tu adores venir me voir durant la pause déjeuner, mais moi je travaille !!! (dixit le mec qui ne travaille pas en fait)).

Je remercie également CHAMINADE Pierre d'avoir fait partie des membres de mon jury. Merci également à toute l'équipe de la faculté de pharmacie de Châtenay-Malabry. J'ai pris plaisir à participer à quelques réunions.

Je remercie MAITRE Philippe d'avoir présidé ma soutenance de thèse. Merci de m'avoir laissé utiliser les instruments au LCP sous l'œil vigilant de STEINMETZ Vincent, fan de moto et de la musique hard rock. Merci également à VAN DER REST et à HALGAND Frédéric du LCP.

Je remercie également RANJBARI Aliréza pour son soutien et sa gentillesse. Cela a été un plaisir de travailler avec toi en électrochimie.

Merci également au personnel enseignant : HELION Florence (la squatteuse du bureau), GIRAUD Nicolas (pour les TPs de chromato), VERGNE Caroline (pour les TPs de chimie des solutions, merci de m'avoir appris les bases de l'enseignement), KACI Chabane (tu es toujours là quand j'avais un problème de matériel) et FOUILLOU Sylvie (merci pour les règles de sécurité). Merci également à mes étudiants qui m'ont fait prendre conscience que l'enseignement, ce n'était pas pour moi. Merci aussi à GUILLEMINOT Olivier (n'oublie pas, Toulouse…) pour nos discussions qui n'ont révolutionné en rien le monde.

Passons maintenant à l'hôpital Trousseau. Merci à COUDERC Rémy d'avoir accepté d'être membre du jury de ma soutenance de thèse. Vous adorez lire les news durant le déjeuner. C'est récréatif et instructif. Merci à THIOULOUSE Elizabeth, Marie-Clothilde, Dominique, Sibille, Malek, Sylvie, Murielle (je coute cher à l'hôpital…) et aux autres membres du service (ce serait trop long de tous vous citer. Je suis désolé de ce méfait !). Un grand merci à HAUTEM Jean-Yves et SAINTIER Anne pour leur présence et leur humour. Après mon départ, personne ne squattera autant les machines. Vous êtes enfin soulagés ?

Merci également à PONCET Pascal et à SENECHAL Hélène. Vous étiez attentionnés à mon égard. C'était plaisant de travailler dans le même bureau que vous. Merci pour votre soutien.

Merci à mes stagiaires que j'ai côtoyés et/ou encadrés. Dans l'ordre : VUONG Virginie (tu viens du 93), LAPORTE Loren (merci d'être venue pour ma soutenance), SADOUN Jonathan (tu es mon meilleur stagiaire, les autres devraient prendre de la graine sur toi !), KANG Junru (tu parles bien français maintenant !), DALLANK Rachel (la sénégalaise de Dakar), TCHOU Marc (le Wenzhou ponctuel dans ses retards) et VU Duc Khai (c'était marrant de discuter avec toi, mais je n'ai pas eu beaucoup de temps pour t'encadrer ! Tu m'excuseras ?).

Je remercie ma famille et mes amis pour leur soutien. Repose en paix Hubert-Valérie, mon enfant défénestré(e) (certains comprendront…).

Liste des publications et des communications

Publications:

1) Pierre Guibal, Aurélien Lo, Philippe Maitre and Fathi Moussa (2017) *Pterin determination in cerebrospinal fluid: state of the art*. Ptéridines 28(2):83-89.

2) Aurélien Lo, Pierre Guibal, Diane Doummar, Diana Rodriguez, Jean-Yves Hautem, Rémy Couderc, Thierry Billette de Villemeur, Emmanuel Roze, Pierre Chaminade and Fathi Moussa (2017) *Single-step rapid diagnosis of dopamine and serotonin metabolism disorder*s. ACS Omega 2:5962-5972.

Article soumis :

1) Aurélien Lo, Philippe Maitre, Vincent Steinmetz and Fathi Moussa. Evidence and Structural characterization of two dihydrobiopterin tautomers as oxidation intermediates of tetrahydrobiopterin.

Communications :

1) Aurélien Lo, Loren Laporte, Myriam Bonose, Pierre Guibal, Rémy Couderc, Diane Doummar, Diana Rodriguez, Thierry Billette de Villemeur, Emmanuel Roze, Aliréza Ranjbari, Vincent Steinmetz, Philippe Maitre and Fathi Moussa (2016) *Oxydation de la tétrahydrobioptérine*. **Journée CPPS**, 24 juin 2016, Orsay, France.

2) Aurélien Lo, Loren Laporte, Myriam Bonose, Pierre Guibal, Rémy Couderc, Diane Doummar, Diana Rodriguez, Thierry Billette de Villemeur, Emmanuel Roze, Aliréza Ranjbari, Vincent Steinmetz, Philippe Maitre and Fathi Moussa (2017) *Étude du mécanisme d'oxydation de la tétrahydrobioptérine par spectrométrie de masse haute résolution*. **Congrès SEP 2017**, 28-30 mars 2017, Paris France.

3) Aurélien Lo, Loren Laporte, Myriam Bonose, Pierre Guibal, Rémy Couderc, Diane Doummar, Diana Rodriguez, Thierry Billette de Villemeur, Emmanuel Roze, Aliréza Ranjbari, Vincent Steinmetz, Philippe Maitre and Fathi Moussa (2017) *Structural characterization of two dihydrobiopterin tautomers as oxidation intermediates of tetrahydrobiopterin*. **4th World Congress on Mass spectrometry**, 19-21 juin 2017, Londres, Royaume-Uni.

Conférence :

1) Aurélien Lo, Loren Laporte, Myriam Bonose, Pierre Guibal, Rémy Couderc, Diane Doummar, Diana Rodriguez, Thierry Billette de Villemeur, Emmanuel Roze, Aliréza Ranjbari, Vincent Steinmetz, Philippe Maitre and Fathi Moussa (2016) *Evidence and Structural characterization of a reaction intermediate in the oxidation process of tetrahydrobiopterin*. **User's Meeting 2016 : Réseau national de spectrométrie de masse FT-ICR à haut champ**, 27 mai 2016, Metz, France.

Introduction générale

Les erreurs innées du métabolisme (EIM) sont des maladies génétiques qui se transmettent le plus souvent selon un mode autosomique récessif. Environ un nouveau-né sur cinq milles est touché par les EIM. Ces dernières sont causées par la mutation d'un gène qui altère la fonctionnalité d'une protéine ou la synthèse d'une molécule biologique. Ces dysfonctionnements biochimiques provoquent des désordres métaboliques souvent associés à des troubles neurologiques.

Au niveau du système nerveux central (SNC), certaines EIM affectent essentiellement la neurotransmission en entrainant des troubles de la synthèse des neurotransmetteurs, leur libération ou leur fixation sur les récepteurs post-synaptiques. La symptomatologie est alors progressive et dominée par des troubles du mouvement et un retard psychomoteur ou, dans certains cas, des crises d'épilepsie.

Afin de retarder l'atteinte neurologique, il est nécessaire, lorsqu'un traitement est disponible, d'apposer un diagnostic précoce, car seule la prise en charge médicale rapide peut prévenir les séquelles de la maladie. La plupart des traitements des EIM consistent de ce fait à pallier la synthèse du neurotransmetteur déficitaire.

En raison de l'isolement du SNC par la barrière hémato-encéphalique (BHE), le diagnostic du déficit repose alors sur l'exploration du profil métabolique des neurotransmetteurs dans le liquide céphalorachidien (LCR). Cependant, à l'heure actuelle, toutes les maladies neurologiques ne sont pas diagnostiquées et lorsqu'elles le sont, la physiopathologie n'est pas toujours connue. À titre d'exemple, sur plus de deux milles échantillons explorés ces dernières années au centre pédiatrique du groupe hospitalier Trousseau – La Roche Guyon, seulement 15 % ont reçu un diagnostic positif. Il est donc impératif de trouver de nouveaux biomarqueurs et d'optimiser les outils de diagnostic biologique actuels.

Dans le cadre de cette thèse, nous nous sommes intéressés au diagnostic biologique des IEM associées à des troubles neurologiques dont la physiopathologie est bien connue, tels que les déficits enzymatiques liés au métabolisme de la dopamine, de la sérotonine, des ptérines, des folates et des acides organiques urinaires (AOU). De même, à la demande de nos partenaires pédiatres du groupe hospitalier Trousseau – La Roche Guyon, nous nous sommes penchés sur le cas du déficit en acide gamma-aminobutyrique (GABA), dont l'implication dans les épilepsies d'origine inconnue est communément pressentie. Notre objectif principal était de développer des méthodes simples et rapides de diagnostic de ces maladies, dans le but de faciliter la prise en charge et le suivi des enfants atteints.

Les méthodes actuelles d'exploration de ces déficits reposent sur de nombreuses séparations chromatographiques de dosage spécifique d'un seul ou d'une famille de métabolites, par

chromatographie liquide haute performance (HPLC), longues et fastidieuses. Ainsi, par exemple, le diagnostic des déficits en tétrahydrobioptérine (BH4), cofacteur des hydroxylases nécessaires à la synthèse de la dopamine et de la sérotonine, nécessite au moins deux étapes chromatographiques précédées par des protocoles de préparation de l'échantillon chronophages. De plus, une autre méthode chromatographique est nécessaire au seul dosage du 5-méthyltétrahydrofolate (5-MTHF) dans le LCR.

Récemment, un travail de thèse réalisé dans notre laboratoire a abouti au développement d'une méthode de dosage simultané de toutes les ptérines d'intérêt diagnostic présentes dans le LCR, par HPLC couplée à la détection fluorimétrique après oxydation électrochimique post-colonne. Dans la continuité, une méthode de dosage simultané des métabolites de la dopamine et de la sérotonine ainsi que des ptérines, par HPLC couplée à une détection séquentielle par électrochimie (ECD) et fluorescence (FD) a été proposée. Ce travail a permis de simplifier le diagnostic des déficits dopaminergique et sérotoninergique en réduisant le dosage à une seule étape chromatographique au lieu de trois. Cependant, dans la dernière méthode proposée, le rendement d'électro-oxydation de la BH4 est relativement faible aux pH compatibles avec les phases stationnaires utilisées. Ce point reste à éclaircir, notamment par l'étude du mécanise d'électro-oxydation de ce cofacteur.

Ainsi, l'objectif premier de cette thèse a été de transposer la méthode par HPLC-ECD-FD en UHPLC-ECD-FD, puis en UHPLC-MS/MS, grâce à l'acquisition plus récente d'un triple quadripôle. Ce travail a nécessité d'explorer au préalable le mécanisme d'auto-oxydation et d'électro-oxydation de la BH4, par une combinaison de spectrométrie de masse en tandem, éventuellement haute résolution (FT-ICR), associée à la mobilité ionique différentielle et à la photodissociation activée par un laser accordable infrarouge.

Ainsi, nous avons organisé ce mémoire en trois parties. La première, bibliographique, est consacrée au rappel de quelques notions sur les fonctions biologiques et le métabolisme de la dopamine, de la sérotonine, des ptérines et des folates. Les déficits enzymatiques affectant le métabolisme de ces molécules ainsi que les traitements permettant de pallier le déficit, sont également abordés.

Les méthodes actuelles d'exploration de ces déficits seront aussi détaillées dans cette partie. La majorité de ces méthodes reposent sur une séparation chromatographique des des métabolites de ces amines biogènesd'une part et sur une séparation chromatographique des ptérines d'autre part. De même, les folates sont dosés dans le LCR après séparation chromatographique dans des conditions spécifiques. .

A la fin de cette partie, nous exposerons aussi les valeurs de références des amines biogènes, des ptérines et des folates dans le LCR établies à partir de ces méthodes, particulièrement celle par HPLC couplée à la détection fluorimétrique, après oxydation électrochimique post-colonne développée précédemment par notre équipe.

La seconde partie de ce mémoire est consacrée aux résultats expérimentaux et leurs discussions. Le premier chapitre est dédié à l'étude du mécanisme d'oxydation de la BH4 à l'air libre et par électrochimie. L'exploration du mécanisme d'oxydation à l'air libre, ou auto-oxydation, de la BH4 a été réalisée par une combinaison de techniques de spectrométrie de masse, mobilité ionique différentielle et photodissociation activée par un laser accordable infrarouge. Les études sur l'électro-oxydation ont été menées par voltammétrie cyclique et par LC-MS après oxydation électrochimique post-colonne.

Le second chapitre est consacré au développement et à la validation d'une méthode de dosages simultanés des métabolites de la dopamine, de la sérotonine et des ptérines, par chromatographie liquide ultra-haute pression (UHPLC) couplée à une détection séquentielle par électrochimie (ECD) et fluorescence (FD). Cette méthode a pour but de simplifier et raccourcir la durée du diagnostic des déficits dopaminergique et sérotoninergique. La méthode de dosage ainsi développée a pu être appliquée dans le cadre de quelques collaborations nationales et internationales. Il faut rappeler ici que la méthode de dosage proposée n'inclue pas le dosage des folates. Aussi, dans le dernier chapitre expérimental nous exposerons les résultats du développement et de la validation d'une nouvelle méthode de dosage simultané par UHPLC-MS/MS de tous les métabolites ciblés ainsi que du 5-MTHF.

La dernière partie de ce manuscrit, enfin, est dédiée à la conclusion générale et aux perspectives émanant de ce travail.

PARTIE 1 :
Rappel bibliographique de quelques notions concernant la dopamine, la sérotonine, les ptérines et les folates dans les fluides biologiques.

Chapitre I : Fonctions biologiques et métabolisme

I.1. Dopamine

I.1.1. Structures et fonctions biologiques de la dopamine et de ses métabolites

La dopamine et ses dérivés appartiennent à la famille des catécholamines. La figure 1.1 illustre leur structure moléculaire générale. Les catécholamines sont des molécules ayant un noyau benzénique sur lequel deux groupements hydroxyles adjacents se trouvent en position 3 et 4. Dans le cas de la dopamine et de ses dérivés, la chaine latérale carbonée est une éthylamine substituée se trouvant en position 1.

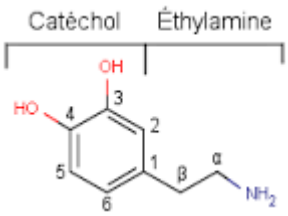


Figure 1.1 **:** Structure d'une catécholamine avec une éthylamine en position 1.

Au niveau biologique, la dopamine est une neurohormone. Sa fonction hormonale première est de libérer la prolactine par le lobe antérieur de l'hypophyse [1]. Par contre, sa fonction dans le système nerveux central (SNC) est multiple. C'est un neurotransmetteur inhibiteur qui joue un rôle dans la mémorisation, le comportement, la cognition et la fonction motrice [2,3].

La dopamine peut être diffusée selon trois voies principales [3] : la voie nigrostriée, la voie mésocorticolimbique et la voie tubéro-infundibulaire. La voie nigrostriée contrôle la motricité automatique. Cette voie est donc particulièrement importante puisque sa dégénérescence est responsable de la maladie de Parkinson [3]. Un dysfonctionnement de la voie mésocorticolimbique peut engendrer des troubles de comportements tels que l'addiction ou un problème de concentration et de mémoire [3]. La voie tubéro-infundibulaire est impliquée dans l'inhibition de la libération de la prolactine [3].

La dopamine est le précurseur de la noradrénaline. La noradrénaline est à la fois un neurotransmetteur et une hormone adrénergique. Elle joue un rôle dans la mémorisation, l'apprentissage et dans le cycle veille sommeil [3]. Au niveau périphérique, elle intervient également dans l'augmentation de la fréquence cardiaque, dans la réduction de diamètre de certains vaisseaux sanguins, et dans la reconversion des stocks énergétiques en glucose et en acides gras libres [3]. Au niveau du SNC, la noradrénaline est importante dans le locus coeruleus dont les neurones sont dans la grande majorité noradrénergiques [3].

La noradrénaline est le précurseur de l'adrénaline, également nommée épinéphrine. L'adrénaline est secrétée en réponse à un état de stress et d'un effort physique. Elle assure donc diverses fonctions : elle augmente la pression artérielle et la vitesse de contraction du cœur, dilate les pupilles et les bronches, et augmente la glycémie et la concentration des acides gras libres plasmatiques [3].

I.1.2. Métabolisme de la dopamine

Le métabolisme de la dopamine est représenté dans la figure 1.2. La dopamine est synthétisée à partir de la phénylalanine qui s'hydroxyle en tyrosine, grâce à l'action combinée de la phénylalanine hydroxylase (PAH) et de la BH4 [4]. Cette tyrosine synthétisée est ensuite hydroxylée par de la BH4 et de la tyrosine hydroxylase (TH) pour donner de la L-dopa [4,5]. Dans ces deux réactions successives, la BH4 joue le rôle de cofacteur. La L-dopa, ainsi formée, est décarboxylée par la dopa décarboxylase qui est un amino-acide décarboxylase (AADC), et par le pyridoxal phosphate (PLP), un cofacteur qui est la forme active de la vitamine B6 [6]. Cette réaction donne de la dopamine.

Mais la dopamine peut s'hydroxyler avec la dopamine bêta-hydroxylase (DBH) pour donner de la noradrénaline [6]. Cette dernière réagit avec la phényl éthanolamine N-acétyl transférase pour donner de l'adrénaline [6].

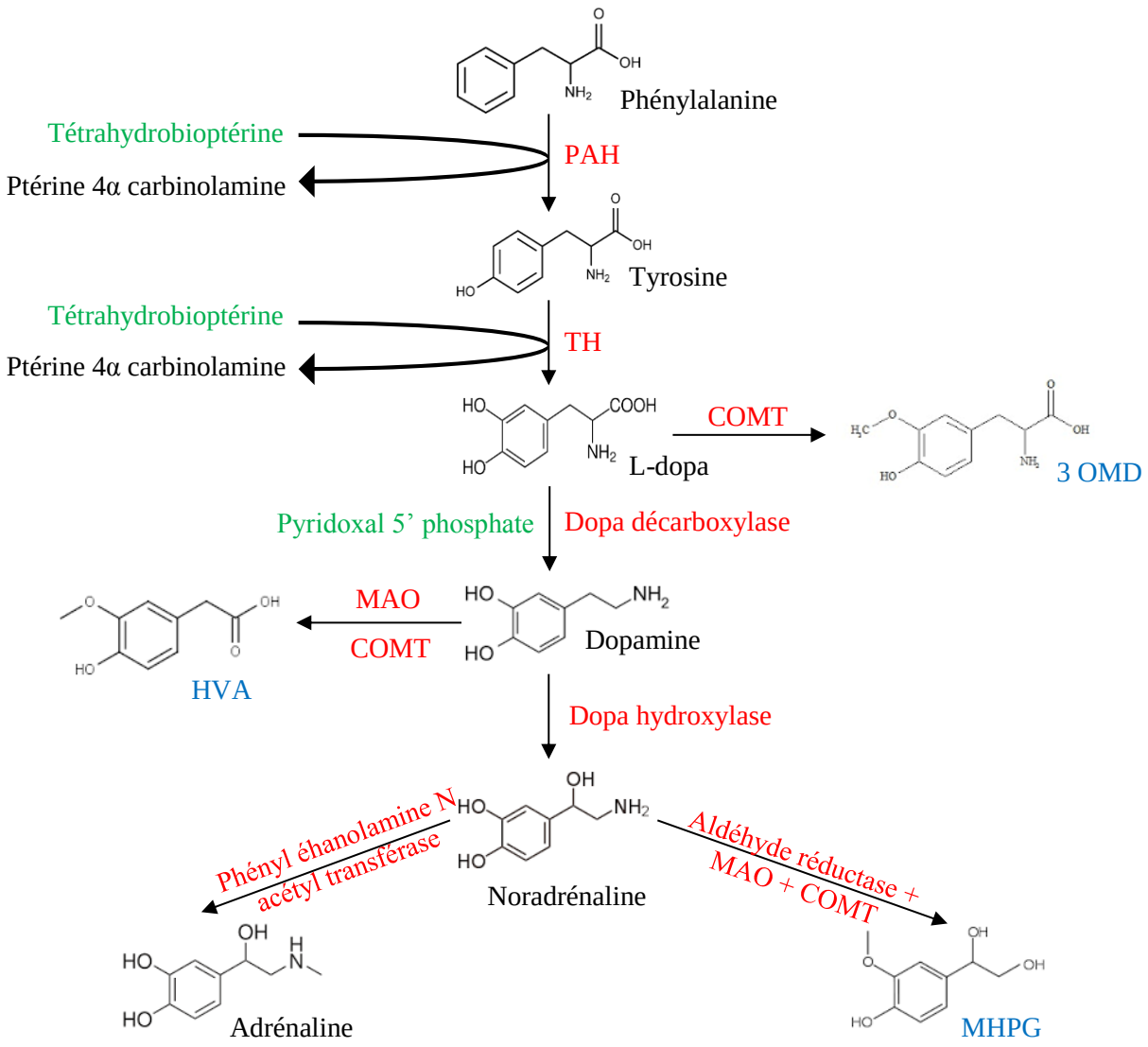


Figure 1.2 **:** Métabolisme de la dopamine. Les enzymes sont notées en rouge, les cofacteurs sont notés en vert, et les composés d'intérêts pour les diagnostiques sont notés en bleu.

Afin de pouvoir déterminer les désordres liés à la voie dopaminergique, il faut s'intéresser aux produits de dégradation générés au cours du métabolisme de la dopamine. En cas de forte concentration, la L-dopa est dégradée par la catéchol-O-méthyl transférase (COMT) en 3-ortho-méthyl-dopa (3-OMD) [7]. La dopamine peut également se dégrader en acide homovanillique (HVA) grâce à l'action de la monoamine oxydase (MAO) et de la COMT [7,8]. En réagissant avec l'aldéhyde réductase, la COMT et la MAO, la noradrénaline donne comme principal métabolite de dégradation le méthyl-hydroxy-phényl-glycol (MHPG) [9,10].

Ainsi, les principales molécules d'intérêt permettant de déterminer les désordres métaboliques de la voie dopaminergique sont donc la 3-OMD, le HVA et le MHPG.

I.2. Sérotonine

I.2.1. Structure et fonctions biologiques de la sérotonine et de ses métabolites

La sérotonine appartient à la famille des indolamines dont la structure moléculaire est représentée en figure 1.3. Les indolamines sont caractérisées par un noyau indole (accolement d'un cycle benzénique et d'un pyrrole) sur lequel peut se greffer une chaine latérale contenant une amine.

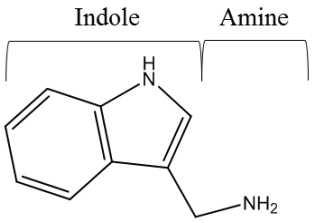


Figure 1.3 : Structure d'une indolamine.

Tout comme la dopamine, la sérotonine est l'un des principaux neurotransmetteurs du système nerveux central et périphérique [3]. Elle joue un rôle sur l'humeur, la thermorégulation et la régulation du sommeil. Elle est impliquée dans la formation de la mélatonine qui est une hormone du sommeil permettant la régulation de notre horloge biologique.

La sérotonine est aussi présente dans le tube digestif et dans les plaquettes sanguines afin de favoriser l'agrégation plaquettaire. Elle intervient également dans l'appareil cardiovasculaire en faisant contracter les vaisseaux et en augmentant la fréquence et la contraction cardiaque. Elle a aussi un effet sur la contraction des muscles lisses extravasculaires, tels que l'intestin, les bronches ou l'utérus [3].

I.2.2. Métabolisme de la sérotonine

Le métabolisme de la sérotonine est représenté dans la figure 1.4. Comme pour la synthèse de la dopamine, dans sa première étape, la synthèse de la sérotonine a besoin de la BH4 (qui joue le rôle de cofacteur) pour hydroxyler le tryptophane, à l'aide du tryptophane hydroxylase (TPH), afin de donner du 5-hydroxy-tryptophane (5-OHT) [4,5]. Ensuite, comme pour le métabolisme de la dopamine, elle a besoin du pyridoxal phosphate et d'une AADC (en

l'occurrence la 5-OH-tryptophane décarboxylase) pour décarboxyler le 5-OHT en sérotonine [11,12].

La sérotonine peut réagir avec la MAO pour former la 5-HIacétaldéhyde qui peut réagir avec deux enzymes [12]. La 5-HIacétaldéhyde peut réagir avec un aldéhyde réductase pour former la 5-OH-tryptophol. Elle peut également réagir avec un aldéhyde déshydrogénase pour former l'acide 5-hydroxy indole acétique (5-HIAA) qui est son produit majoritaire.

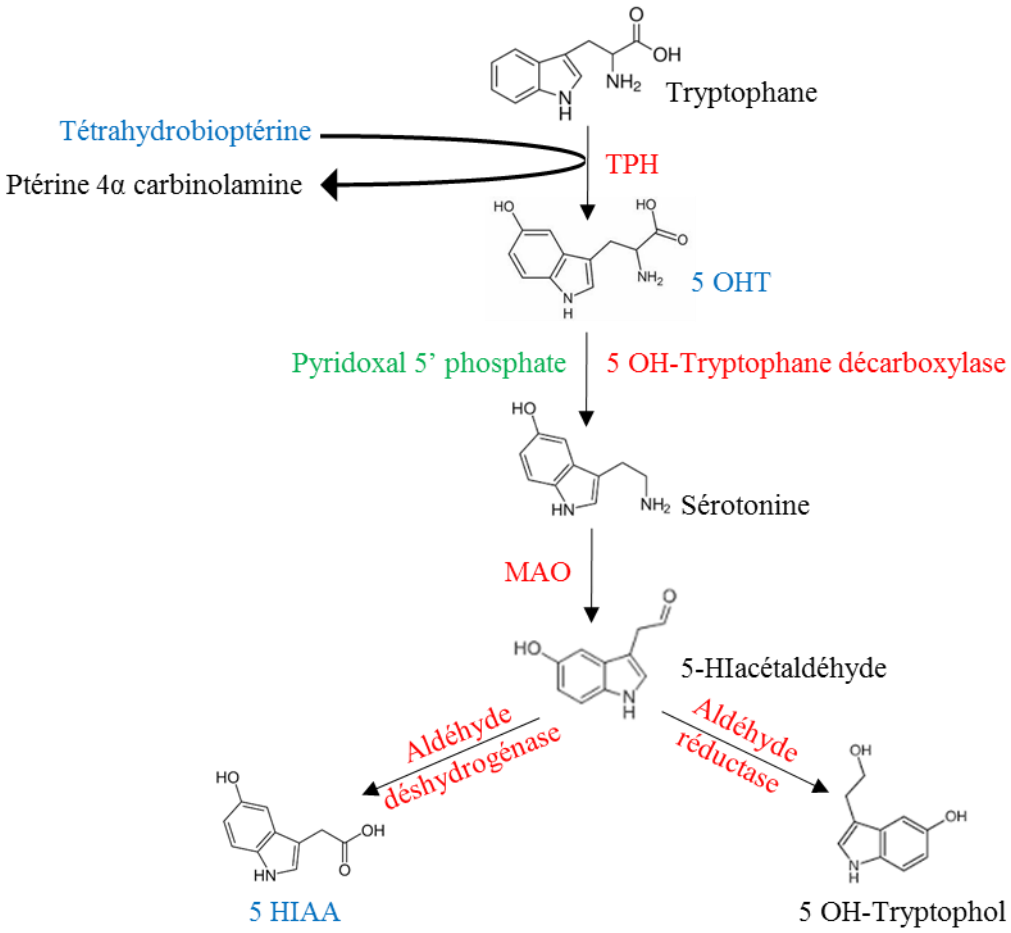


Figure 1.4 : Métabolisme de la sérotonine. Les enzymes sont notées en rouge, les cofacteurs sont notés en vert et les composés d'intérêts pour les diagnostiques sont notés en bleu.

Pour déterminer les troubles qui affectent la voie sérotoninergique, il faut s'intéresser aux composés suivants : 5-OHT et 5-HIAA.

I.3. Tétrahydrobioptérine (BH4)

I.3.1. Structure et fonctions biologiques de la tétrahydrobioptérine

La tétrahydrobioptérine (BH4) appartient à la famille des ptéridines qui ont pour structure de base un cycle pyrazine fusionné avec un cycle de pyrimidine. Dans la famille des ptéridines, il existe le groupe des ptérines qui ont une structure ptéridine de type 2 amino-4-oxo. Leur structure moléculaire est représentée à la figure 1.5. Dans cette étude, les types de ptérines qui vont nous intéresser sont celles qui possèdent une substitution par une chaine aliphatique en position 6 (comme la bioptérine ou la néoptérine) et qui sont dites non conjuguées. Ces ptérines peuvent se présenter sous différentes formes d'oxydation où la forme la plus oxydée est la plus fluorescente. BH4 est une ptérine réduite mais elle est la seule forme active dans le métabolisme des neurotransmetteurs [13].

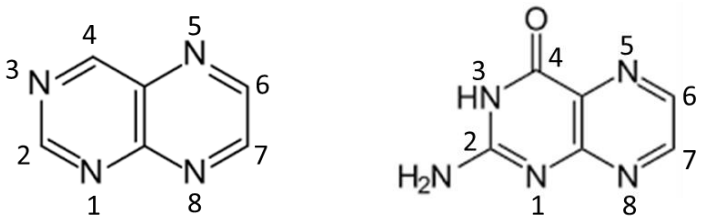


Figure 1.5 : Structure de la ptéridine (à droite) et de la ptérine (à gauche).

Au niveau biologique, la BH4 est essentiellement un cofacteur enzymatique pour les acides aminés aromatiques hydroxylases, le glycéryl-éther mono-oxygénase et l'oxyde nitrique synthase (NOS) [14]. La BH4 dimérise le NOS dont seul l'homodimère (protéine composée de deux chaines peptidiques identiques) est la structure catalytique active. Au cours de cette réaction, du monoxyde d'azote NO est créé. Le NO assure plusieurs fonctions biologiques telles que la vasomotricité des vaisseaux sanguins, l'élimination des bactéries pathogènes, la contraction cardiaque et la neurotransmission. La BH4 stimule également les canaux calciques, faisant entrer les ions Ca^{2+} dans la cellule. Les ions calciums jouent entre autres un rôle dans la contraction musculaire et la libération des neurotransmetteurs.

I.3.2. Métabolisme de la tétrahydrobioptérine

Le cycle métabolique de la BH4 est présenté à la figure 1.6. La BH4 est une molécule importante dans la synthèse de la dopamine et de la sérotonine puisqu'elle réagit avec des

hydroxylases, en tant que cofacteur, dès les premières étapes de ces deux métabolismes [15].

La BH4 est synthétisée à partir de la guanosine triphosphate (GTP) qui réagit avec la GTP-cyclohydrolase (GTP-CH) pour former la dihydronéoptérine triphosphate (NH2-triP) [16,17]. Cette dernière est ensuite transformée en 6-pyruvoyl tetrahydrobiopterine (6-PTP) sous l'action de la pyruvoyl tetrahydropterine synthase (PTPS) [4,17]. Enfin, la 6-PTP est réduite par la sépiaptérine réductase (SR) pour produire de la BH4 [4,17].

Par ailleurs, la BH4 peut s'hydroxyler pour donner de la ptérine 4-α-carbinolamine (P4C) [4,17]. La P4C est transformée par la ptérine carbinolamine déhydratase (PCD) en quinonoïde dihydrobioptérine (qBH2) qui est à son tour réduite en BH4 par l'action de la dihydroptéridine réductase (DHPR), permettant ainsi la régénération de la BH4 [4,17].

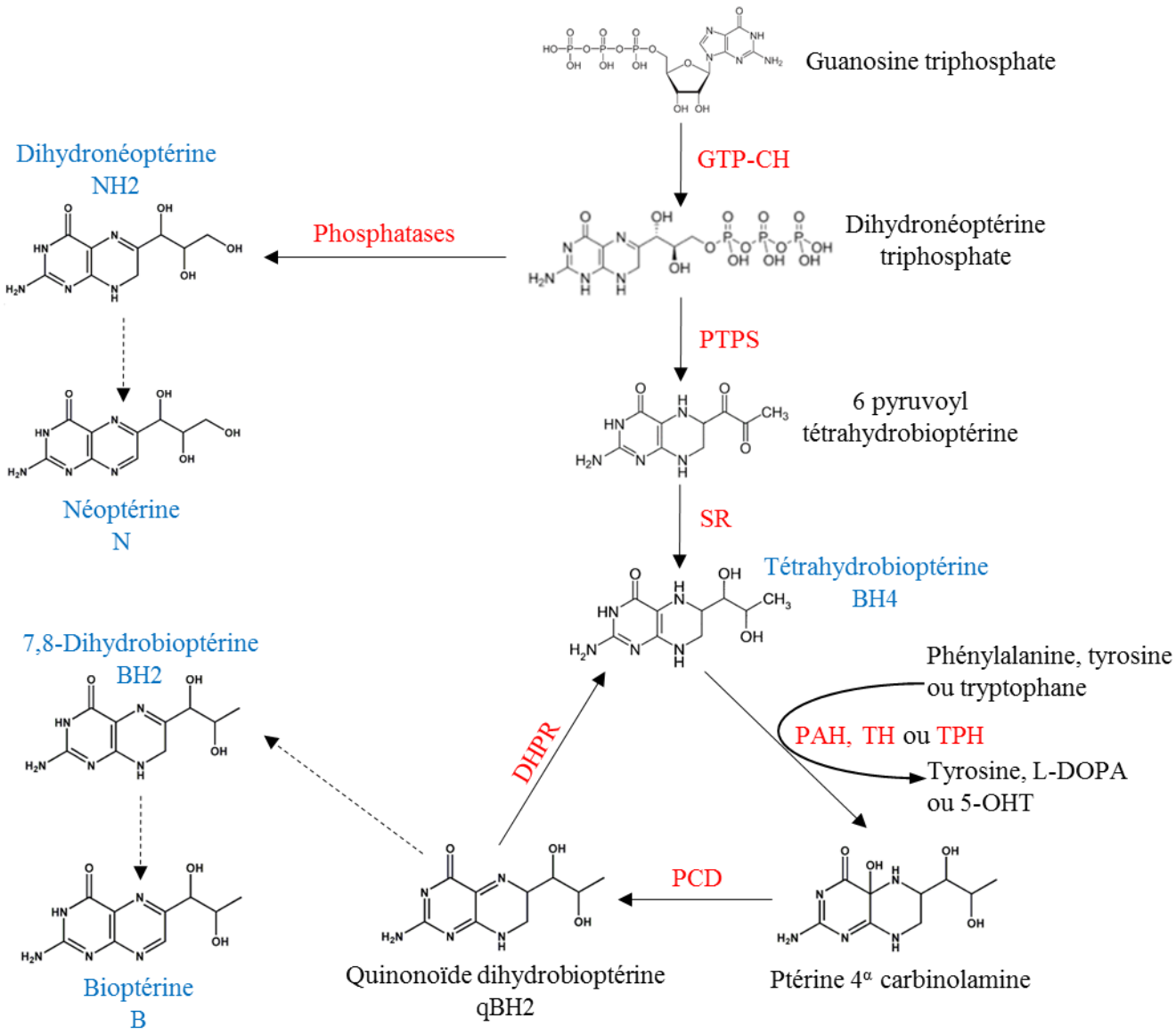


Figure 1.6 : Métabolisme de la BH4. Les enzymes sont notées en rouge et les composés d'intérêts pour les diagnostiques sont notés en bleu.

Le cycle métabolique de la BH4 présente de nombreux produits de dégradation. La NH2-triP se dégrade en réagissant avec des phosphatases pour former de la dihydronéoptérine (NH2) [18]. La NH2 peut s'oxyder spontanément en néoptérine (N).

La qBH2 est nécessaire pour la régénération de la BH4. Toutefois, elle peut se réarranger en 7.8-dihydrobioptérine (BH2) [4,17]. La BH2 peut se dégrader en s'oxydant naturellement en bioptérine (B).

Les dysfonctionnements dans le métabolisme de la BH4 sont dus soit à un défaut de synthèse (GTP-CH, PTPS ou SR) soit à un défaut de régénération (PCD ou DHPR). Ainsi, les molécules d'intérêts pour l'établissement des diagnostiques sont la N, la NH2, la B, la BH2 et

la BH4.

I.3.3. État des connaissances sur l'oxydation de la tétrahydrobioptérine

La BH4 est un cofacteur enzymatique instable qui s'oxyde spontanément. Différentes équipes de recherche ont étudié son mécanisme d'oxydation à l'air libre et en électrochimie, afin de mieux comprendre sa réactivité chimique et son rôle physiopathologique dans l'organisme. Ceci est essentiel pour faire des études pharmacocinétiques puisque la BH4 est utilisée en tant que médicament lors des déficits en BH4.

I.3.3.1. Oxydation à l'air libre

En solution aqueuse, la BH4 peut s'oxyder à l'air libre en réagissant avec le dioxygène pour donner de la BH2. Des études publiées précédemment [19] ont montré que cette réaction se fait en plusieurs étapes, en faisant intervenir des espèces radicalaires :

$$BH4 + O_2 \longrightarrow BH4^{+\cdot} + O_2^{-\cdot} \quad (1)$$
$$O_2^{-\cdot} + BH4 + 2\,H^+ \longrightarrow H_2O_2 + BH4^{+\cdot} \quad (2)$$
$$BH4^{+\cdot} \longrightarrow BH3^{\cdot} + H^+ \quad (3)$$
$$2\,BH3^{\cdot} \longrightarrow BH4 + qBH2 \quad (4)$$
$$qBH2 \longrightarrow BH2 \quad (5)$$
$$BH2 + O_2 \longrightarrow B + H_2O_2 \quad (6)$$

Dans cette réaction en chaine, intervient la qBH2, une espèce intermédiaire qui est un isomère de la BH2. La qBH2 a été mise en évidence indirectement par des techniques de spectrophotométrie. Ainsi, la BH4 ne s'oxyde pas directement en BH2 à l'air libre. Elle passe par une forme intermédiaire, à savoir la qBH2, qui s'isomérise progressivement en BH2. La BH2 formée est également instable et s'oxyde aussi à l'air libre, en réagissant avec le dioxygène pour donner de la B. L'oxydation à l'air libre de la BH4 est naturelle, et est influencée par différents facteurs. L'oxydation de la BH4 se fait moins rapidement en présence de réducteurs, tels que l'acide ascorbique [20] ou les thiols [21]. De même, la nature du solvant de solubilisation, la température et le pH de la solution jouent un rôle sur sa stabilité et sur ses produits de dégradation [22].

I.3.3.2. Oxydation chimique de Fukushima

La méthode de Fukushima est très souvent employée pour l'analyse des bioptérines dans les fluides biologiques [23]. Ce protocole expérimental, décrit dans le chapitre III de la partie I, a été inventé afin de doser les formes oxydées des bioptérines par fluorescence. Le traitement oxydatif de l'échantillon consiste à introduire un mélange de KI/I_2 dans une solution contenant de la BH4. En fonction du pH du milieu réactionnel, les produits d'oxydation de la BH4 ne sont pas les mêmes. Par exemple, en milieu acide, la BH4 et la BH2 s'oxydent en B. Alors qu'en milieu alcalin, la BH2 s'oxyde toujours en B, mais la BH4 s'oxyde en perdant sa chaine latérale en position 6 pour donner de la ptérine (P).

I.3.3.3. Oxydation électrochimique

Pour connaitre davantage le mécanisme d'oxydation de la BH4 en électrochimie, des études en voltammétrie cyclique ont été réalisées [24-27]. Comme dans le cas de l'oxydation à l'air libre, il a été observé la présence de composés radicalaires et d'une molécule intermédiaire supposée être la qBH2 qui apparait durant l'oxydation de la BH4. En effet, pour s'oxyder, la BH4 a besoin de perdre deux électrons et deux protons. La perte du premier électron est relativement défavorisée et mène à

la formation du radical $BH3^{\cdot}$. La perte du deuxième électron est plus facile car le radical $BH3^{\cdot}$, hautement instable, réagit spontanément pour former la qBH2 qui s'isomérise ensuite en BH2. Sans passer par une molécule intermédiaire, la BH2 ainsi formée peut s'oxyder en B en perdant deux électrons et deux protons. L'oxydation de la BH2 et de la BH4 sont réversibles en électrochimie.

L'effet du pH a été également étudié pour des pH neutres à basiques [26]. En ce qui concerne la BH4, plus le pH est neutre, plus son potentiel d'oxydation se déplace vers des potentiels élevés. En d'autres termes, plus le pH est neutre, plus il est difficile d'oxyder la BH4. Ceci indique que les protons participent à la réaction, où une barrière cinétique apparait en fonction de la disponibilité du proton.

I.4. Folates

I.4.1. Structure et fonctions biologiques des folates

Les folates et ses dérivés sont constitués d'un noyau ptéridine, d'un acide para-aminobenzoïque et d'un glutamate. La structure moléculaire générale des folates est représentée à la figure 1.7.

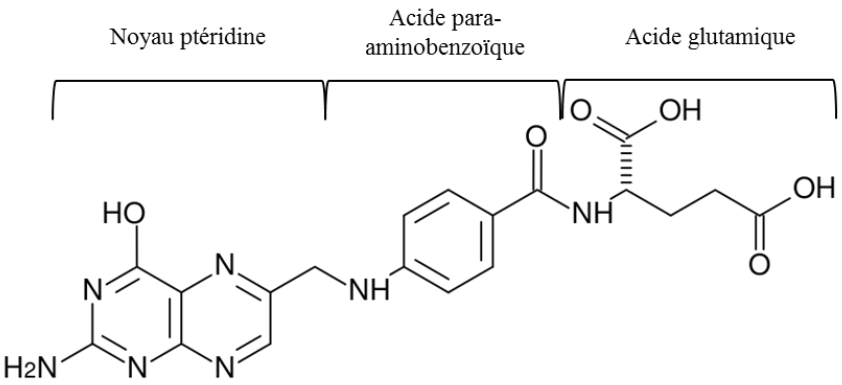


Figure 1.7 : Structure générale des folates.

Les folates appartiennent au groupe des vitamines B. Ils agissent en tant que cofacteur ou coenzyme dans de nombreux processus métaboliques comme la réparation du génome, la régulation de l'expression des gènes ou bien la synthèse de neurotransmetteurs [28]. Les folates jouent également un rôle dans la morphogénèse (fermeture du tube neural) [29].

Pour l'homme, la principale source de folate est l'alimentation, notamment les végétaux [30]. Une carence en folate peut entrainer une anémie, des troubles psychologiques (dépression, démence) voire des problèmes neurodégénératifs [31].

I.4.2. Métabolisme des folates

Les folates jouent un rôle clé dans le cycle de régénération de la BH4. En temps normal, la DHPR réduit la qBH2 en BH4. Cependant, quand la DHPR est en déficit, la qBH2 se réarrange en 7,8-BH2 qui est ensuite réduite en BH4 par l'intermédiaire du dihydrofolate réductase (DHFR) [32]. La figure 1.8 montre les voies métaboliques d'interconversion des folates dans le cerveau [33].

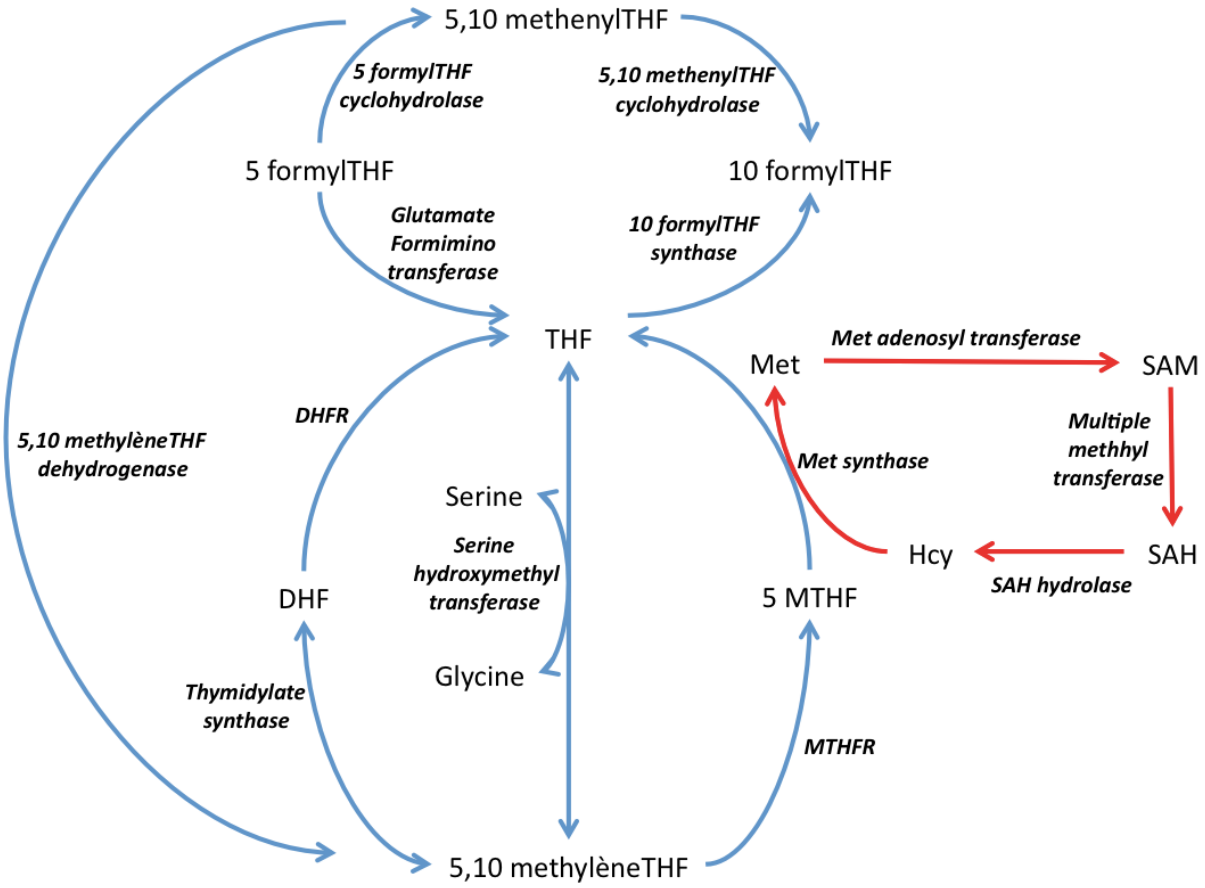


Figure 1.8 : Interconversion des folates.

DHF : Dihydrofolate, THF : Tétrahydrofolate, 5-MTHF : 5-méthyltétrahydrofolate, Met : méthionine, SAM : S adenosylméthionine, SAH : S adénosylhomocystéine, Hcy : Homocystéine.

Dans le sang et le LCR, le 5-méthyltétrahydrofolate (5-MTHF) est la forme prédominante des folates. Il est transporté du sang vers le LCR à travers la barrière hémato-encéphalique (BHE) au niveau du plexus choroïde. Il s'agit d'un transport actif et on trouve une concentration au moins 1,5 fois plus grande dans le LCR que dans le sang [32]. Ainsi, dans la famille des folates, le 5-MTHF est la seule molécule d'intérêt diagnostique dans notre étude.

I.5. Conclusion

Compte –tenu de la diversité des fonctions biologiques assurées par la dopamine, la sérotonine, les ptérines, les folates et leurs métabolites respectifs, ces molécules sont capitales pour le bon fonctionnement de l'organisme. Par ailleurs, il existe un lien d'interdépendance dans le métabolisme de tous ces composés. En effet, la BH4, synthétisée par les folates, joue le rôle de cofacteur dans la synthèse de la dopamine, de la noradrénaline et de la sérotonine. Par conséquent, une erreur innée du métabolisme touchant l'un de ces métabolismes affecte indirectement les autres métabolismes étudiés.

Chapitre II : Symptômes, diagnostic et traitements actuels

Les déficits enzymatiques sont dus à des mutations génétiques qui affectent la production des enzymes ou des cofacteurs enzymatiques dans l'organisme [13,18,34]. Étant donné que de nombreux enzymes et cofacteurs enzymatiques interviennent dans le métabolisme de la dopamine, de la noradrénaline, de la sérotonine, de la BH4 et des folates, un déficit enzymatique ou d'un cofacteur enzymatique entraine une carence en ces neurotransmetteurs, pouvant ainsi mener à des syndromes et/ou des symptômes particuliers. L'étape ou limitante peut se trouver à tous les niveaux d'une voie de synthèse. C'est donc pour cela que de nombreux cas de pathologie, présentant des déficits enzymatiques divers et variés, ont déjà été recensés et publiés.

À cause de la dégradation trop rapide de la dopamine et de la sérotonine dans le LCR, il n'est pas possible de doser ces deux molécules dans ce fluide biologique. Pour cela, il faut doser leurs précurseurs et leurs métabolites d'intérêt. Une augmentation ou une diminution spécifique d'un précurseur ou d'un métabolite, corrélée aux symptômes, permet une estimation fiable du déficit enzymatique. Le dosage dans le LCR est indispensable car seul le LCR reflète l'activité du système nerveux central.

L'identification formelle des déficits enzymatiques et/ou des troubles neurologiques chez les patients permet de leur proposer un traitement médicamenteux afin de prendre en charge leur maladie en diminuant ou en retardant les symptômes apparents. Les médicaments administrés permettent de pallier essentiellement la faible concentration d'un neurotransmetteur, en introduisant dans l'organisme un agoniste qui mime les effets du neurotransmetteur en déficit. Toutefois, les médicaments prescrits peuvent ne pas être parfaitement adaptés quand les causes de la maladie ne sont pas exactement connues. Dans ces cas-là, les médicaments administrés permettent uniquement de diminuer les symptômes sans toutefois traiter les causes du problème.

Dans ce chapitre, seront recensés à la fois les déficits enzymatiques affectant le métabolisme de la dopamine, de la sérotonine, de la BH4 et des folates, mais aussi les traitements permettant de pallier les effets d'un enzyme en défaut.

II.1. Amines biogènes

Les voies dopaminergique et sérotoninergique présentent des enzymes communs. Un déficit enzymatique peut ainsi altérer simultanément les deux voies.

II.1.1. Symptômes et diagnostic

II.1.1.1. Déficit en phénylalanine hydroxylase (PAH)

Si la voie de la BH4 n'est à l'origine d'aucun trouble, un déficit en phénylalanine hydroxylase (PAH) peut conduire à une phénylcétonurie, caractérisée par une hyperphénylalaninémie [35]. Si la maladie n'est pas traitée, il y a un risque d'apparition de troubles de l'attention, de la mémoire et de troubles neurologiques. Le diagnostic ne se fait pas à partir du dosage du LCR. Une méthode alternative, comportant moins de risques et appelée test de Guthrie, a vu le jour. Elle consiste à déposer quelques gouttes de sang sur un papier buvard afin de doser la phénylalanine [35].

II.1.1.2. Déficit en tyrosine hydroxylase (TH)

La tyrosine hydroxylase (TH) est la deuxième enzyme impliquée dans la synthèse de la dopamine. Les symptômes commencent généralement dès la première année de vie [36-38]. Les patients peuvent se diviser en deux groupes. Le premier groupe concerne 70% des patients dont les symptômes sont corrélés au syndrome parkinsonien comme l'hypokinésie progressive, la bradykinésie et la dystonie avec des fluctuations diurnes. Le deuxième groupe présente des symptômes parkinsoniens beaucoup plus sévères que le premier groupe, une hypotonie, un retard mental, des crises oculogyres, une chorée et un ptosis.

Le profil biochimique des déficits en TH est particulier. Il y a diminution du HVA, et dans certains cas de la 3-OMD et de la MHPG dans le LCR [36-38].

II.1.1.3. Déficit en tryptophane hydroxylase (TPH)

Le tryptophane hydroxylase (TPH) est le premier enzyme impliqué dans la synthèse de la sérotonine. Un déficit en TPH fait baisser la concentration en sérotonine et entraine essentiellement des troubles du comportement. Les patients souffrent de déficit de l'attention, d'impulsivité et d'hyperactivité (représentant environ 4 à 6% des enfants scolarisés) [39]. Ce sont des symptômes qui persistent à l'âge adulte. Ils peuvent aussi souffrir de dépression, d'autisme, de myoclonie, d'ataxie…

Dans le LCR, en cas de déficit en TPH, il y a une diminution de la 5-HIAA et du HVA [40].

II.1.1.4. Déficit en acide aminé décarboxylase (AADC)

La dernière étape de synthèse de la dopamine et de la sérotonine est catalysée à partir d'un acide aminé décarboxylase (la dopa décarboxylase pour la dopamine et la 5 OH-tryptophane

décarboxylase pour la sérotonine) [41]. Les symptômes apparaissent majoritairement dès la prime enfance, sauf dans certains cas où ils peuvent apparaitre à l'âge adulte (jusqu'à 24 ans) [41-42]. Ces symptômes sont principalement une hypotonie, des crises oculogyres, une dystonie, des retards mentaux et des troubles du mouvement.

Dans le LCR, en cas de déficit en AADC, il y a une diminution des concentrations en 5-HIAA, en HVA et en MHPG. Il y a par contre une augmentation de la concentration en 3-OMD et en 5-OHT [41].

II.1.1.5. Déficit en pyridoxamine phosphate oxydase (PNPO)

Le pyridoxal phosphate (PLP) est le cofacteur de l'AADC dans la synthèse de la dopamine et de la sérotonine [41]. La pyridoxamine phosphate oxydase (PNPO) est une enzyme permettant de synthétiser le PLP à partir de la pyridoxine ou de la pyridoxamine. Ainsi, une carence en PNPO entraine un déficit en PLP, conduisant à une diminution de la synthèse de la dopamine et de la sérotonine. Les symptômes liés sont [43] : des épilepsies, des encéphalopathies néonatales et des convulsions insensibles aux anticonvulsifs. Les déficits en PNPO ne peuvent pas être traités avec de la pyridoxine afin d'amoindrir les effets des symptômes observés.

Dans le LCR, le profil métabolique des déficits en PNPO est le même que celui des déficits en AADC. Il y ainsi une diminution de la MHPG, et potentiellement de l'HVA et du 5-HIAA. Il y a une augmentation de la 3-OMD et de la 5-OHT [43].

II.1.1.6. Déficit en dopamine bêta-hydroxylase (DBH)

La dopamine bêta-hydroxylase (DBH) est une enzyme permettant de transformer la dopamine en noradrénaline. Un déficit en DBH induit un manque de synthèse de la noradrénaline. Les symptômes sont une hypotension sévère, une ptose palpébrale, une congestion nasale et des troubles sexuels. Ces symptômes apparaissent très tardivement dans l'enfance, voire durant l'âge adulte [44-45].

Dans le LCR, en cas de déficit en DBH, on peut observer une absence totale de noradrénaline dans le plasma, le LCR et l'urine. Le dosage se fait dans le plasma, où il y a une concentration élevée en adrénaline, en HVA et en 3,-4dihydroxyphénylacétique (DOPAC) [44-45].

II.1.1.7. Déficit en monoamine oxydase (MAO)

La monoamine oxydase (MAO) est une enzyme intervenant dans la synthèse de la dopamine

et de la sérotonine. Un déficit en MAO peut conduire au syndrome de Brunner, caractérisé par un comportement impulsif (agressivité, hypersexualité…), par des troubles de la conduite (alcoolisme, personnalité antisociale…), par un déficit de l'attention, et par un léger retard mental… [13]

Dans le LCR, en cas de déficit en MAO, il y a une augmentation de la sérotonine et une diminution du HVA. Le taux de MHPG et de 5-HIAA sont soit normaux, soit abaissés [46]. Il n'est pas obligatoire de passer par le LCR pour dépister un déficit en MAO. On peut doser le MAO dans les plaquettes sanguines, un fluide biologique plus facilement accessible que le LCR [46].

II.1.1.8. Déficit en catéchol-O-méthyl transférase (COMT)

Le catéchol-O-méthyl-transférase (COMT) est un enzyme intervenant dans la synthèse dopaminergique, conduisant à la synthèse de la 3-OMD, de l'HVA et du MHPG. Un déficit enzymatique en COMT entraine des troubles psychiatriques. Les personnes souffrant de ce déficit sont souvent agressives et peuvent également souffrir de schizophrénie [47].

Dans le LCR, un déficit en COMT n'affecte pratiquement pas le niveau de dopamine et de noradrénaline dans le cerveau. Par contre, le taux en 3-OMD, HVA et en MHPG est diminué [48].

II.1.1.9. Troubles des transporteurs de la dopamine (DTDS)

La recapture de la dopamine dans la fente synaptique se fait grâce à la Dopamine Active Transporter (DAT) [49]. Un déficit en DAT est soit d'origine génétique ou soit d'origine auto-immune. Un déficit en DAT augmente le temps de présence de la dopamine dans la fente synaptique qui peut être dégradée par la COMT, augmentant ainsi la concentration en HVA dans le LCR. Si la recapture ne se fait pas suffisamment, la dopamine stockée dans les vésicules synaptiques se retrouve alors réduite. De plus, la dopamine peut aussi activer des récepteurs inhibant la TH, diminuant ainsi sa propre synthèse, et accentuant davantage son déficit. Les symptômes du déficit en DTDS sont : un syndrome parkinsonien infantile, une dystonie et des symptômes identiques à ceux rencontrés dans les défauts de synthèse en dopamine [50].

Dans le LCR, en cas de déficit en DTDS, il y a augmentation de la HVA [50-51].

II.1.2. Traitements actuels

II.1.2.1. Traiter la phénylcétonurie (PCU)

La phénylcétonurie est liée à un défaut en phénylalanine hydroxylase (PAH) dans l'organisme,

ce qui empêche le métabolisme de la phénylalanine, une molécule présente naturellement dans l'alimentation. Sans traitement adéquat, la phénylalanine (Phe) s'accumule dans l'organisme entrainant ainsi une hyperphénylalaninémie dans les fluides biologiques (sang, urine et LCR). En fonction de l'excès de phénylalanine dans le sang, on distingue trois types de forme de la maladie [52] :

— la phénylcétonurie typique où la concentration en phénylalanine est supérieure à 20 mg/dL ;

— la phénylcétonurie atypique où le taux est compris entre 10 et 20 mg/dL ;

— l'hyperphénylalaninémie modérée permanente (HMP) où le taux est inférieur à 10 mg/dL.

Les valeurs normales de Phe dans le sang sont inférieures à 3 mg/dL. En France, la phénylcétonurie est dépistée dès la naissance car son accumulation dans l'organisme est néfaste pour le développement du cerveau de l'enfant, car elle peut entrainer un retard mental.

La prévalence de la phénylcétonurie dépend du pays. Elle est plus fréquente en Irlande, en Islande et en Turquie, mais plus rare en Finlande et en Thaïlande [34]. La phénylcétonurie touche une naissance sur 125 000 à 2 600 selon les régions. En France, une PCU typique ou atypique touche une naissance sur 17 000, et une HMP touche un nouveau-né sur 27 000.

Cette maladie nécessite un régime alimentaire pauvre en phénylalanine, à suivre impérativement afin d'empêcher l'apparition de symptômes liés à la maladie. Si le traitement est bien suivi, les patients peuvent mener une vie normale et à l'âge adulte, certains peuvent même se passer de ce régime (bien qu'il faille être contrôlé de temps en temps par précautions) [53]. À travers la diète, en fonction de l'âge, on recherche à faire abaisser le taux de Phe entre 2 et 5 mg/dL chez les enfants, ≤ 15 mg/dL chez les adolescents et ≤ 20 mg/dL chez les adultes.

Une hyperphénylalaninémie peut aussi être induite par un défaut en BH4 qui joue le rôle de cofacteur de la PAH pour hydroxyler la Phe en tyrosine. Ainsi, une hyperphénylalaninémie n'est pas forcément induite par un déficit en PAH.

II.1.2.2. Médicaments dopaminergiques

Un défaut dans la synthèse de la dopamine entraine des problèmes neurologiques graves. Les traitements actuels visent à essayer de rétablir la concentration en dopamine à un taux normal. Trois grandes classes de médicaments sont connues pour lutter contre les maladies affectant la voie dopaminergique [54-55] :

— ceux qui comblent le déficit en dopamine

— ceux qui inhibent la dégradation de la dopamine

— ceux qui n'agissent pas par l'intermédiaire de la dopamine

Les médicaments dopaminergiques permettent de traiter la maladie de Parkinson, le syndrome des jambes sans repos, l'hyperprolactinémie, les troubles de déficit de l'attention hyperactivité (TDAH)…

Pour les personnes souffrant de TDAH, on leur prescrit généralement des amphétamines ou des dérivés d'amphétamine. Les amphétamines stimulent la libération de dopamine. Pour ce faire, ayant une structure similaire à la dopamine, elles sont captées par les transporteurs à dopamine puis se diffusent à travers la membrane neuronale. À l'intérieur du neurone, les amphétamines feraient sortir la dopamine des vésicules de stockage et l'expulseraient dans la fente synaptique en faisant fonctionner en sens inverse les transporteurs à dopamine. Ceci permet de maintenir un taux normal en dopamine pour les personnes sujettes à des troubles de la concentration ou pour les enfants hyperactifs. À la prise de ces médicaments, certains effets secondaires peuvent apparaitre comme l'hypertension artérielle, les troubles cardiaques, l'hyperthyroïdie…

Pour les maladies neurologiques plus graves que le TDAH, la L-dopa est le médicament le plus utilisé. C'est un précurseur qui réagit avec la Dopa décarboxylase et la PLP pour donner de la dopamine. La L-dopa est capable de traverser la barrière hémato-encéphalique permettant de pallier momentanément le déficit en dopamine dans le cerveau. Des agonistes dopaminergiques peuvent être aussi utilisés comme l'apomorphine, la bromocriptine, la péribédil… Ces agonistes permettent de retarder l'introduction de la L-dopa dans le cerveau. Le type d'agoniste dopaminergique prescrit aux patients dépend de sa sensibilité au traitement et de l'évolution de sa pathologie. Les agonistes peuvent être associés à la L-dopa. Les effets secondaires de ces médicaments sont essentiellement des nausées et vomissements, une baisse de tension (pression artérielle), une somnolence accrue, des hallucinations et des troubles du comportement (addiction, hypersexualité, achats compulsifs…) [56].

Un autre moyen de rétablir un taux normal en dopamine est d'inhiber certaines enzymes qui participent à la dégradation de la L-dopa ou de la dopamine. L'enzyme COMT dégrade la L-dopa en 3OMD et les enzymes MAO et COMT dégradent la dopamine en HVA. Ainsi, pour prolonger la durée thérapeutique de la L-dopa, on utilise la sélégiline et l'entacapone pour inhiber respectivement la MAO et la COMT. Ces deux molécules peuvent être prescrites en complément de la L-dopa [56].

Des médicaments symptomatiques peuvent aussi être prescrits. Ces médicaments n'agissent pas par l'intermédiaire de la dopamine. Elles soulagent seulement un ou des symptômes particuliers. Leur mécanisme d'action est divers. Elles peuvent par exemple bloquer les récepteurs d'un autre neurotransmetteur ou inhiber la recapture de la dopamine.

II.1.2.3. Médicaments sérotoninergiques

Les médicaments sérotoninergiques sont couramment utilisés pour traiter la dépression des patients. Comme pour la dopamine, ces médicaments permettent de stabiliser momentanément la sérotonine à une concentration qui se rapproche de la norme. Il existe quatre principaux types de médicaments [57] :

— les Inhibiteurs de l'enzyme MAO (IMAO) ;

— les tricycliques : imipramine, amitriptyline… ;

— les Inhibiteurs Sélectifs de la Recapture de la Sérotonine (ISRS) : fluoxétine, citalopram… ;

— les agonistes et antagonistes sérotoninergiques.

La sérotonine peut interagir avec l'enzyme MAO pour former du 5-HIacetaldehyde. Les IMAO sont les premiers antidépresseurs connus. Afin de prolonger la durée de vie de la sérotonine, les IMAO bloquent les enzymes MAO. Ceci a pour conséquence de rendre la sérotonine beaucoup plus disponible.

Les tricycliques et les ISRS sont également utilisés comme médicament et ont un mécanisme d'action similaire sur l'organisme. La différence étant que les ISRS inhibent plus spécifiquement la recapture de la sérotonine alors que les tricycliques peuvent aussi inhiber la recapture d'autres neurotransmetteurs (histamine, l'acétylcholine…). La sérotonine reste alors plus longtemps dans la fente synaptique ce qui permet de compenser les taux faibles en sérotonine chez certains patients.

Un autre moyen de traiter les troubles sérotoninergiques est d'utiliser des agonistes ou des antagonistes. La plupart des agonistes appartiennent à la famille des triptans (sumatriptan, zolmitriptan...) [57]. Ingérées par l'organisme, ces molécules permettent de rétablir un taux normal en sérotonine. Par contre, les antagonistes sérotoninergiques (le milnacipran, la venlafaxine…) jouent un rôle inverse en limitant la neurotransmission de la sérotonine [58]. La sérotonine étant impliquée dans certaines psychoses lorsqu'elle est en grande concentration, les antagonistes bloquent les récepteurs sérotoninergiques afin que ces derniers captent moins de sérotonine libérée dans la fente synaptique. Les antagonistes peuvent ainsi jouer le rôle d'antipsychotique.

Lors d'un surdosage ou d'association de substances à propriétés sérotoninergiques, un syndrome sérotoninergique peut apparaitre [59]. Ce syndrome se caractérise par un fort taux en sérotonine. Les manifestations cliniques sont de l'ordre cognito-comportementale (altération de l'état mental, impatience, agitation…), neurovégétatif (diaphorèse, hyperthermie, tachycardie…) et neuromusculaire (tremor, mydriase…). Dans des cas beaucoup plus graves, ce syndrome peut entrainer la mort.

Il existe aussi d'autres moyens plus naturels pour augmenter le taux en sérotonine à des valeurs

normales. Le massage thérapeutique et une activité physique permettent par exemple de produire plus de sérotonine [60-61].

II.2. Ptérines

La BH4 joue le rôle de cofacteur dans les premières étapes de synthèse de la dopamine et de la sérotonine. Étant intimement liée à ces deux neurotransmetteurs, une carence en BH4 aura pour effet d'entrainer une diminution dans la synthèse de la dopamine et de la sérotonine dans l'organisme.

II.2.1. Symptômes et diagnostic

II.2.1.1 Déficit en guanosine triphosphate cyclohydroxylase (GTP-CH)

La première enzyme impliquée dans la synthèse de la BH4 est la guanosine triphosphate cyclohydroxylase (GPT-CH) [4]. Un déficit en GPT-CH entraine certains troubles neurologiques. Ces troubles neurologiques dépendent du type de transmission de la mutation du gène responsable de la production en GPT-CH. Ainsi, les symptômes ne seront pas les mêmes si on a affaire à une mutation autosomique dominante ou récessive.

Si on a affaire à une atteinte autosomique dominante, on parle alors du syndrome de Segawa, découvert pour la première fois en 1971 [62]. Les symptômes caractéristiques sont : une dystonie dopa-sensible (c'est-à-dire régression des troubles après traitement avec du L-DOPA) marquée par des fluctuations diurnes, des crises oculogyres, une détérioration du langage et des troubles dans la croissance [63]. Les premiers symptômes apparaissent durant l'enfance, vers 6-7 ans, rarement à un âge avancé. Le syndrome de Segawa affecte plus les femmes que les hommes : il y a deux à quatre fois plus de femmes atteintes par cette maladie que les hommes [63]. Cette maladie concerne environ 70% des dystonies de type dopa-sensibles installées dans l'enfance [63]. L'imagerie par résonnance magnétique (IRM) ne détecte pas d'anomalie dans le système nerveux [64]. Cette maladie entraine des changements dans la concentration de certains métabolites. Il y a une diminution de la 3-OMD, du 5-OHT, du 5-HIAA, du HVA, du MHPG, de la NH2, de la BH2 et de la BH4 dans le LCR [4,18,65].

Dans le cas d'une atteinte autosomique récessive, les symptômes sont moins marqués [66-67]. Les patients souffrent d'un problème de déglutition, d'une hypotonie du tronc, d'épilepsie, et d'un retard de développement. Il y a aussi apparition d'une hyperphénylalaninémie, absente dans le syndrome de Segawa. Ceci permet de distinguer la forme dominante de la forme récessive. Cependant, la réalité est plus complexe, car de récents rapports suggèrent qu'il existe un continuum phénotypique entre ces deux formes [67].

II.2.1.2. Déficit en pyruvoyl tétrahydroptérine synthase (PTPS)

La deuxième enzyme à intervenir dans la synthèse de la BH4 est le pyruvoyl tétrahydroptérine synthase (PTPS). Un déficit en PTPS induit un déficit en BH4 [9]. Il s'agit de la cause la plus fréquente de déficit en BH4 (environ 60% des cas) [68]. Les expressions phénotypiques de cette maladie sont entre autres une dystonie, des crises oculogyres, un retard mental, une hypotonie et une hyperphénylalaninémie. Tous ces syndromes apparaissent dès les premiers mois de vie (vers 2 mois) [69-70].

Dans le LCR, en cas de déficit en PTPS, la concentration dans le LCR du 5-HIAA, du HVA, du MHPG, de la BH2 et de la BH4 diminue, et la concentration en NH2 augmente [69-70].

II.2.1.3. Déficit en sépiaptérine réductase (SR)

La sépiaptérine réductase (SR) est la troisième et dernière principale enzyme utilisée pour synthétiser la BH4 [4,9,65]. Les personnes atteintes de déficit en SR souffrent essentiellement de retard psychomoteur, de spasticité, de dystonie, d'hypotonie, de microcéphalie, de crises oculogyres et d'hypersalivation. Les symptômes apparaissent dans l'enfance, durant les dix premières années de vie [4,9,65]. Par contre, les patients ne souffrent pas d'hyperphénylalaninémie car il existe d'autres enzymes qui peuvent produire de la BH4 quand il y a une carence en SR. Par exemple, l'aldose réductase, le carbonyle réductase et la DHFR peuvent transformer le 6-PTP en BH4 [71].

Dans le LCR, en cas de déficit en SR, on trouve une diminution de la 3-OMD, du 5-OHT, du 5-HIAA, de l'HVA, du MHPG et de la BH4, et une augmentation de la BH2 et de la NH2 [71-72].

II.2.1.4. Déficit en ptérine carbinolamine déhydratase (PCD)

La ptérine carbinolamine déhydratase (PCD) est la première enzyme à intervenir pour la régénération de la BH4 [4,9,65]. Une carence en PCD entraine peu, voire pas de symptômes chez les patients [73]. Les symptômes qui peuvent parfois apparaitre sont : une hypotonie passagère et un retard moteur. Les patients peuvent également souffrir d'hyperphénylalaninémie et de primaptérinurie, supposément responsables des troubles neurologiques.

Dans le LCR, en cas de déficit en PCD, le profil métabolique n'indique qu'une baisse de la BH4 et une hausse de la primaptérine [73].

II.2.1.5. Déficit en dihydroptéridine réductase (DHPR)

La dernière étape de la régénération de la BH4 se fait à partir de la dihydroptéridine réductase (DHPR). Un déficit en DHPR est dû à une mutation autosomique récessive qui affecte sévèrement le métabolisme de la BH4 [74]. Il s'agit de la deuxième cause la plus connue de déficit en BH4 (31% des cas dans le monde, mais 75% des cas en Turquie) [75]. Les principaux symptômes sont une hypertonie des membres, une dyskinésie, une dystonie, un retard psychomoteur, une microcéphalie, une hypersalivation et une hyperphénylalaninémie. Ces symptômes apparaissent durant la période néonatale ou la prime enfance [74-75].

Dans le LCR, en cas de déficit en DHPR, il y a une augmentation de la BH2 et une diminution de la 3-OMD, du 5-OHT, du 5-HIAA, du HVA, du MHPG et de la BH4 [74-75].

II.2.2. Traitements actuels

Un déficit en BH4 est dû à un déficit enzymatique de son métabolisme. À l'heure actuelle, pour rétablir le taux de BH4 à une valeur normale, il existe plusieurs solutions. Il est possible d'administrer du Kuvan (médicament qui contient de la BH4) au patient afin de corriger le déficit en BH4 [76]. Toutefois, la BH4 peut se dégrader en s'oxydant en BH2. D'après certaines études, il serait alors plus judicieux d'utiliser de la sépiaptérine qui, en présence de sépiaptérine réductase, peut former de la BH2 qui est elle-même convertie en BH4 sous l'action du dihydrofolate réductase [77].

Le mécanisme d'action de la BH4 dans l'organisme n'est pas encore totalement connu. Il reste certains points à élucider. Il n'est pas certain par exemple que la BH4 puisse traverser la barrière hémato-encéphalique.

II.3. Déficit cérébral en folates

Les folates ayant des structures diverses et variées, seuls les déficits en folate associés à une faible concentration en 5-MTHF dans le liquide céphalo-rachidien (LCR) seront recensés. Une baisse en 5-MTHF dans le LCR peut induire ou non une baisse en 5-MTHF dans le plasma. Dans les cas de déficit en 5-MTHF, une invariabilité de sa concentration dans le plasma est due à des syndromes auto-immuns [78] (les anticorps ont une grande affinité pour les récepteurs en folate). Ainsi, il est donc pertinent d'évaluer la concentration en 5-MTHF dans le LCR rapportée à sa concentration dans le plasma afin d'établir un diagnostic.

II.3.1. Symptômes et diagnostic

II.3.1.1. Déficit en récepteur au folate (FRα)

Le transport du 5-MTHF du sang vers le LCR au travers du plexus choroïde se fait à l'aide du récepteur FRα [79-80]. Un déficit en récepteur FRα entraine les symptômes suivants : un retard mental, des crises myocloniques, une ataxie et des épilepsies. Ces symptômes apparaissent dans la deuxième année de vie voire au-delà. L'apparition tardive des premiers symptômes pourrait s'expliquer par les récepteurs FRβ qui compenseraient durant la première année de vie le manque en récepteur FRα.

Dans le LCR, en cas de déficit en récepteur au folate FRα, la concentration en 5-MTHF baisse considérablement. Il en est de même pour le rapport des concentrations en 5-MTHF entre le LCR et le sang ($[5\text{-MTHF}]_{LCR}/[5\text{-MTHF}]_{plasma}$). Les amines biogènes restent à un niveau normal. Il y a parfois une baisse de la concentration en BH4.

II.3.1.2. Déficit en 5,10-Méthylènetétrahydrofolate (MTHFR)

Le 5,10-Méthylènetétrahydrofolate réductase (MTHFR) catalyse la réaction permettant la production du 5-MTHF à partir du 5,10-MéthylèneTHF. Un déficit en MTHFR entraine des symptômes pouvant apparaitre à tout âge (chez les enfants comme chez les adultes). Les symptômes sont essentiellement un déclin mental, des troubles cardiaques, une ataxie et une épilepsie avec myoclonie [81-84].

Dans le LCR, en cas de déficit en MTHFR, la concentration en 5-MTHF est faible, avec un rapport $[5\text{-MTHF}]_{LCR}/[5\text{-MTHF}]_{plasma}$ normal. Dans le plasma, on trouve une concentration plus élevée en homocystéine, associée à une faible concentration en méthionine [81-84].

II.3.1.3. Déficit en dihydrofolate réductase (DHFR)

Le dihydrofolate réductase (DHFR) est un enzyme qui réduit d'abord l'acide folique en dihydrofolate (DHF), puis le DHF en tétrahydrofolate (THF). L'acide folique étant la forme privilégiée d'apport nutritionnel en folate, un déficit en DHFR entraine un déséquilibre dans le métabolisme des folates. Les patients peuvent ainsi souffrir d'anémie mégaloblastique, de myoclonie des paupières, de retards psychomoteurs ou d'épilepsie [81,85-86]. Dans les cas les plus sévères, les symptômes apparaissent entre 2 et 6 mois. Dans les cas les moins graves, les symptômes apparaissent entre 5 et 11 ans.

En cas de déficit en DHFR, la concentration en 5-MTHF dans le LCR est abaissée. Le rapport

$[5\text{-MTHF}]_{LCR}/[5\text{-MTHF}]_{plasma}$ est par contre normal. Dans certains cas, les concentrations en BH4 et en amines biogènes sont abaissées [81,85].

II.3.1.4. Déficit en acide aminé décarboxylase (AADC) et en dihydroptéridine réductase (DHPR)

Bien qu'appartenant au métabolisme des ptérines ou des amines biogènes, des déficits en acide aminé décarboxylase (AADC) et en dihydroptérine réductase (DHPR) conduisent à une diminution en 5-MTHF dans le LCR.

Dans le cas des déficits en AADC, une baisse en 5-MTHF pourrait s'expliquer par l'accumulation en L-DOPA qui se transformerait excessivement en 3-OMD par l'intermédiaire de l'enzyme COMT et du cofacteur S adénosylméthionine (SAM). La concentration en SAM dans le LCR diminuerait, abaissant ainsi la concentration en 5-MTHF [86].

Dans le cas des déficits en DHPR, la qBH2 se réarrange en BH2 qui s'accumule. Par l'action du DHFR, la BH2 est réduite en BH4. La concentration en DHFR dans le LCR diminuerait, entrainant une baisse de la concentration en 5-MTHF [32].

II.3.2. Traitements actuels

Une carence en folates peut être palliée par une supplémentation en vitamine B9 [87]. Plus naturellement, il est possible de changer de mode d'alimentation en consommant des produits avec une forte teneur en acide folique (les légumes, les herbes aromatiques, le foie, le jaune d'œuf…) afin de rétablir la concentration en folates à la normale [88-89].

Une supplémentation en folate est utile pour traiter l'anémie [90] ou la dépression [91]. Elle peut être administrée durant la grossesse pour diminuer le risque de malformation cardiaque [92] ou de malformation du tube neural chez le fœtus [29].

II.4. Conclusion

La détermination du profil métabolique dans le LCR est indispensable car il est le seul fluide biologique à refléter l'activité du système nerveux central. De plus, le dosage dans un autre fluide biologique (urine, sang…) peut être biaisé par la situation médicale du patient (des tumeurs neuroendocrines [95] et des phéochromocytomes [96] peuvent augmenter la sécrétion du HVA et du 5-HIAA) ou par les habitudes alimentaires pouvant altérer la composition chimique de l'échantillon [97].

Le tableau 2.1 résume les profils biochimiques observés dans le LCR pour les déficits enzymatiques liés au métabolisme de la dopamine, de la sérotonine et de la BH4. [93,94].

Déficit enzymatique	Phe	BH4	BH2	NH2	PrimP	SepiaP	HVA	5-HIAA	HVA/5-HIAA	3-OMD	5-OHT	MHPG
GTP-CH dominant	n	↘	↘	↘	n	n	↘	↘	n	↘	↘	↘
GTP-CH récessif	↗	↘	↘	↘	n	n	↘	↘	n	↘	↘	↘
PTPS	↗	↘	↘	↗	n	n	↘	↘	n	n	n	↘
SR	n	↘	↗	n ou ↗	n	↗	↘	↘	n	↘	↘	↘
PCD	↗	↘	n	n	↗	n	n	n	n	n	n	n
DHPR	↗	↘	↗	n	n	n	↘	↘	n	↘	↘	↘
TH	n	n	n	n	n	n	↘	n	↘	n	n	↘
TPH	n	n	n	n	n	n	n	n	↘	n	↘	n
AADC	n	n	n	n	n	n	↘	↘	n	↗	↗	↘
PNPO	n	n	n	n	n	n	n ou ↘	n ou ↘	n	↗	↗	↘
COMT	n	n	n	n	n	n	↘	n	↘	↘	n	↘
DTDS	n	n	n	n	n	n	↗	n	↗	n	n	n

Tableau 2.1 : Profils biochimiques observés dans le LCR pour les déficits enzymatiques liés au métabolisme de la dopamine, de la sérotonine et de la BH4. Pour la phénylalanine (Phe), il s'agit d'observations dans le sang.

PrimP : Primaptérine, SepiaP : Sépiaptérine, n : normale, ↗ : augmentation, ↘ : diminution.

En établissant les profils biochimiques des patients présentant des symptômes de troubles neurologiques et en les comparant aux profils du tableau 2.1, il est possible de diagnostiquer leur déficit enzymatique. De cette manière, les patients peuvent recevoir un traitement médical approprié pour pallier les effets de l'enzyme déficitaire en rétablissant la concentration des neurotransmetteurs à leurs valeurs attendues. L'établissement de ces profils se fait par quantification des amines biogènes, des ptérines, des folates et de leurs métabolites en utilisant des méthodes de chimie analytique que nous développerons dans le chapitre III.

Chapitre III : Méthodes actuelles de quantification des amines biogènes, des ptérines et des folates

III.1. Méthodes actuelles de dosage des amines biogènes par chromatographie

Au cours de ces dernières décennies, de nombreux développements de méthodes de dosage des amines biogènes (dopamine, sérotonine et leurs métabolites) dans diverses matrices biologiques (organes, sang, urine…) ont vu le jour. Cette partie recense les différentes publications ayant pour but le dosage des métabolites de la dopamine et de la sérotonine, principalement le HVA et le 5-HIAA. Ces méthodes de dosage se basent principalement sur la chromatographie en phase liquide (LC) à polarité inversée de phases ou sur la chromatographie en phase gazeuse (GC).

III.1.1. Chromatographie en phase liquide avec détection électrochimique

Les amines biogènes étant électro-actives, il est possible de les quantifier à l'aide d'un détecteur électrochimique (ECD).

Ainsi, une des plus anciennes méthodes de dosage de la dopamine, sérotonine et de leurs métabolites en LC-ECD date de 1983 [98]. Cette méthode nécessitait deux analyses chromatographiques. La première analyse permettait de quantifier le HVA et l'acide vanylmandélique (métabolite de la dopamine) en 40 minutes et la seconde permettait de doser le 5-HIAA en 15 minutes. L'inconvénient de cette méthode est le temps total d'analyse trop important.

L'équipe de Candito M. *et al.* [99] a développé une méthode de dosage du 5-HIAA et du HVA en un temps d'analyse de 10 minutes. Bien qu'aucune limite de détection ou de quantification ne soient mentionnées, cette méthode a permis de doser le HVA et le 5-HIAA dans des échantillons urinaires dont la plus basse concentration mesurée était de 50 nM.

Des méthodes d'analyse du HVA et du 5-HIAA dans le LCR et dans des extraits de cerveau humain ont été également développées durant ces dernières années [100-102]. Toutes ces méthodes utilisent une détection électrochimique. L'utilisation d'agent d'appariement d'ions est également fréquente afin d'augmenter la rétention des composés les plus polaires sur les phases stationnaires de type C18. Les temps d'analyse varient entre 10 et 40 minutes, et les limites de détection peuvent atteindre 2 pM.

Ces travaux montrent que les méthodes utilisant la LC-ECD peuvent être rapides et sensibles pour doser les métabolites de la dopamine et de la sérotonine. Toutefois, elles manquent de spécificité. Elles nécessitent, en amont, une bonne séparation chromatographique.

III.1.2. Chromatographie en phase liquide avec détection par spectrométrie de masse

Une méthode de dosage du 5-HIAA et du HVA par LC couplée à la spectrométrie de masse en tandem (MS/MS) a été proposée en 2000 par Manini P. *et al.* [103]. Avec cette méthode, le temps d'analyse est de 10 minutes et la limite de détection du HVA et du 5-HIAA est de 150 nM dans des échantillons urinaires. Ces valeurs sont satisfaisantes pour quantifier ces métabolites dans l'urine.

En 2007, une méthode de quantification de la dopamine, de la sérotonine, du HVA et du 5-HIAA par LC-MS/MS a été développée par Tareke J. *et al.* [104]. Cette méthode a permis de quantifier ces composés dans des extraits de cerveau de rat. Les auteurs ont également comparé la LC-MS/MS et la LC-ECD. Ils ont constaté que les limites de détection du HVA et du 5-HIAA sont respectivement 13 fois et 4 fois plus faibles en LC-ECD qu'en LC-MS. La LC-ECD serait donc une technique beaucoup plus sensible que la LC-MS.

D'autres méthodes d'analyse par LC-MS/MS utilisant des phases stationnaires avec des greffons de type n-octadécyle ont été proposées pour doser les métabolites des catécholamines et des amines biogènes [105-110]. Ces méthodes appliquées à des échantillons d'urine ou des extraits de cerveau de rat présentent des temps d'analyse variant entre 5 et 30 minutes avec des limites de quantification comprises entre 20 et 60 nM pour le HVA et 6 à 60 nM pour le 5-HIAA.

Ces travaux montrent que les méthodes LC-MS/MS ont une durée d'analyse comparable à celle en LC-ECD. L'intérêt des analyses en LC-MS/MS repose sur leur spécificité. Toutefois, pour une quantification plus juste, elles nécessitent des étalons internes deutérés, ce qui engendre un surcout non négligeable par rapport aux autres méthodes.

III.1.3. Chromatographie en phase gazeuse avec détection par spectrométrie de masse

Le HVA et le 5-HIAA ont pu être quantifiés dans l'urine avec un couplage chromatographie en phase gazeuse-spectrométrie de masse (MS) afin de diagnostiquer certaines tumeurs telles que le neuroblastome [111-112]. D'après ces travaux, le temps d'analyse est de 10 minutes et la limite de détection est de 80 µM pour le HVA.

Récemment, une méthode employant une GC-MS/MS a été développée afin de doser des amines biogènes dans du tissu cérébral de souris [113]. Cette méthode requiert deux analyses différentes car elle dose les amines biogènes (dopamine, norépinephrine, épinéphrine, sérotonine et normétanéphrine) séparément de leurs métabolites (acide vanylmandélique, DOPAC, 5-HIAA, HVA et MHPG). Chaque analyse dure 12 minutes. Les limites de quantification sont assez basses : 3,7 nM

pour le 5-HIAA, 8,7 nM pour le HVA et 5,3 nM pour le MHPG. Les limites de cette méthode résident dans le fait qu'une étape de préparation d'échantillon relativement longue (passage sur une cartouche de type mixed cation exchange) est nécessaire en amont des deux étapes d'analyse par GC-MS/MS.

III.2. Méthodes actuelles de dosage des ptérines

Suite aux travaux réalisés dans notre laboratoire, notamment lors des travaux de thèse de Pierre Guibal, nous avons été invités par l'Editeur de la revue « *Pteridines* » à réidger une revue générale sur le dosage des pétrines dans le LCR. Ce papier, intitulé « Pterin détermination in cerebrospinal fluid: state of the art », a reçu depuis le prix du meilleur papier de la revue en 2017 (***Best Paper Award 2017***).

La méthode actuellement utilisée pour doser les différentes formes de ptérines à l'hôpital Trousseau est celle utilisant un chromatographe en phase liquide couplé à un détecteur de fluorescence après oxydation électrochimique post-colonne.

Article : État de l'art sur l'analyse des ptérines dans le liquide céphalo-rachidien

Pterins determination in cerebrospinal fluid: state of the art

Pierre Guibal[1], Aurélien LO[1], Philippe Maitre[2] and Fathi Moussa[1]

[1] Letiam, Lip(Sys)², EA7357, IUT d'Orsay, Université Paris Sud, Plateau de Moulon. 91400 Orsay, France.

[2] LCP, UMR 8000, Université Paris Sud, 15 rue Georges Clémenceau, 91400 Orsay.

Abstract

The analysis of pterins in the cerebrospinal fluid (CSF) is mandatory for the etiologic diagnosis of inborn errors of dopamine and serotonin metabolism. The success of the available therapeutic strategies for preventing the ongoing brain dysfunction is tightly dependent of the early diagnosis of these neurotransmitter disorders.

Previous methods of pterins determination in the CSF have in common at least one reversed phase HPLC step coupled to electrochemical or fluorescence detection (FD). They differ in the oxidation procedure of the reduced forms of pterins into their oxidized fluorescent counterparts. Most of methods using the FD include at least one offline chemical oxidation procedure and cannot allow the direct quantification of tetrahydrobiopterin (BH4). A recent method propose a single step simultaneous quantification of all forms of pterins including BH4 by HPLC coupled to FD or after post-column coulometric oxidation. Nowadays, recent advances in mass spectrometry, notably in term of sensitivity, allow the direct unambiguous determination of all forms of pterins in the CSF by LC-MS / MS.

Keywords: Biopterin, neopterin, cerebrospinal fluid, neurotransmitters, neurological disorders

List of abbreviations: Tetrahydrobiopterin (BH4), dihydrobiopterin (BH2), biopterin (B), dihydroneopterin (NH2), tetrahydroneopterin (NH4), High performance liquid chromatography (HPLC), fluorescence detection (FD), electrochemical detection (ECD)

Introduction

Nowadays, pterins determination in cerebrospinal fluid (CSF) is routinely used for the investigation of inborn errors of neurotransmitters metabolism [1- 3]. Inherited defects leading to neurotransmitter metabolism disorders have been described or predicted at the level of each enzyme involved in the synthesis of the neurotransmitters dopamine, (nor)epinephrine, and serotonin (Fig. 1) [2 - 4]. These disorders are caused by a defect in the metabolism of tetrahydrobiopterin (BH4), the co-factor for phenylalanine hydroxylase (PAH), tyrosine hydroxylase (TH), and tryptophan hydroxylase (TPH), or a defect at the level of tyrosine hydroxylase (TH) or aromatic amino-acid decarboxylase (AADC) (Fig. 1) [2 - 4]. Each of these conditions thus exhibits a characteristic cerebrospinal fluid (CSF) profile of pterins and of the precursors and metabolites of dopamine and serotonin (Table 1).

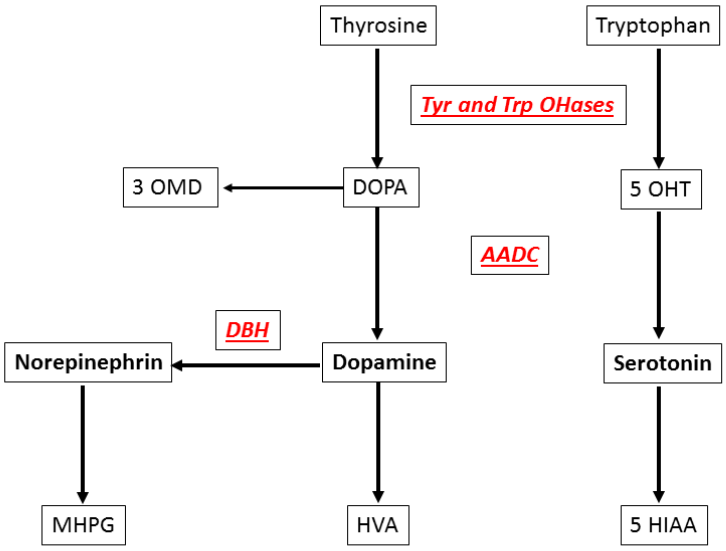


Figure 1: Neurotransmitter metabolism. Tyr and Trp OHases, Tyrosine and tryptophan hydroxylases; DBH, dopamine β-hydroxylase; AADC, amino-acid decarboxylase. HVA, homovanillic acid; 5-HIAA, 5-hydroxyindoleacetic acid; 3 OMD, 3 ortho-methyl DOPA; 5 OHT, 5-hydroxytryptophan; MHPG, 3-methoxy-4-hydroxyphenylglycol.

Table 1: Changes in CSF neurotransmitter metabolites and pterins in disorders of pterin metabolism according to Refs. (1-4).

Enzymatic defect	Phe	BH4	BH2	NH2	HVA	HIAA	HVA/HIAA	3-OMD	5-OHT	MHPG
GTPCH AR	↑	↓	N	↓	↓	↓	N	N	N	↓
PTPS	↑	↓	N	↑	↓	↓	N	N	N	↓
PCD	↑	↓	N	N	N	N	N	N	N	N
DHPR	↑	↓	↑	N	↓	↓	N	↓	↓	↓
GTPCH I AD	N	↓	↓/N	↓	↓	↓	N	N	N	↓
SR	N	↓	↑	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

Phe, Phenylalanine as determined in plasma; N, normal; GTPCH I AD, GTP-cyclohydrolase I deficiency autosomal dominant; GTPCH AR, autosomal recessive; PTPS, 6-pyruvoyl-tetrahydropterin synthase deficiency, SR, sepiapterin reductase deficiency; PCD, pterin-4α-carbinolamine dehydratase deficiency; DHPR, dihydropteridine reductase deficiency; TH, tyrosine hydroxylase deficiency; AADC, amino-acid decarboxylase deficiency; DTDS, dopamine transporter deficiency syndrome, (↓) decreased; (↑) increased.

Several enzymes are involved in BH4 synthesis from guanosine triphosphate (GTP) (Fig. 2). Mutations in GTP cyclohydrolase (GTPCH), 6-pyruvoyl-tetrahydropterin synthase (PTPS), sepiapterin reductase (SR), and dihydropteridine reductase (DHPR)) may lead to a defect in BH4 synthesis or regeneration (Table 1). Defects of BH4 are usually associated with hyperphenylalaninemia (HPA), but two BH4 deficiencies due to GTPCH-1 or SR defects, normally occur without HPA. The diagnosis of these conditions can be established through the analysis of neopterin (N) and biopterin in CSF [2 - 4].

Neurotransmitter disorders caused by a deficiency in AADC or TH are characterized by a normal CSF pterin pattern (Table 1). In the case of AADC deficiency, there is a strong reduction of CSF concentrations of homovanillic acid (HVA) and 5-hydroxy-indoleacetic acid (5-HIAA) with a concomitant increase of their precursors 3-ortho-methyl DOPA (3 OMD) and 5-hydorxy-tryptophan (5-OHT). As AADC is a pyridoxal 5'-phosphate dependent enzyme, the same CSF profile may be also observed in the case of vitamin B6 deficits or in the case of pyridox(am)ine-5’-phosphate oxidase (PNPO) deficiency. In the case of TH deficiency there is a reduced CSF concentration of homovanillic acid (HVA) and/or a reduced HVA/ 5HIAA ratio [2 - 4].

Some cases of an isolated decrease of 5-HIAA were also reported but without proof of tryptophan hydroxylase inherited disorder [2 - 4]. More recently, a dopamine transport deficiency

syndrome has been described. The involved mechanism affecting the dopamine transport to presynaptic neurons is linked to a defective reuptake leading to dopamine accumulation in the synapse as reflected by the increase of HVA concentration and HVA/5HIAA ratio in CSF [5].

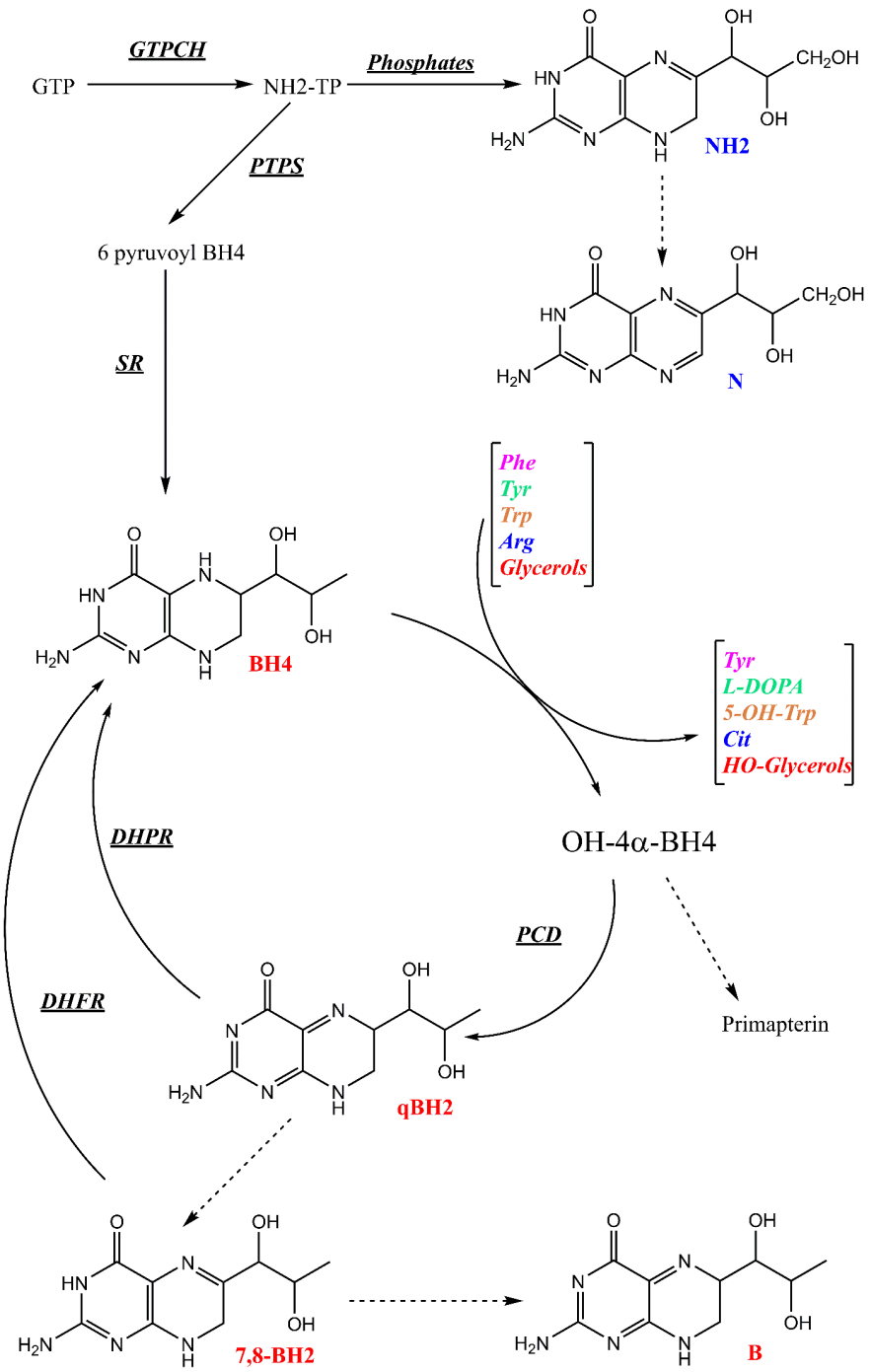


Figure 2: Tetrahydrobiopterin (BH_4) biosynthesis and regeneration (According to refs. 1-4, and 9). GTP (guanosine triphosphate); GTPCH (guanosine triphosphate cyclohydrolase); NH_2 (dihydroneopterin); N (neopterin); PTPS (6-pyruvoyl-tetrahydropterin synthase); SR (sepiapterin reductase); PCD (pterin-4α-carbinolamine dehydratase); DHPR (dihydropteridin reductase); BH_2 (dihydrobiopterin); DHFR (dihydrofolate reductase); B (biopterin). (Dashed arrows: non-enzymatic).

Early diagnosis of neurotransmitter disorders is of importance notably because some of these diseases can be well treated [6]. The correct diagnosis of these conditions can be achieved through the analysis of HVA, 5-HIAA, 3-OMD, 5-OHT, neopterin, and biopterin in the CSF (Table 1). However, while the analysis of neurotransmitter metabolites can be easily achieved by liquid chromatography coupled to electrochemical detection (ECD) [7] or to mass spectrometry (MS) [8] most of available analytical methods of pterins in CSF cannot allow direct quantification of BH4 [9]. This review will focus on the methods and advances for monitoring pterins in CSF. Current analytical methods are mostly based on earlier BH4 oxidation investigations [10 - 13]. They have in common at least one chromatographic separation step. But they differ in the used detection mode and their ability to directly analyze native BH4. Subsequently, LC MS/MS techniques have been developed that have sufficient sensitivity to quantitate the various pterin species that have been identified in CSF.

After a brief description of the earlier studies on the oxidation of BH4, we will further review the current methods of pterins determination in CSF.

Earlier studies on BH4 oxidation

Since the elucidation of its pivotal role in the hydroxylation reactions of living organisms [10], several studies using liquid chromatography coupled to UV-Visible spectroscopy or to fluorescence detection (FD) [11-13], have been devoted to the elucidation of the mechanisms of oxidation of BH4.

Earlier studies concluded that a large portion of biopterin (B) in tissues and fluids appears to be present in labile reduced forms [11]. As B in its fully oxidized form is stable and has strong fluorescent properties, a selective preliminary oxidation of the biological sample has been considered for pterin analysis. Since, the effects of iodine oxidation on reduced forms of B have been further analyzed by using high performance liquid chromatography (HPLC) [11]. One year later, the electrochemical behavior of BH4 has been extensively studied on pyrolytic graphite and it has been found that oxidation and reduction consisted of two-electron processes [14]. This led to the development of techniques that use electrochemical detection for the analysis of reduced pterins in biological materials [15].

Based on the data of these earlier investigations, several chromatographic methods coupled to FD or electrochemical detection (ECD) have been proposed for pterin analysis in CSF. The chromatographic behavior of pterins present in CSF is well known. Their separation can be easily achieved by reversed phase or HILIC modes (Fig. 3) [8, 9, 12, 15, 16].

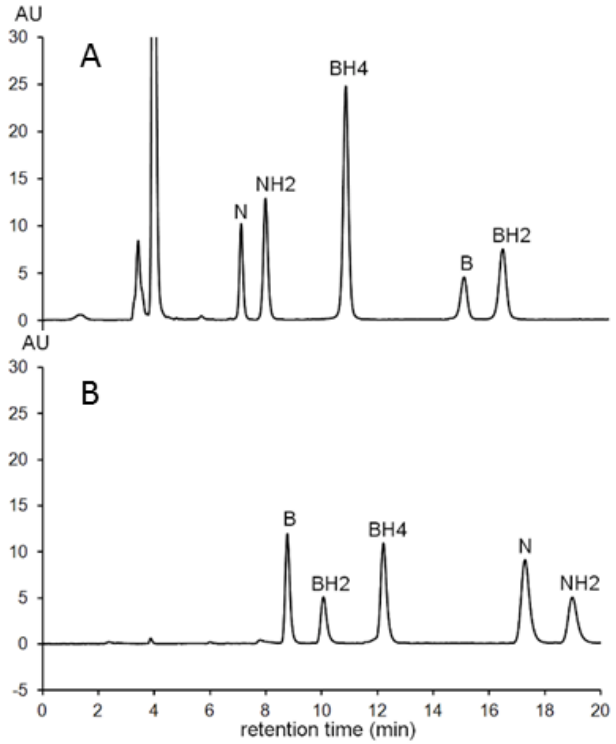


Figure 3: Pterins chromatographic profile as a function of the separation mode (A) Atlantis dC18; mobile phase: pH 7.4, 0.05 M sodium citrate/methanol (97/3, v/v). (B) Zic-HILIC; Mobile phase: pH 7.4, 0.2 M ammonium formiate/acetonitrile (20/80, v/v). (A – D) Flow rate: 0.6 ml/min at 30°C. Detection 260 nm [*Cf.* ref. 9 for more details].

Current HPLC methods can be primarily classified as a function of the detection mode. Alternatively, as these methods differ in the sample preparation procedure and the targeted forms of pterins, they can be also classified as direct or indirect methods.

HPLC–FD methods

The first method of pterin determination in CSF has been proposed in 1980 [11]. As oxidized pterins are fluorescent while their reduced counterparts are not, the separation and the quantification of pterins in biological fluids required two HPLC-FD runs including two off-line chemical oxidation procedures for complete analysis [11]. According to the authors, using 0.1% iodine in 0.1 N HCI, 7,8-BH2 and BH4 were shown to be oxidized to B. Hence, the quantification of B after oxidation under acidic conditions will reflect the sum of the concentrations of BH4 and BH2. Under alkaline conditions (0.1 N NaOH), however, the iodine oxidation results in 90% conversion of BH2 to B and 80% conversion of BH4 to pterin (P). After 60 min of incubation the acidic or alkaline mixture is neutralized with NaOH or HCl and excess iodine was reduced by the addition of 1% ascorbic acid solution before injection into the chromatograph [11]. After iodine oxidation in 0.1 N HCl,

dihydroneopterin (NH2) and tetrahydroneopterin (NH4) were recovered as neopterin (N) almost quantitatively (90% or more) [11]. After oxidation in 0.1 N NaOH, only a trace of NH4 was recovered as N and 80% of the NH4 was converted to pterin, whereas about 50% of NH2 was recovered as N.

The authors concluded that iodine oxidation of reduced forms of N shows the same pattern as that observed with reduced B with the exception that NH4 appears to be more labile to alkaline oxidation than BH4 [11].

Pterins in CSF are present in the low nmo/l range. The first HPLC run of the original method [11] thus involves the separation of the oxidation products obtained under acidic conditions whilst the second one is devoted to the separation of the oxidation products obtained under alkaline conditions. Although the oxidation of BH4 and NH2 under alkaline conditions cannot allow their specific quantification, and although very time-consuming, this indirect chemical oxidation method has been widely used since 1980, notably because it has appropriate sensitivity [17 – 20].

Methods utilizing post-column chemical or photochemical oxidation procedures [21 – 23] were developed later but sensitivity was low likely due to the high post column void volumes.

In 1992, a simplified oxidation procedure using manganese dioxide under acidic conditions was established to diminish the pre-analysis preparation time for CSF analysis [24, 25]. As the oxidation products N and B obtained under acidic conditions are sufficient to establish the correct diagnosis of neurotransmitter disorders (Table 1) some authors proposed a single-step oxidation of NH2, BH4 and BH2 into N and B (BH4 + BH2), respectively, by using manganese dioxide (MnO2) under acidic conditions [24, 25]. Samples (200 µl) were mixed with (1 mg of MnO2) and 20 µl of 1 M HCl. After shaking during 10 min at room temperature and centrifuged at 12,000 x *g* before injection of the clear supernatant into the chromatograph [25]. Although faster than the iodine oxidation method, this method obviously does not allow distinguishing BH4 from BH2. Besides, more recently, some authors compared the two proposed chemical oxidation procedures iodine vs MnO2, and they concluded that the oxidation with iodine results in the most accurate determination of N and B in CSF [24]. However, it is now well established that chemical oxidation methods are to underestimate amounts of reduced forms of N and B [9, 27].

Apart from the diagnosis of neurotransmitter metabolism disorders, direct quantification of BH4, BH2, and NH2 is essential for studying BH4 metabolism (Figure 1) as well as for pharmacokinetic studies or monitoring the efficacy of BH4 supplementation in patients with BH4 deficiency [21, 28]. For instance, two recent papers raised doubts about the ability of BH4 at usual doses (20 or 40 mg/kg/day) to cross the blood brain barrier in patients with genetic BH4 recycling disorder [29, 30].

Hence, direct methods for the measurement of reduced pterins in CSF are required. For this

purpose, as pterins are electroactive compounds, it is preferable to separate the reduced forms and to use an online electro-oxidation method before fluorescence detection.

HPLC-ECD-FD methods

In 1985, sequential ECD and FD were proposed for the simultaneous quantification of BH4, BH2, and NH2 in CSF [15].Using a mobile phase with a pH adjusted to 5.2 in a reverse phase mode, BH4 is detected electrochemically in the redox mode, while BH2 and NH2 were detected by FD after post-column coulometric oxidation (PCCO-FD) into B and N, respectively. However, due to the large number of electroactive compounds in CSF, the specific detection of BH4 in the redox mode may be questioned. As ECD is less robust and less sensitive than FD for routine analyses, it may be wondered why the authors did not detect BH4 by FD after coulometric oxidation as for they did for BH2 and NH2 [15].

Recently, the effects of pH on the separation and the electro-oxidation of the targeted pterins have been extensively studied [9]. The authors observed that high oxidation yields (≥ 50%) of BH2 and NH2 can be obtained irrespective of the pH range between pH 3 and pH 8. For BH4, however, a sufficient yield (about 50%) only occurs at pH higher than 7.4. At pH less than 6 the BH4 oxidation yield is about 20% and then it decreases to become negligible at pH equal to or less than 4. Hence the low oxidation yield of BH4 at pH less than 6.0 could explain why BH4 was not detected in the original publication using ECD followed by fluorescence detection. This work allowed the authors to propose an HPLC method able to simultaneously analyze all forms of pterins including BH4, BH2, B and NH2 by FD after post-column coulometric oxidation (Fig. 4) [9]. The results obtained in 99 patients who did not suffer from any known inborn error of metabolism showed that pterin concentrations in CSF vary from 7.6 to 76 nM (Median, 32 nM), 3.1 to 17.6 nM (Median, 9.5 nM), and 3.9 to 47.3 nM (Median, 13.5 nM) for BH4, BH2, and NH2, respectively [9].

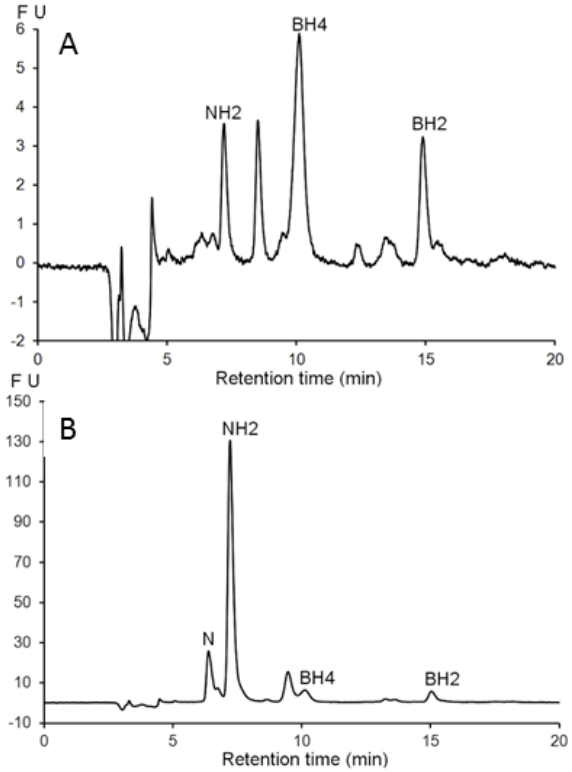


Figure 4: Chromatographic profiles of (A) a normal CSF sample and (B) a CSF sample with elevated NH2 level, according to ref. [9]. Obtained under the same conditions as for Fig. 2 A with Fluorescence detection after post-column oxidation at + 600 mV. Unknown peaks are unlabeled.

HPLC-MS methods

Since 2009, liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry was used to detect N and B in plasma [32], as well as for the simultaneous detection of BH4, BH2, and B in urine samples, cell extracts, and rat brains [33 - 36]. However, according to the authors, MS/MS detection is less sensitive than FD for pterin quantification [33].

Nowadays, recent developments of MS technology in term of sensitivity allow the determination of compounds present in the low nmo/l range in biological media. As a matter of fact, an LC-MS/MS method has been recently implemented for determination of pterins in CSF (37]. The main compounds that have been identified in CSF include neopterin, dihydroneopterin, dihydroxanthopterin, tetrahydrobiopterin, biopterin, 7-8-dihydrobiopterin and sepiapterin. The latter is a yellow fluorescing pterin and is not normally measured but techniques have been described that allow its measurement to aid in the diagnosis of sepiapterin reductase deficiency [37]. The linearity of the method covers a working range of 3 to 200 nmol/L with a total analytical imprecision less than 14.4% for all pterin metabolites [37].

Parameters affecting the CSF concentration of pterins

As pterins are present in labile reduced forms in CSF, it is mandatory to control the technical and biochemical factors that can affect their concentrations, in order to ensure the robustness of the used analytical method and a correct diagnosis.

In order to prevent the auto-oxidation and the oxidation catalyzed by metal ions of BH4 before and during the chromatographic analysis, some authors proposed to add to the sample 1 mg/ml of dithioerythritol (DTE), a thiol reagent, and 1 mg/ml of diethylenetriaminepentaacetic acid (DETAPAC), a chelating agent [15, 37]. According to the authors, these additives protected BH4 for at least 5 h at 4°C and for at least one month at -70°C. In order to avoid any BH4 oxidation during the chromatographic step, the authors also propose to add 0.16 mM of DTE to the mobile phase [29].

Recently, the technical and biochemical factors that can affect pterin concentrations in the CSF have been extensively investigated [26]. According to the authors, N and B concentrations are not affected by the ventriculo-spinal gradient and pretreatment of CSF. Also, the pretreatment of the sample with trichloro-acetic-acid and DTE before oxidation with iodine results in the most accurate determination of N and B [26]. However, by using the methodology of iodine oxidation the autors only looked at total biopterin and neopterin and did not investigate the stability of BH4, BH2 or NH2. Under these conditions it is likely that the reduced pterin auto-oxidized to oxidized forms during sample handling.

More recently, the stability of the CSF samples at 10 °C in the dark in the injector was checked after several hours [9]. According to the authors, they did not observe significant differences after 6 h. However, after 8 h, NH2 and BH4 concentrations decreased between 4% and 31% of their initial values. Thus, they concluded that under their conditions, samples should be analyzed not more than 6 h [9]. The authors also checked the stability of pterins in CSF samples frozen at −80 °C immediately after collection. As compared with the initial values determined at day 7 after collection they did not observe significant differences after 24 months of storage. Hence, they avoided adding a preservative agent to the samples thus facilitating the collection procedure.

Conclusion

Current methods of pterin determination in CSF can be classified in two categories, those using an offline oxidation procedure of the reduced pterins and those using a post-column electrochemical oxidation. The former are indirect methods because they cannot allow the direct quantification of the reduced forms while the latter are direct methods as they do measure the concentrations of BH4, BH2, and NH2.

Although sufficient to establish the correct diagnosis of neurotransmitter disorders (Table 1), and although many remarkable advances in biomedical research have been made on basis of indirect

measurements, the indirect methods of BH4 determination may present some drawbacks. They underestimate the reduced forms of pterins, they are very time consuming, and they are difficult to automate.

In contrast, direct methods are simple, rapid, and easy to automate. Besides, as they can measure BH4 concentrations they can be used for pharmacokinetic studies and for monitoring BH4 supplementations in patients with BH4 deficiency. Direct quantification of BH4 is also essential for studying the metabolism of this cofactor. To all these purposes, the recent LC-MS/MS method, which provides a more comprehensive evaluation of the pterin pathway, offers a significant improvement. At present the LC-MS/MS method should be considered as the only possible reference method.

References

[1] Hyland K. Clinical utility of monoamine neurotransmitter metabolite analysis in cerebrospinal fluid. *Clinical chemistry*. 2008;*54*(4):633-41.

[2] Longo N. Disorders of biopterin metabolism. J Inherit Metab Dis. 2009;32:333-342.

[3] Werner ER, Blau N, Thöny B. Tetrahydrobiopterin: biochemistry and pathophysiology. Biochemical Journal. 2011;438(3):397-414**.**

[4] Kurian MA, Gissen P, Smith M, Heales S, Clayton PT (2011). The monoamine neurotransmitter disorders: an expanding range of neurological syndromes. Lancet neurology. 2011.10(8):721-33.

[5] Kurian MA, Li Y, Zhen J, Meyer E, Hai N, Christen HJ, Hoffmann GF, et al. Clinical and molecular characterisation of hereditary dopamine transporter deficiency syndrome: an observational cohort and experimental study. Lancet neurology. 2011;10(1):54-62.

[6] Allen GFG, Land JM, Heales SJR. A new perspective on the treatment of aromatic L-amino acid decarboxylase deficiency. Molecular genetics and metabolism. 2009;97(1):6-14.

[7] Hyland K, Surtees RA, Heales SJ. Bowron A, Howells DW, Smith I. Cerebrospinal fluid concentrations of pterins and metabolites of serotonin and dopamine in a pediatric reference population. Pediatric research. 1993;34(1):10-4.

[8] Manini P, Andreoli R, Cavazzini S, Bergamaschi E, Mutti A, Niessen WM. Liquid chromatography-electrospray tandem mass spectrometry of acidic monoamine metabolites. J Chromatogr B: Biomed Sci Appl. 2000;744(2):423-31.

[9] Guibal P, Le N, Doummar D, Giraud N, Roze E, Rodriguez D, Couderc R, et al. Simultaneous Determination of All Forms of Biopterin and Neopterin in Cerebrospinal Fluid. ACS Chemical Neuroscience. 2014;5:533−41.

[10] Kaufman S. The structure of the phenylalanine-hydroxylation cofactor. PNAS. 1963;50:1085-93.

[11] Fukushima T, Nixon JC. Analysis of Reduced Forms of Biopterin in Biological Tissues and Fluids Anal Biochem. 1980;102:176-188.

[12] Haavik J, Flatmark T. Isolation and characterization of quinonoid dihydropterins by highperformance liquid chromatography. J Chromatogr. 1983;251:361-72.

[13] Davis MD, Kaufman S, Milstien S. The auto-oxidation of tetrahydrobiopterin. Eur J Biochem. 1988;173:345-51.

[14] Raghavan R, Dryhurst G. Redox chemistry of the reduced pterin species. J Electroanal Chem. 1981;129:189-212.

[15] Hyland K. Estimation of tetrahydro, dihydro and fully oxidised pterins by high-performance liquid chromatography using sequential electrochemical and fluorometric detection. J Chromatogr Biomed Appl. 1985;343:35-41.

[16] Xiong X, Liu Y. Chromatographic behavior of 12 polar pteridines in hydrophilic interaction chromatography using five different HILIC columns coupled with tandem mass spectrometry. Talanta. 2016 ;150:493–502.

[17] Suzuki K, Owada M. A simple and sensitive method for the determination of pterins in cerebrospinal

fluid. Clinical usefulness for management of tetrahydrobiopterin deficiency. J Inherited Metab Dis. 1991;14:825-30.

[18] Werner ER, Werner-Felmayer G, Wachter H. High-performance liquid chromatographic methods for the quantification of tetrahydrobiopterin biosynthetic enzymes. J Chromatogr B: Biomed Sci Appl. 1996;684:51-8.

[19] Komori H, Matsuishi T, Yamada S, Ueda N, Yamashita Y, Kato H. Effect of age on cerebrospinal fluid levels of metabolites of biopterin and biogenic amines. Acta Paediatr. 1999;88:1344-7.

[20] Fiege B, Ballhausen D, Kierat L, Leimbacher W, Goriounov D, Schircks B, et al. Plasma tetrahydrobiopterin and its pharmacokinetic following oral administration. Mol Genet Metab. 2004;81:45-51.

[21] Tani Y, Ohno T. Analysis of 6R- and 6Stetrahydrobiopterin and other pterins by reversedphase ion-pair liquid-chromatography with fluorimetric detection by post-column sodium nitrite oxidation. J Chromatogr. 1993;617:249-55.

[22] Tani Y, Kanai T. Decrease in 6R-5,6,7,8-tetrahydrobiopterin content in cerebrospinal fluid of autistic patients. Neurosci Lett. 1994;181:169-72.

[23] Espinosa-Mansilla A, Munoz de la Pena A, Canada-Canada F, Mancha de Llanos A. LC determination of biopterin reduced forms by UV-photogeneration of biopterin and fluorimetric detection. Talanta 2008;77:844-51.

[24] Blau N, Kierat L, Heizmann CW, Endres W, Giudici T, Wang M. Screening for tetrahydrobiopterin deficiency in newborns using dried urine on filter paper. J Inherit Metab Dis. 1992;15:402-4.

[25] Ormazabal A, García-Cazorla A, Fernández Y, Fernández-Alvarez E, Campistol J, Artuch R. HPLC with electrochemical and fluorescence detection procedures for the diagnosis of inborn errors of biogenic amines and pterins. Journal of neuroscience methods. 2005;142(1):153-8.

[26] Verbeek MM, Blom AM, Wevers RA, Lagerwerf AJ, van de Geer J, Willemsen MAAP. Technical and biochemical factors affecting cerebrospinal fluid 5-MTHF, biopterin and neopterin concentrations. Molecular genetics and metabolism. 2008;95(3):127-32.

[27] Hyland K. Estimation of tetrahydro, dihydro and fully oxidised pterins by high-performance liquid chromatography using sequential electrochemical and fluorometric detection. J Chromatogr Biomed Appl. 1985;343:35-41.

[28] Cerone R, Schiaffino MC, Fantasia AR, Perfumo, M, Birk Moller L, Blau N. Long-term follow-up of a patient with mild tetrahydrobiopterin-responsive phenylketonuria. Mol Genet Metab. 2004;81:137-9.

[29] Leu-Semenescu S, Arnulf I, Decaix C, Moussa F, Clot F, Boniol C, et al. Sleep and Rhythm Consequences of a Genetically Induced Loss of Serotonin. Sleep. 2010;33:307-14.

[30] Coughlin CR, Hyland K, Randall R, Ficicioglu C. Dihydropteridine reductase deficiency and treatment with tetrahydrobiopterin: a case report. J Inherited Metab Dis Rep. 2012;202:53-6.

[31] Howells DW, Smith I, Hyland K. Estimation of tetrahydrobiopterin and other pterins in cerebrospinal fluid using reversed-phase high-performance liquid chromatography with electrochemical and

fluorescence detection. J Chromatogr Biomed Appl. 1986;381:285-94.

[32] Zhao Y, Cao J, Chen YS, Zhu Y, Patrick C, Chien B, et al. (2009) Detection of tetrahydrobiopterin by LC−MS/MS in plasma from multiple species. Bioanalysis. 2009;1:895-903.

[33] Giron J, Martın-Tornero E, Hurtado Sanchez MC, Duran Meras I, Espinosa Mansilla A. A simple HPLC-ESI-MS method for the direct determination of ten pteridinic biomarkers inhuman urine A. Talanta. 2012;101:465-72.

[34] Kim HR, Kim TH, Hong SH, Kim HG. Direct detection of tetrahydrobiopterin (BH4) and dopamine in rat brain using liquid chromatography coupled electrospray tandem mass spectrometry. Biochemical and Biophysical Research Communications. 2012;419:632-7.

[35] Fismen L, Eide T, Djurhuus R, Svardal AM. Simultaneous quantification of tetrahydrobiopterin, dihydrobiopterin, and biopterin by liquid chromatography coupled electrospray tandem mass spectrometry. Analytical Biochemistry. 2012;430:163-70.

[36] Yang BC, Liu FY, Guo JB, Wan L, Wu J, Wang F, et al. Rapid assay of neopterin and biopterin in urine by wooden-tip electrospray ionization mass spectrometry. Anal Methods. 2015 ;7:2913-6.

[37] Arning E, Bottiglieri T. Erratum to: LC-MS/MS analysis of Cerebrospinal Fluid Metabolites in the Pterin Biosynthetic Pathway**.** JIMD Reports, 2014;29: 1-9. An *erratum to* this chapter can be found athttp://dx.*doi*.org/10.1007/8904_2014_372.

III.3. Méthodes actuelles de dosage du 5-MTHF par chromatographie en phase liquide

Les folates font l'objet de développements analytiques principalement dans les matrices alimentaires (bière, pain…) et biologiques (sérum, plasma, LCR). Cette partie traite des différentes méthodes de dosage des folates, et particulièrement du 5-MTHF, existantes à ce jour. La plupart des méthodes rapportées utilisent la chromatographie en phase liquide à polarité inversée de phases.

III.3.1. Détection par spectroscopie ultra-violet

Comme les folates ont des groupements chromophores, certains auteurs proposent des méthodes pour les doser qui utilisent une détection par spectroscopie ultra-violet (UV) [114-115]. Dans la publication de Lucock, MD *et al*. (1995) [114], il n'est pas possible de quantifier le 5-MTHF mais d'autres folates avec une limite de quantification de 1,7 ng. La publication de Poo-Rieto, R. *et al.* (2011) [116], propose une méthode d'analyse de plusieurs folates dans la bière. Toutefois, avec la méthode proposée, il est difficile de séparer tous les folates sans co-élution. De plus, il y a beaucoup d'interférences dues à la matrice.

D'après ces travaux, doser les folates en LC-UV est possible. Cependant, ce n'est pas la méthode la plus adaptée, au vu de sa faible spécificité.

III.3.2. Détection électrochimique

Les dérivés de l'acide folique sont électroactifs. Ils peuvent être détectés par électrochimie (ECD) [114, 116-117].

Avec une méthode en LC-ECD, il est possible de doser le 5-MTHF, le tétrahydrofolate (THF) et le 5-formyltétrahydrofolate (5-FTHF) dans le plasma et le sérum [115-116]. Toutefois, les potentiels d'oxydation nécessaires sont relativement élevés, ce qui génère de nombreuses interférences [114]. Par ailleurs, l'étape de traitement de l'échantillon par extraction sur phase solide qui y est associée est chronophage.

III.3.3. Détection par spectrométrie de masse

La chromatographie liquide (LC) couplée à la spectrométrie de masse (MS) est une méthode d'analyse qui a permis d'établir des profils de distribution des différentes formes de folates dans des

matrices biologiques et alimentaires [118-129].

À l'heure actuelle, l'utilisation de la spectrométrie de masse en tandem (MS/MS) au moyen d'un triple quadripôle est répandue car les limites de détection et de quantification atteintes en LC-MS/MS sont dix fois plus faibles qu'avec une LC-MS classique [118-119].

De nombreuses méthodes existent pour doser au moins le 5-MTHF dans le sérum [120], le sang [121-124], les tissus tumoraux [125-126] et les matrices alimentaires [127-129]. Les phases stationnaires utilisées sont de type C8 ou C18. Les analyses s'effectuent en mode gradient et en moins de 9 minutes. Les phases mobiles sont constituées d'un tampon acétate ou formiate et d'une phase organique souvent composée d'acétonitrile (et parfois de méthanol). Les limites de quantification et de détection sont très souvent inférieures à 3 nM dans les fluides biologiques. Pour certaines méthodes, le traitement de l'échantillon nécessite une extraction sur phase solide (SPE) [121-122, 125, 127-128], ce qui est chronophage.

III.3.4. Détection par fluorescence

Actuellement, à l'hôpital Trousseau, le 5-MTHF est dosé à l'aide de l'UHPLC couplée à un détecteur de fluorescence [130,131]. La séparation des composés est menée sur une colonne Acquity BEH C18 (2,1 x 50 mm, 1,7 µm). Le 5-MTHF est élué par une phase mobile composée de 94% d'une solution aqueuse de phosphate (0,05 M à pH 2,7) et 6% d'acétonitrile. Le 5-MTHF est dosé par fluorescence, en fixant les longueurs d'excitation et d'émission respectivement à 295 nm et 355 nm. Le temps d'analyse est de 2 minutes et la limite de quantification est de 10 nM. Cette méthode de dosage a pu être développée à l'hôpital Trousseau grâce à des études antérieures impliquant notre équipe de recherche [132-133]. Les méthodes antérieures développées pour doser le 5-MTHF dans les matrices biologiques (sang et LCR) avaient des temps d'analyse compris entre 10 et 16 minutes et les limites de détection de l'ordre de 10 nM. Ces méthodes nécessitaient également une étape d'extraction sur phase solide en amont.

III.4 Conclusion

Les méthodes actuelles d'exploration des déficits enzymatiques liés au métabolisme de la dopamine, de la sérotonine, des ptérines, des folates sont basées sur des méthodes chromatographiques de dosage spécifique d'un seul ou d'une seule famille de métabolites. De plus, ces méthodes sont, le plus souvent, longues et fastidieuses surtout du fait des protocoles de

préparation de l'échantillon en amont.

Le développement de méthodes de quantification plus simples, plus rapides voire simultanée des amines biogènes, des ptérines, des folates et de leurs métabolites est primordial pour simplifier et raccourcir le délai du diagnostic de ces déficits.

Un travail de thèse débuté depuis quelques années dans notre laboratoire a abouti au développement d'une méthode de dosage simultané de toutes les ptérines d'intérêt diagnostic présentes dans le LCR, par LC couplée à la détection fluorimétrique après oxydation électrochimique post-colonne [réf]. Dans la continuité, afin de simplifier le diagnostic des déficits dopaminergique et sérotoninergique, des développements ont été entrepris.

Nous présenterons donc dans la partie suivante les travaux liés à :

- L'exploration du mécanisme d'auto-oxydation de la tétrahydrobioptérine (BH4), par une combinaison de spectrométrie de masse tandem, mobilité ionique différentielle et photodissociation activée par un laser accordable infrarouge.
- La validation d'une méthode de dosage simultané des métabolites de la dopamine et de la sérotonine ainsi que des ptérines impliquées dans leur synthèse, par HPLC couplée à une détection séquentielle par électrochimie (ECD) et fluorescence (FD)
- La transposition de la méthode par HPLC-ECD-FD en UHPLC-ECD-FD, puis en UHPLC-MS/MS, grâce à l'acquisition plus récente d'un triple quadripôle.

PARTIE 2 :

Travaux expérimentaux liés au dosage des ptérines, du 5-MTHF, de la dopamine, de la sérotonine et de leurs métabolites dans le liquide céphalorachidien.

Chapitre IV : Mécanisme d'oxydation de la tétrahydrobioptérine

IV.1. Introduction

Lors de ses travaux de thèse réalisés dans notre laboratoire, Pierre GUIBAL a proposé de doser simultanément toutes les formes de ptérines en une seule étape [131]. Sachant que les métabolites des ptérines sont oxydables et que les ptérines ne sont fluorescentes qu'à l'état l'oxydé, une méthode de dosage a été développée afin de doser les ptérines. Cette méthode utilise la chromatographie en phase liquide (LC) couplée à la détection fluorimétrique (FD) après oxydation électrochimique (ECD) post-colonne. Avec cette méthode, la néoptérine (N), la dihydronéoptérine (NH2), la bioptéine (B), la dihydrobioptérine (BH2) et la tétrahydrobioptérine (BH4) sont séparées et dosées en moins de 16 minutes.

Cependant, cette méthode LC-ECD-FD a soulevé deux questions :

— 1. l'oxydation des ptérines dépend du pH ;

— 2. le rendement d'oxydation de la BH4 au pH optimal (pH 7,4) reste faible, à savoir inférieur à 45% (voir figure 5.1).

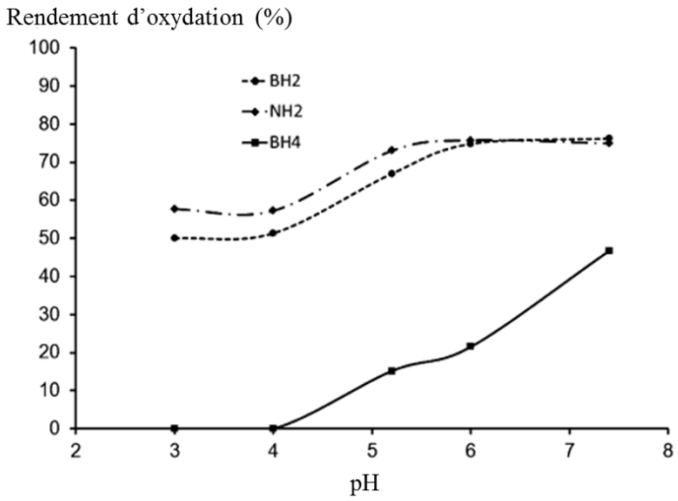


Figure 5.1 : Détection fluorescente après oxydation électrochimique à +400 mV de la NH2, BH2 et BH4. (figure extraite de [131])

Nous avons donc émis l'hypothèse de l'existence d'un intermédiaire réactionnel non électro-oxydable qui apparait lors de l'oxydation de la BH4 en BH2. Cet intermédiaire est probablement la qBH2, qui est la forme quinonoïde de la BH2. L'hypothèse de son existence a été formulée depuis la découverte de la BH4 mais elle n'a jamais été isolée à notre connaissance. Cet isomère serait en effet instable et se tautomériserait rapidement en 7,8-BH2 (Figure 1.6). Pour vérifier cette hypothèse, il a fallu déterminer le mécanisme d'électro-oxydation de la BH4. Mais, comme la BH4 est instable en présence d'oxygène, nous avons d'abord étudié son auto-oxydation.

Pour étudier le mécanisme d'auto et d'électro-oxydation de la BH4, nous avons d'abord isolé et caractérisé la qBH2 par mobilité ionique, puis réalisé des expériences en spectrométrie de masse haute résolution et en voltammétrie cyclique, en collaboration avec le Laboratoire de Chimie Physique (LCP) et l'Équipe de Recherche et d'Innovation en Électrochimie pour l'Énergie (ERIEE) de l'Institut de Chimie Moléculaire et des Matériaux d'Orsay (ICMMO) de l'université de Paris-Sud.

Ces travaux sont présentés dans ce chapitre sous forme d'un article prêt à soumettre.

IV.2. Oxydation à l'air libre (ou auto-oxydation) de la tétrahydrobioptérine (article)

Article soumis : Mise en évidence et caractérisation structurale de deux formes tautomères de la dihydrobioptérine durant l'oxydation de la tétrahydrobioptérine.

Evidence and Structural characterization of two dihydrobiopterin tautomers as oxidation intermediates of tetrahydrobiopterin

Aurélien LO[1], Philippe Maitre[2], Vincent Steinmetz[2] and Fathi Moussa[1]

[1] Letiam, Lip(Sys)², EA7357, IUT d'Orsay, Université Paris Sud, Plateau de Moulon. 91400 Orsay, France.

[2] LCP, UMR 8000, Université Paris Sud, 15 rue Georges Clémenceau, 91400 Orsay.

Abstract

In mammalians, tetrahydrobiopterin (BH4) is the cofactor of several important enzymatic hydroxylation reactions. More than fifty years after the discovery of its physiological function, the structure of the primary oxidation product qBH2 involved in both the mechanism of action and the regeneration of BH4 has never been characterized with appropriate analytical tools. Only conventional chromatography and UV-Visible spectroscopy have been used to guess the structure of this fleeting reaction intermediate. Indeed, qBH2 rapidly tautomerizes into 7,8-BH2 a more stable conformer. Here two methods integrated to tandem mass spectrometry have been used for the structural characterization. Separation of these two tautomers from an electrosprayed solution of BH4 has been achieved by differential Ion Mobility Spectrometry (DIMS). Furthermore, IR photodissociation spectroscopy, in conjunction to quantum chemical calculations, has been used to derive the structure of the two isomers and to determine the apparent half-live of qBH2.

Introduction

Since the elucidation of its pivotal role in the hydroxylation reactions of living organisms,[1] tetrahydrobiopterin (BH4) (Fig. 1) raised a considerable interest in the field of human medicine. BH4 synthesis, regeneration or transport defects are involved in several inborn errors of metabolism with neurotransmitter disorders, as well as some neurodegenerative disorders including Alzheimer and Parkinson diseases, autism, and depression.[2-4] BH4 defects are also involved in inducible NOS-dependent processes, and other important aspects of vascular homeostasis, inflammation, and cardiac function.[5] Besides, this pterin seems to play a growth or proliferation factor role for various cell lines.[3]

Understanding the mechanism of action of BH4 is a very important issue. BH4 is the natural cofactor of several important enzymatic systems including aromatic amino acid hydroxylases, glyceryl-ether mono-oxygenase, and three nitric oxide synthases.[2-4] Under physiological conditions, it has been proposed that the mechanism of the hydroxylation reaction (Fig. 1) involves an enzymatic stoichiometric oxidation of BH4 to quinonoid dihydrobiopterin (qH2B).[2-4] BH4 is then regenerated by enzymatic reduction of qBH2 involving a dihydropteridine reductase (DHPR).[6] In case of DHPR deficiency, qBH2 rapidly rearranges to a 7,8-dihydrobiopterin (7,8-BH2) (Fig. 1).[6]

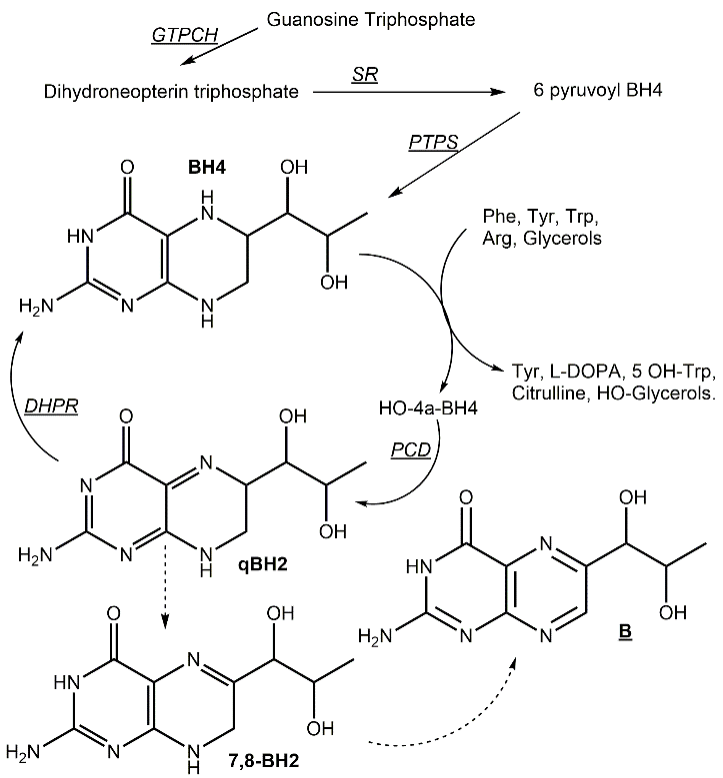


Figure 1: Tetrahydrobiopterin (BH_4) metabolism. Amino acids or glycerols can be hydroxylated by BH4 leading to a quinonoid dihydropterin intermediate qBH2 and its tautomer 7,8-BH2, which in turn can be oxidized into biopterin (B). Enzymatic reactions involving GTPCH (guanosine triphosphate cyclohydrolase), PTPS (6-pyruvoyl-tetrahydropterin synthase), SR (sepiapterin reductase), PCD (pterin-4α-carbinolamine dehydratase), or DHPR (dihydropteridin reductase) are denoted with a full arrow; whereas non-enzymatic auto-oxidation reactions are denoted with dashed arrows.

Understanding the mechanism of oxidation of BH4 is another important issue both from the metabolic and diagnostic points of view. In this context, BH4 determination in biological fluids is essential for the diagnosis of genetic defects of the synthesis or regeneration of this cofactor, and for monitoring the efficacy of BH4 supplementation in patients with genetic defects.[2-4]

Several studies have been devoted to the elucidation of the mechanisms of oxidation of BH4.[7-13] In particular, it was concluded that while the primary oxidation product of BH4, qBH2, can rapidly rearrange into 7,8-BH2 *in vivo*, the *in vitro* tautomerization of the qBH2 species strongly depends of the pH, the buffer type, and the temperature of the solution.[7] For instance, while 7,8-BH2 is the predominant product of the aerobic oxidation of BH4 in pH 6.8 phosphate buffer, dihydropterin (PH2) resulting from the loss of the alkyl side chain from qBH2 is the main product observed in pH 7.6 tris-buffer.[7] In addition, it has been demonstrated that at physiological pH BH4 reacts with molecular oxygen to produce free $O_2°$ radicals.[5]

Nowadays, analysis of pterins in biological fluids is routinely used for the differential diagnosis of variant hyperphenylalaninaemias, and in the investigation of inborn errors of neurotransmitters and folate metabolism.[3] Current analytical methods are mostly based on previous BH4 chemical and electrochemical oxidation studies.[7-13] However, most of available analytical methods cannot allow direct quantification of BH4.[14] The most widely used HPLC method involves two offline chemical oxidation procedures aiming to transform BH4 and BH2 into their fully oxidized fluorescent counterpart, biopterin (B).[8]

Recently, a single step method to simultaneously quantify BH4, BH2, and B, in cerebrospinal fluid using HPLC coupled to fluorescence detection (FD) after post-column coulometric oxidation (13) has been proposed.[14] One conclusion of this study is that indirect determination methods are likely to underestimate BH4, BH2, and NH2 concentrations.[14]

What is surprising, however, is that more than 50 years after the mechanism of BH4 recycling has been proposed, the structure of qBH2 has never been characterized with a direct

specific method, to the best of our knowledge. Until now, only liquid chromatography coupled to UV-Visible spectroscopy,[7, 12] has been used to investigate the oxidation products of BH4. While some HPLC-MS methods have been recently described for the determination of pterins in biological media,[15-17] none of them was devoted to the characterization of the qBH2 structure.

Since BH4 determination is of importance in human medicine, and as current analytical methods are based on the oxidation of this pterin, in order to optimize and possibly standardize the performances of these methods it is of importance to fully clarify the mechanisms of its chemical and electrochemical oxidation. Hence, the aim of this paper is to characterize the oxidation products of BH4, and particularly the qBH2 intermediate and its tautomerization into 7,8-BH2.

Tandem mass spectrometry techniques have been used, including high resolution MS/MS experiments. In addition to collision induced dissociation (CID) MS/MS, two other methods have been used to characterize the structure of the two qBH2 and 7,8-BH2 isomers. An important advance in the structural characterization of molecular ions under mass spectrometry conditions was achieved with the integration of ion mobility spectrometry (IMS) techniques to MS/MS approaches.[18, 19] Here Differential Ion Mobility Spectrometry (DIMS) has been used to separate the two isomeric species. Furthermore, IR spectroscopy integrated to mass spectrometry, in conjunction to quantum chemical calculations, has been used to derive the structure of the two isomers.

Methods

High resolution tandem mass spectrometry was performed using a 7T hybrid FT-ICR (Bruker) instrument equipped with an electrospray ionization (ESI) source. Collision induced dissociation (CID) and infrared multiple photon dissociation (IRMPD) MS^2 experiments were performed. IR activation was provided by an IR OPO/OPA laser (LaserVision), pumped by a non-seeded 25Hz Nd:YAG laser (Innolas Spitlight 600, 550 mJ per pulse, 1064 nm, 4–6 ns pulse duration) as described in details elsewhere.[20]

IR spectra can be derived from IR MS^2 experiments where mass-selected ions are irradiated for ~500 ms when trapped in the ICR cell.[21] When the IR laser is tuned on resonance with a vibrational mode of a particular isomeric form of the mass-selected ions, fragmentation can be induced following a multiple photon absorption process.[22] Gas phase IR multiple photon dissociation (IRMPD) spectra thus correspond to the fragmentation efficiency as a function of the laser wavelength.

Differential ion mobility tandem mass spectrometry (DIMS-MS/MS) experiments were

performed using a modified Esquire 3000+ (Bruker) instrument equipped with an electrospray ionization (ESI) source. Details on the DIMS device[23] and its coupling to the tandem mass spectrometer have been described previously.[24] Briefly, the DIMS device is threaded to match the spray shield of a Bruker Esquire 3000+, such that the spray shield can be removed and the DIMS assembly can be screwed on in its place. A 4 kV voltage is applied to the ESI emitter. Ions are transported by a carrier gas stream at atmospheric pressure between two 25 x 6 mm parallel plates, separated by 0.5 mm. The desolvation gas, which is redirected through the outer housing of the DIMS assembly, serves as the carrier gas through the DIMS assembly as well as for desolvation when coupled to ESI. For these experiments the temperature of the DIMS assembly was 86 °C. The standard glass transfer capillary of the source was replaced with a custom flared glass transfer capillary which allows for a better ion transmission.[25]

The waveform used for the DIMS separation is a bi-sinusoidal waveform generated by applying a sinusoidal waveform at 1.7 MHz to one DIMS electrode and a second sinusoidal waveform at the second harmonic to the other.[23] The $V_{0\text{-}p}$ defined as the dispersion voltage (DV) is typically tuned in the 1.5-2.0 kV range. A dc offset, termed the compensation voltage (CV), is applied to one of the electrodes allowing the transmission of ions of interest through the DIMS device based on their differential ion mobility. DIMS spectra are generated by plotting the ion abundance as a function of CV.

Biopterin (B) and dihydrobiopterin (BH2) were purchased from Sigma (Saint-Quentin Fallavier, France). Tetrahydrobiopterin (BH4) was purchased from Schircks Laboratories (Bauma, Switzerland). Standard solutions (10 mM) were prepared extemporaneously in a mixture of pH 7.4 0.1 M ammonium formate or pH 2.3 0.1 M formic acid/methanol (1/1, v/v) and immediately diluted in the same mixture to a final concentration of 0.1 mM (working solutions). This sample preparation procedure lasts about 10 min. Thus, we decided to starting the whole of the analyses irrespective of the analytical method 10 min after starting the preparation of the samples. So that, time 0 in all figures corresponds to the 10th min of pre-incubation in the mixture of the considered pterin.

ESI conditions were as follow: Flow rate of 120 µL/h, desolvation gas flow of 5 L/min, nebulizer pressure of 10 psi, and desolvation gas temperature of 300°C. The ESI voltage (4000 V) is applied to the electrospray emitter for DIMS operations.

Quantum chemical calculations were performed using the Gaussian09 package. Stationary points on the potential energy surface were characterized at the B3LYP/6-31G(d,p) level of theory. 298K free enthalpies were determined at this same level. IR absorption spectra were derived from harmonic calculations. A scaling factor of 0.955 was applied to the harmonic

frequencies, as used previously for simulating IR spectra in the X-H (X=C, N, O) stretching spectral range.[20, 21, 26]

Results and discussion

High resolution tandem mass spectrometry analyzes of a 0.1 mM solution of BH4, was performed. Under positive mode, three isotopic patterns at *m/z* 238, 240 and 242 were observed, corresponding to protonated BH4, BH2, and B, respectively (See ESI-MS spectrum in Figure 2a). In order to get more insights on the *m/z* 240 ions of interest, CID MS^2 spectra of these ions were recorded (Figure 2b). As can be seen in Figure 2b, a small peak at *m/z* 228 can be discerned, but the two most abundant product ions were observed at *m/z* 166 and 196. These two ions correspond to the loss of $C_3H_6O_2$ and C_2H_4O, respectively.

Interestingly, a clear trend of the evolution of the 166/196 intensity ratio as a function of the BH4 auto-oxidation reaction time could be observed. This is illustrated in Figure 2 where the CID MS^2 spectra of m/z 240 ions are given at short (chart b) and longer (chart c) reaction times. As can be seen in Figure 2, the abundance *m/z* 196 ions becomes greater when the reaction time increases while the m/z 166 fragment ions disappear. This observation may suggest that more than one m/z 240 isomeric forms of m/z ions are present in solution and transferred to the gas phase.

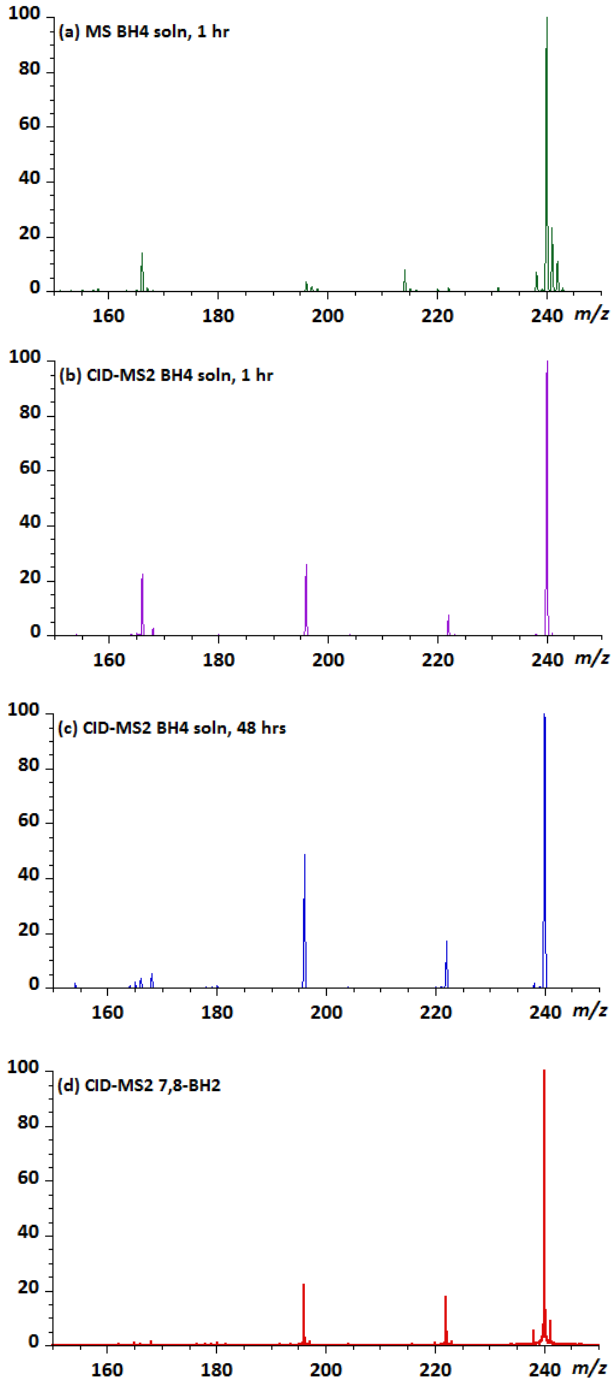


Figure 2: Mass spectra of an electrosprayed solution of BH4 (see method) are given in panels (a-c). The MS spectrum with the parent protonated BH4 (*m/z* 242) where its oxidized forms (*m/z* 240 and 238) can also be seen is given in panel (a). Panels (b) and (c) correspond to CID-MS2 spectrum of m/z 240 ions recorded after 1 and 48 hours of auto-oxidation reaction, respectively. Panel (d) is the CID-MS2 spectrum of *m/z* 240 ions from an electrosprayed solution of 7,8-BH2.

In order to test this hypothesis, the CID MS^2 mass spectrum of an electrosprayed solution of pure 7,8-BH2 was recorded. As can be seen in Figure 2d, only the *m/z* 196 products

ions could be observed. It can thus be concluded that two isomeric forms of *m/z* 240 ions are generated and trapped in the ICR cell, 7,8-BH2 being characterized by the *m/z* 196 fragment (Scheme 1). The fragment ion at *m/z* 166, only observed in MS^2 spectra for short BH4 auto-oxidation reaction time, is thus a signature of another isomeric form, which could be qBH2.

$$[qBH2+H]^+ \ (m/z\ 240) \rightarrow m/z\ 166 \ (a)$$
$$[7,8\text{-}BH2+H]^+ \ (m/z\ 240) \rightarrow m/z\ 196 \ (b)$$

Assuming that the protonated forms of the two isomers of BH2, $[qBH2+H]^+$ and $[7,8\text{-}BH2+H]^+$, are trapped in the ICR cell, the infrared spectra of these two m/z 240 isomers could be recorded. Using an IR MS^2 sequence, m/z 240 ions were mass-selected and then irradiated with the IR laser when trapped in the ICR cell. As shown in scheme 1, photo-fragmentation reaction (a), for example, can only proceed if the IR laser is tuned on resonance with a vibrational mode of the $[qBH2+H]^+$ form. And the IR spectrum of the $[qBH2+H]^+$ and $[7,8\text{-}BH2+H]^+$ isomers could thus be recorded by monitoring the fragmentation yield of the two *m/z* 166 and 196 product ions as a function of the laser wavelength.

The resulting IR spectra recorded under different experimental conditions are shown in Figure 3 (charts a-c). At short auto-oxidation reaction time (chart a, and b), two distinct IR spectra could be recorded. At longer auto-oxidation reaction time (chart c), only the *m/z* 196 photo-fragment ions could be observed. The IR spectrum associated with the *m/z* 196 photo-fragment ions when recorded at different auto-oxidation reaction times remains the same, and is characterized by a strong IR feature with a maximum at 3445 cm^{-1} and a shoulder on its red side. These spectra can be tentatively ascribed to the 7,8-BH2 tautomer considering the similarity of the IR spectrum of the *m/z* 240 ions associated with a 7,8-BH2 solution (Figure 3d). The IR spectrum of the *m/z* 240 ions associated with the *m/z* 166 photo-fragment ions is clearly different. In particular, the maximum of the photo-fragmentation signal is observed at 3430 cm^{-1}. These spectra can be tentatively ascribed to the qBH2 tautomer.

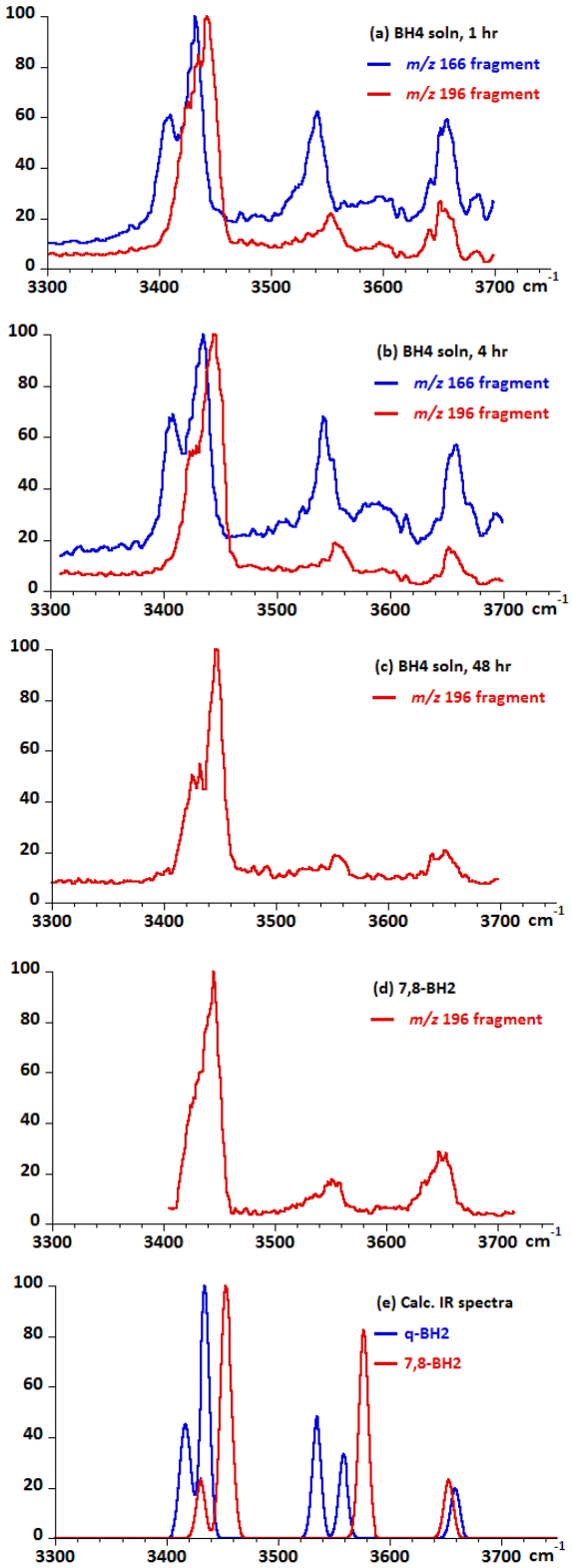


Figure 3: Experimental IRMPD spectra of the m/z 240 ions (a-d) and calculated IR absorption spectra of qBH2 and 7,8-BH2 (e). IRMPD spectra of the m/z 240 ions recorded at different auto-oxidation times of a BH4 solution are shown in panels (a-c): (a) 1 hour, (b) 4 hours, and (c) 48 hours. The IRMPD spectrum of the m/z 240 ions associated with a 7,8-BH2 solution is shown in panel (d). The IRMPD spectra in red (blue) in panels (a-d) correspond to the fragmentation yield associated to the m/z 196 (166) product ions. The calculated IR absorption spectra of the lowest energy isomer of qBH2 (blue) and 7,8-BH2 (red) are shown in panel (e); see Supplementary Information for more details.

Quantum chemical calculations have been carried out on the $[qBH2+H]^+$ and $[7,8\text{-}BH2+H]^+$ ions in order to challenge the above structural assignment. Different protonation sites have been envisaged (See Supporting information for further details). Overall, for both neutral and protonated BH2, the most stable structures correspond to 7,8-BH2. The qBH2→7,8-BH2 tautomerization reaction was found to be exothermic by -62.9 and -75.9 kJ/mol for neutral and protonated systems, respectively. In the case of 7,8-BH2, the lowest energy structures derive from protonation on the N(5) site, and the N(3) is the preferred protonation site for the qBH2 form. We primarily focused on the assignment of the most intense band observed for the two photo-fragmentation channels which was observed in the 3430-3445 cm^{-1} range.

The most intense IR band predicted for all the lowest energy conformers of the $[qBH2+H]^+$ and $[7,8\text{-}BH2+H]^+$ ions corresponds to the symmetric elongation of the amino NH bonds. This band is essentially insensitive to the conformation of the diol side chain. This aliphatic chain is the most flexible part of the systems, and may lead to relatively complicated conformational landscape (See Supporting information for further details). In this context, an exhaustive conformational search was not required for assigning the two experimental spectra. The position of the symmetric elongation of the amino NH bonds, however, is very sensitive to the conjugation between the amino and the bicyclic group, and it is thus a diagnostic for tautomerization.

The theoretical IR absorption spectra of the lowest energy isomers of protonated qBH2 and 7,8-BH2 are given in Figure 3e. Consistent with the experimental observation, a blue shift (~15 cm-1) of the symmetric elongation of the amino NH bonds is predicted theoretically. In the case of the IR spectrum associated with the *m/z* 166 fragment, the broad and intense band has a maximum at 3445 cm^{-1}, which is very close to the predicted value (3450 cm^{-1}) for the symmetric NH_2 stretching mode of the lowest energy structure of the $[qH2B+H]^+$ ion. The maximum of the broad and intense band was observed to be red-shifted to 3430 cm^{-1} for the IR spectrum associated with the m/z 196 ion, which is in good agreement with the predicted value (3435 cm^{-1}) determined for the symmetric NH_2 stretching mode of the lowest energy structure of the $[7,8\text{-}H2B+H]^+$ ion.

Differential ion mobility spectrometry was also used to provide additional evidence for the co-existence of two isomers of BH2. DIMS spectra of the *m/z* 240 ions *i.e.* protonated BH2 and/or its potential isomers, obtained using our DIMS device coupled to a quadrupole ion trap are displayed in Figure 4. The dispersion voltage DV values were 2.0 kV (40 kV/cm). This value was found to correspond to the best tradeoff between ion transmission and mobility separation. DIMS spectra of the *m/z* 240 ions recorded for different incubation times, *i.e.* auto-

oxidation times, are compared with the DIMS spectrum of *m/z* 240 associated with a solution of pure 7,8-BH2.

As can be seen in Figure 4a, a single *m/z* 240 peak centered at 0.55 V was observed when the pure 7,8-BH2 solution was studied. This is consistent with the fact that a single isomer of protonated 7,8-BH2 is generated under electrospray conditions. At short BH4 auto-oxidation reaction time (~4 hours), however, two m/z 240 peaks were observed in the chromatogram. One centered at 0.55 V, thus providing evidence for the formation of 7,8-BH2. The observation of a second peak centered at 2.20 V, which disappears at long reaction time, is consistent with the MS^2 CID and IRMPD spectroscopy data, thus providing evidence for the formation of qBH2.

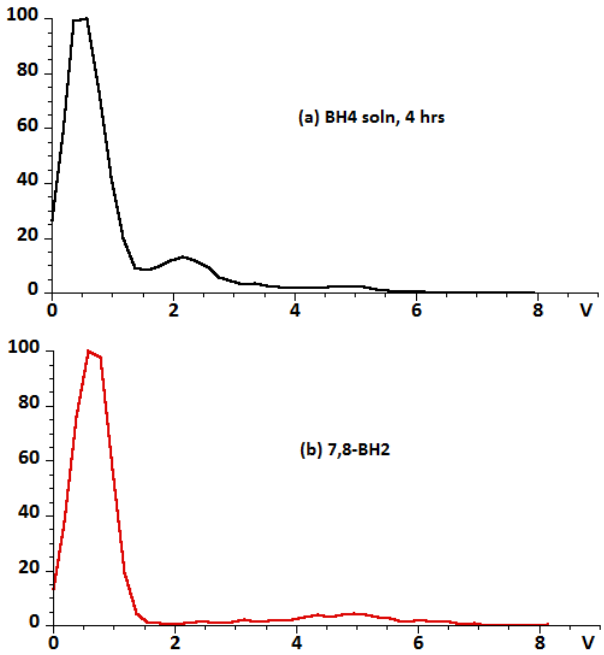


Figure 4: DIMS chromatograms of m/z 240 ions where relative ion abundance is plotted as a function of the compensation voltage (CV in V): (a) BH4 solution after 4 hours of auto-oxidation; (b) 7,8-BH2 solution.

Concluding remarks and perspectives

Our data clearly show that qBH2 rearranges to 7,8-BH2 more rapidly under acidic conditions than under neutral conditions. The apparent half-live of qBH2 is about 20 min under acidic conditions, while it increases up to 115 min under neutral conditions (Fig. 5c). These lifetime values are significantly higher than those published earlier (half-live of about 5 min),[7] which could be attributed to the type of buffer and/or the temperature as reported previously.[11] What is worth noting, however, is that the observed differences as a function of pH may provide

answers to some questions raised by the current methods of BH4 determination.[7, 8, 14]

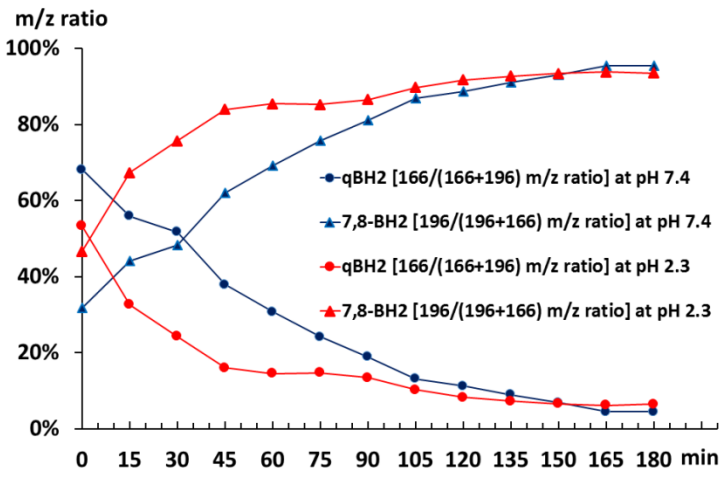


Figure 5: Kinetics of qBH2 isomerization into 7,8-BH2 as a function of pH. BH2 isomers are represented by the abundance ratio of their characteristic fragment ions (m/z 166 and 196 for qBH2 and 7,8-BH2, respectively) derived from CID-MS2 spectra as a function of time (minute) at two pH values (2.3 and 7.4).

According to the authors of the most used chemical oxidation method,[8] BH4 is oxidized to biopterin in the acid (90% recovery), but was converted primarily to pterin (80% conversion) by oxidation in alkali. When the period of time for oxidation of BH4 in the acid is shortened (1.5 min), the recovery of biopterin decreases. The iodine oxidation of BH2 is rapid and completed within a few minutes, whereas the oxidation of BH4 required a minimum of 30 min. The authors[8] also observed that there are two stages in the acidic-iodine oxidation of BH4; the initial and rapid stage, which seems to be completed within 1 min and a second slower stage. To explain this phenomenon the authors suggest the occurrence of an intermediate during the oxidation of BH4, which is slowly oxidized by iodine to biopterin. According to the authors the more probable intermediate is qBH2.[8] Incidentally, our experimental data confirm this hypothesis while providing further explanation for the mechanism of BH4 oxidation.

Figure 5c shows that qBH2 (*m/z* 166 characteristic ion) decreases following two steps: an initial rapid step concomitantly to the rapid increase of 7,8-BH2 (*m/z* 196) followed by a slower step of decrease of the former concomitant to the increase of the latter. Since both qBH2 and 7,8-BH2 are always present in the medium (Fig. 5c), and since the kinetics of qBH2 tautomerization into 7,8-BH2 under acidic conditions (Fig. 5c, and d) is quite similar to the kinetics of acidic-iodine oxidation of BH4,[8] we can deduce that qBH2 is a non-oxidizable compound under acidic conditions. Only 7,8-BH2 can be oxidized, under acidic conditions.

On the other hand, we were surprised to observe that under neutral conditions the BH4 electro-oxidation yield is much lower than that of 7,8-BH2 (less than 50 %, and more than 70 %, respectively).[14] As the oxidation of BH4 yields qBH2 and as this latter can yield BH2 or PH2, the full electro-oxidation of BH4 into B may be more complex than expected. This hypothesis seems to agree with previous observations indicating that the oxidation of H4B does not necessarily yield biopterin.[10] In fact, the difference of the electro-oxidation yields between 7,8-BH2 and BH4[14] cannot be attributed to the partial oxidation of BH4 into pterin because pterin exhibits the same fluorescence properties than biopterin under our experimental conditions (Supporting information, SIF2). Since qBH2 slowly rearranges into 7,8-BH2 at neutral pH (Fig. 5c) and since that the residence time of the effluent through the coulometric cell is very short,[14] it is obvious that the electro-oxidation of BH4 cannot be complete under such conditions. It remains now to fully clarify the mechanism of BH4 electrochemical oxidation. The proposed methodology allows to easily reaching such an objective.

References

(1) kaufman, S. P.N.A.S. **1963**, 50, 1085–1093.

(2) Thöny, B.; Auerbach, G, And Blau, N. *Biochem. J.* **2000**, 347, 1–16.

(3) Werner, E. R.; Blau, N.; and Thöny, B. *The Biochemical journal* **2011**, 438(3), 397–414.

(4) Kurian, M.; Gissen, P.; Smith, M.; Heales, S.; and Clayton, P. T. *Lancet neurology* **2011**, 10(8), 721–733.

(5) Bendall, J.K.; Douglas, G.; McNeill, E.; Channon, K.M.; and Crabtree, M.J. *Antioxidants & Redox Signaling* **2014,** 20 (18), 3040–3077.

(6) Butler, I.J.; Koslow, S.H.; Krumholz, A.; Holtzman, N.A.; Kaufman, S. *Ann. Neurol.* **1978**, 3:, 224-230.

(7) Haavik, J.; Flatmark, T. *J. Chromatogr.* **1983**, 251, 36 –372.

(8) Fukushima, T.; Nixon, J. C. *Anal. Biochem.* **1980**, *102*, 176–188.

(9) Howells, D. W.; Smith, I.; Hyland, K. *J. Chromatogr., Biomed. Appl.* **1986**, *381*, 285-294.

(10) Howells, D. W.; Smith, I.; Hyland, K. *Clinica Chimica Acta* **1987**, 167, 23-30.

(11) Davis, M.D.; Kaufman, S.; Milstien, S. *Eur. J. Biochem* **1988**, 173, 345-351.

(12) Heales, S.; Hyland, K. *J. Chromatog. Biomed. Appl.* **1989**, 494, 77-85.

(13) Hoke, K.R.; Crane, B.R. Nitric Oxide **2009**, 20, 79–87.

(14) Guibal, P. ; Le, N. ; Doummar, D. ; Giraud, N. ; Roze, E. ; Rodriguez, D., ; Couderc, R., Billette De Villemeur, T. ; Moussa, F. *ACS Chemical Neuroscience* **2014**, 5 (7), 533–541.

(15) Fismen, L.; Eide, T.; Djurhuus, R.; Svardal, A.M. *Analytical Biochemistry* **2012**, 430, 163–170

(16) Burton, C.; Weng, R.; Yang, L.; b, Bai, Y.; Liu, H.; Maa, Y. *Analytica Chimica Acta* **2015**, 853, 442–450.

(17) Xiong, X.; Liu, Y. *Talanta* **2016**, 150, 493–502.

(18) Both, P.; Green, A. P.; Gray, C. J.; Sardzik, R.; Voglmeir, J.; Fontana, C.; Austeri, M.; Rejzek, M.; Richardson, D.; Field, R. A.; Widmalm, G.; Flitsch, S. L.; Eyers, C. E., *Nature Chemistry* **2014,** *6*, 65–74 .

(19) Lanucara, F.; Holman, S. W.; Gray, C. J.; Eyers, C. E. *Nature Chemistry* **2014,** *6*, 281– 294 .

(20) Bakker, J. M.; Sinha, R. K.; Besson, T.; Brugnara, M.; Tosi, P.; Salpin, J. Y.; Maitre, P. *J. Phys. Chem. A* **2008,** *112*, 12393–12400 .

(21) Bakker, J. M.; Salpin, J. Y.; Maitre, P. *Int. J. Mass spectrom.* **2009,** *283*, 214-221.4.

(22) MacAleese, L.; Maitre, P. *Mass Spectrom. Rev.* **2007,** *26* (4), 583–605 .

(23) Isenberg, S. L.; Armistead, P. M.; Glish, G. L. *J. Am. Soc. Mass. Spectrom.* **2014,** *25*, 1592–1599.

(24) Hernandez, O.; Isenberg, S.; Steinmetz, V.; Glish, G. L.; Maitre, P. *J. Phys. Chem. A* **2015,** *119*, 6057–6064.

(25) Bushey, J. M.; Kaplan, D. A.; Danell, R. M.; Glish, G. L. *Instrum. Sci. Technol.* **2009,** *37*, 257–273.

(26) Bythell, B. J.; Hernandez, O.; Steinmetz, V.; Paizs, B.; Maitre, P. *Int. J. Mass spectrom.* **2012,** *316*, 227–234.

Supplementary information

Structures of the neutral and protonated 7,8-BH2 and qBH2 isomers were determined at the B3LYP/6-31G(d,p) level of theory. All the structures correspond to minima on the corresponding potential energy surface. As shown in Figure SI1, five and four protonation sites were envisaged for the qBH2 and 7,8-BH2 tautomer, respectively.

The calculated 298K free enthalpies reported in Figure SI1(c) correspond to those of the lowest energy conformation found for each protonation site. For neutral BH2, 7,8-BH2 was found to be more stable than the qBH2 tautomer by 62.9 kJ/mol. Similarly protonated 7,8-BH2 structures were found to much more energetically favorable than protonated q-BH2 structures. The lowest energy structure of protonated BH2 corresponds to N(5) protonated 7,8-BH2. Protonation on the C(4)=O oxygen of 7,8-BH2 was also found to be more energetically favorable (+14.1 kJ/mol relative energy) than the lowest energy structure calculated for protonated q-BH2 (+75.9 kJ/mol) which corresponds to protonation on the N(3) site.

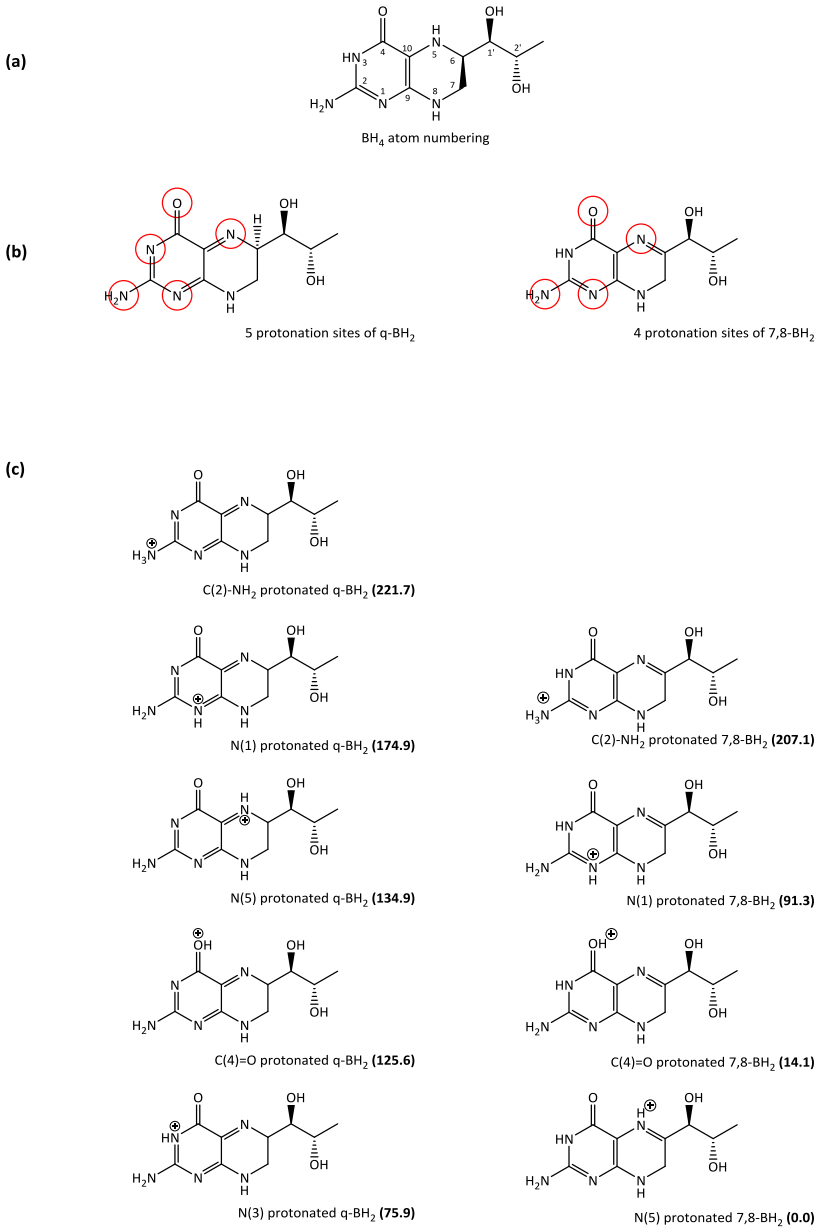


Figure SI1: Different protonation sites of q-BH2 and 7,8-BH2. The atom numbering for BH4 which was used for the structure labelling is indicated in (a); the different protonation sites envisaged for each BH2 tautomer are indicated by a red circle in (b); the relative 298K free enthalpies (in kJ/mol) are given in bold along with a sketch of the protonated isomer in (c).

For each protonation site, several conformers have been generated for the geometry optimization procedure. These conformers essentially differ from (i) the orientation of the diol chain, (ii) the hydrogen bonding network between the C(1')OH and C(2')OH and whether the neutral or protonated N(5) site is involved or not in hydrogen bonding. Overall, protonated structures corresponding to hydrogen bond network where the C(1')OH acts as a donor, and the C(2')OH acts as an acceptor were found to be the more stable. In the case of neutral qBH2, however, these two types of structures (Figure SI2) were found nearly degenerate.

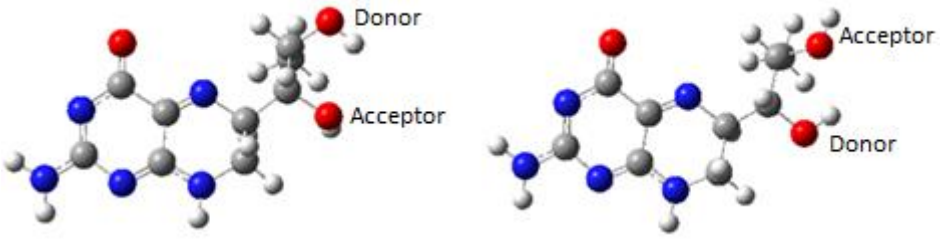


Figure SI2: Two nearly degenerate conformations of protonated qBH2 and 7,8-BH2. These two structures essentially differ by the conformation of the diol chain and the hydrogen bond between the two hydroxyl groups. The C(1')OH acts as a acceptor (donor), and the C(2')OH acts as a donor (acceptor) in the structure shown left (right).

The lowest energy N(5) protonated 7,8-BH2 structure is shown in Table SI1 along with an assignment of the predicted IR bands of interest. This structure is characterized by two hydrogen bonds. A neutral hydrogen bond is formed between the two hydroxyl groups where the C(1')OH acts as a donor, and the C(2')OH acts as an acceptor were found to be the more stable. This structure is also stabilized by a ionic hydrogen bond between the $N(5)H^+$ and the C(1')OH hydroxyl group. The most intense predicted bands is centered at 3452 cm^{-1} and corresponds to the amino symmetric NH stretch.

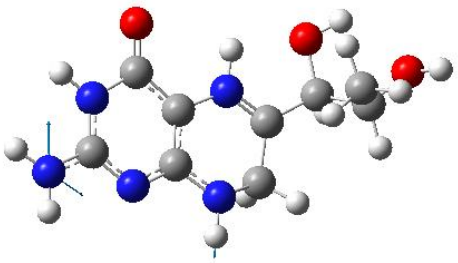
Assignment	wavenumber	Optimized N(5) protonated 7,8-BH_2 structure
acceptor C(2')O-H stretch	3653	
AD C(1')O-H stretch	3577	
NH_2 NH as stretch	3577	
N(8)-H stretch	3458	
NH_2 NH s stretch	3452	
N(3)-H stretch	3431	
$N(5)^+$-H stretch	3268	

Table SI1: Predicted IR band positions (column 2, in cm^{-1}) of the Optimized N(5) protonated 7,8-BH_2 structure. Harmonic frequencies were scaled by 0.955. Band assignment is proposed in column 1. The optimized structure is shown in column 3, where the blue arrows represent the atom displacements of the normal mode associated with the most intense absorption band corresponding to the NH_2 NH asymmetric stretch.

The lowest energy N(3) protonated qBH2 structure is shown in Table SI2 along with an assignment of the predicted IR bands of interest. This structure is characterized by a neutral hydrogen bond where the C(1')OH acts as a donor, and the C(2')OH acts as an acceptor. The most intense predicted bands is centered at 3435 cm^{-1} and corresponds to the amino symmetric NH stretch.

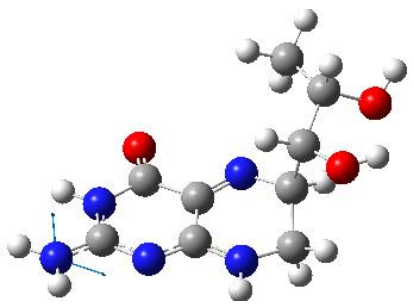
Assignment	Wavenumber	Optimized N(3) protonated q-BH_2 structure
acceptor C(2')O-H stretch	3659	
NH_2 NH as stretch	3558	
donor C(1')O-H stretch	3534	
NH_2 NH s stretch	3435	
N(8)-H stretch	3420	
$N(3)^+$-H stretch	3414	

Table SI2: Predicted IR band wavenumbers (column 2, in cm^{-1}) of the Optimized N(3) protonated q-BH_2 structure. Harmonic frequencies were scaled by 0.955. Band assignment is proposed in column 1. The optimized structure is shown in column 3, where the blue arrows represent the atom displacements of the normal mode associated with the most intense absorption band corresponding to the NH_2 NH asymmetric stretch.

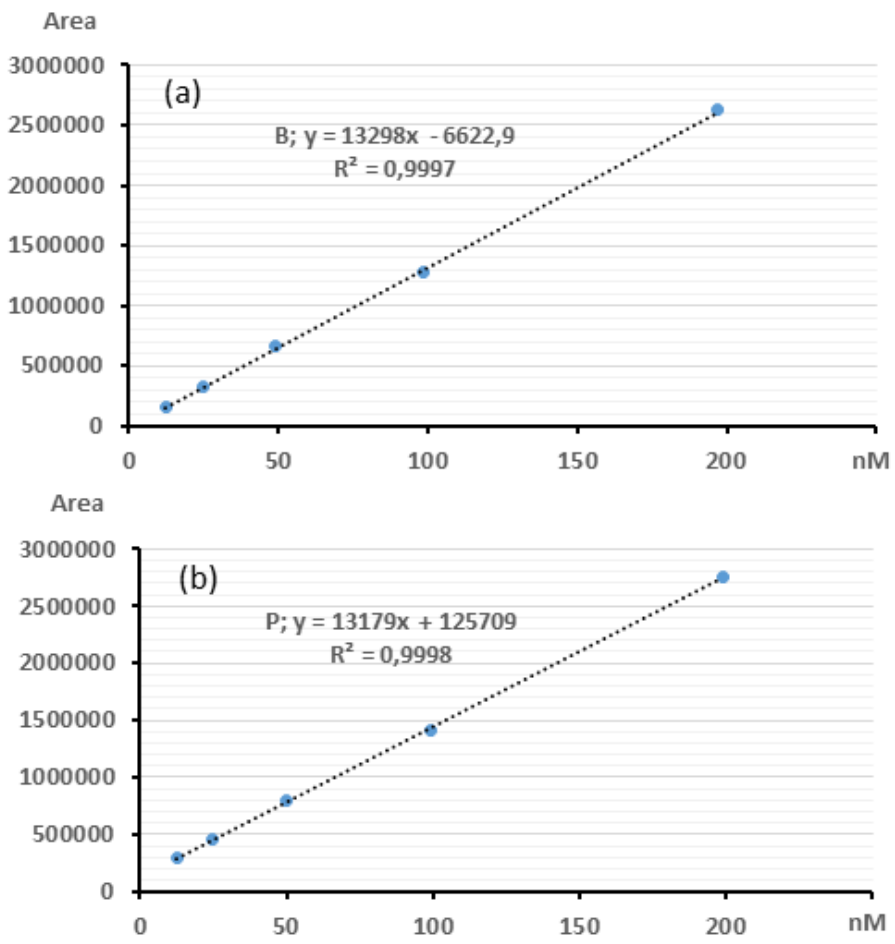


Figure SI2. Comparison of (b) biopterin and (c) pterin fluorescence responses as a function of concentration as determined by HPLC as described previously (Ref. 14)

IV.3. Oxydation électrochimique de la tétrahydrobioptérine

Précédemment, nous avons démontré que la BH4 s'auto-oxyde spontanément en qBH2. Cependant, nous nous sommes demandé si la qBH2 apparaissait également durant l'électro-oxydation de la BH4. Ce qui expliquerait le faible rendement d'oxydation de la BH4 si on vérifie l'hypothèse que cet intermédiaire n'est pas facilement électro-oxydable.

Pour confirmer la présence de la qBH2 durant l'électro-oxydation de la BH4, des études en voltammétrie cyclique et en chromatographie liquide (LC) couplée à la spectrométrie de masse (MS) après oxydation électrochimique post-colonne et ont été réalisées.

IV.3.1. Matériels et méthodes

Chromatographe liquide couplé à une cellule électrochimique et à un spectromètre de masse :

Un chromatographe liquide à ultra haute pression (de marque « Waters Acquity UPLC ») a été couplé à une cellule électrochimique (ESA Coulochem III 6011) contenant deux électrodes. Cette cellule électrochimique a été ensuite reliée à un spectromètre de masse Synapt G2-Si (de marque « Waters ») doté d'une source électrospray (Figure 5.2). La séparation des composés a été menée à température ambiante et sur une colonne Atlantis dC18 (4,6 x 150 mm, 3 µm). Le volume d'injection était de 10 µL. Les analyses ont été réalisées en mode isocratique. La phase mobile étant composée de 3% de méthanol, et de 97% d'une solution aqueuse d'acide formique (0,05 M) dont le pH a été ajusté avec de l'ammoniac. Pour les études de potentiel, la deuxième électrode de la cellule électrochimique a toujours été fixée au même potentiel que la première.

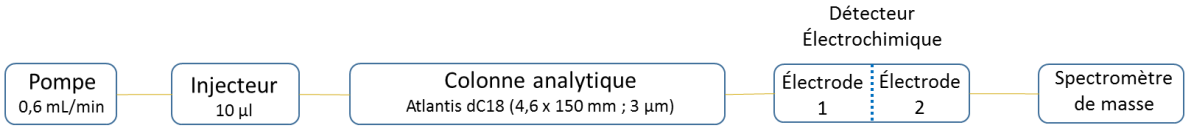


Figure 5.2 : Schéma du montage LC-ECD-MS.

Source électrospray :

Le débit et la température du gaz de désolvatation sont respectivement de 5 L/min et de 300°C. La pression était de 10 psi. Le voltage d'électronébulisation était de 4000 V. La source d'électrospray a toujours été utilisée dans ces mêmes conditions opératoires avec tous les spectromètres utilisés.

Voltammétrie cyclique :

Pour établir les voltamogrammes cycliques, les trois électrodes suivantes ont été utilisées : l'électrode de travail était une électrode de verre ; l'électrode de référence était une électrode de calomel saturé (ECS) ; la contre-électrode était une électrode de platine.

Provenance des produits :

La BH2 et la BH4 proviennent de Schircks Laboratories (Genève, Suisse) ; le méthanol, l'acide citrique, l'acide formique, la soude et l'ammoniac de Merck, et le bisulfite de sodium de Sigma-Aldrich.

Préparation des solutions standards :

Pour les expériences en spectrométrie de masse, la BH4 et la BH2 sous forme solide ont été diluées dans une solution contenant 3% de méthanol et 97% d'acide formique (0,05 M) dont le pH a été ajusté avec de l'ammoniac. La concentration de travail de la BH2 et de la BH4 était respectivement de 83 µM et de 100 µM. Pour les études cinétiques de l'auto-oxydation de la BH4, les solutions de BH4 ont été conservées dans une salle climatisée à 18°C.

Pour les expériences en voltammétrie cyclique, la BH4 et la BH2 ont été diluées dans une solution d'acide citrique à 0,5 M et le pH de la solution a été ajusté avec de la soude. La concentration de travail de la BH2 et de la BH4 était de 200 µM.

IV.3.2. Étude de l'oxydation de la BH2 et de la BH4 en voltammétrie cyclique

Afin d'observer l'influence du pH sur le potentiel d'oxydation de la BH4 et de la BH2, des études en voltammétrie cyclique ont été effectuées

Influence du pH sur le potentiel d'oxydation de la BH2 :

L'acquisition des voltamogrammes cycliques de la BH2 (0,2 mM) introduite dans une

solution d'acide citrique (0,5M) à pH 3, à pH 5 et à pH 7, et représentés dans la figure 5.3, a été réalisée avec une fréquence d'acquisition de 30 mV/scan sur une gamme de potentiel allant de 0 mV à 800 mV.

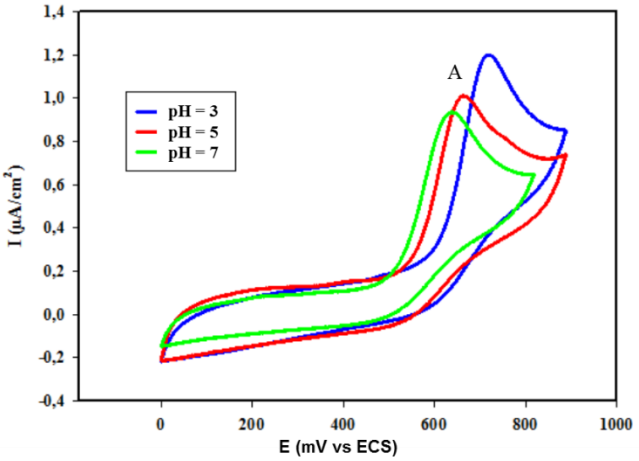


Figure 5.3 : Superposition des voltamogrammes cycliques de la BH2 (0,2 mM) dans une solution d'acide citrique (0,5 M) à pH 3 (courbe bleue), à pH 5 (courbe rouge) et à pH 7 (courbe verte), avec des potentiels allant de 0 mV à 800 mV.

Quel que soit le pH de la solution, un pic d'oxydation (A) est présent. Ce pic correspond à l'oxydation de la BH2 en B. Le potentiel d'oxydation du pic A est de 700 mV à pH 3, de 650 mV à pH 5 et de 600 mV à pH 7. Ces résultats montrent que l'oxydation de la BH2 est dépendante du pH. D'après les valeurs des potentiels d'oxydation obtenus pour les différentes valeurs de pH, il apparait que plus le pH est acide, plus le potentiel d'oxydation est élevé. En d'autres termes, il est d'autant plus difficile d'oxyder la BH2 que le pH de la solution est acide. Ces résultats montrent l'existence d'un équilibre chimique de déprotonation après perte de deux électrons à la surface de l'électrode de travail. Par ailleurs, ces résultats sont en accord avec les rendements d'oxydation de la fluorescence de la BH2 qui diminuent en fonction du pH.

Influence du pH sur le potentiel d'oxydation de la BH4 :

L'influence du pH sur le potentiel d'oxydation de la BH4 a été également étudiée (Figure 5.4).

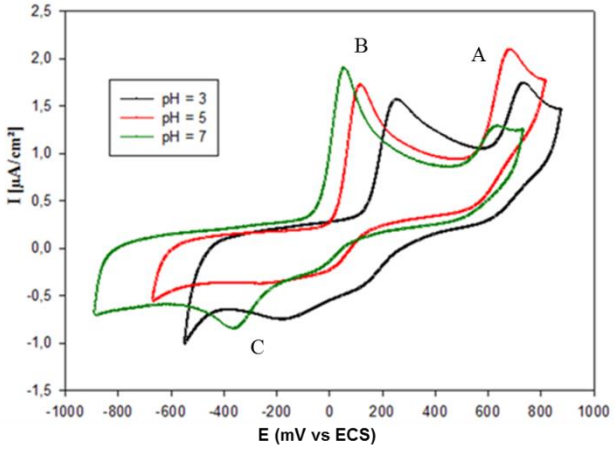


Figure 5.4 : Superposition des voltamogrammes cycliques de la BH4 (32 mM) dans une solution d'acide citrique (0,5 M) à pH 3 (courbe noire), à pH 5 (courbe rouge) et à pH 7 (courbe verte), avec des potentiels allant de -800 mV à 800 mV.

Les voltamogrammes cycliques de la BH4 sont caractérisés par deux pics d'oxydation (A et B) et un pic de réduction (C). Le pic A correspond à l'oxydation de la BH2 car les potentiels d'oxydation sont les mêmes que ceux trouvés avec un standard de BH2. Cette BH2 est certainement formée par oxydation électrochimique de la BH4. Ayant identifié le pic A, il est désormais possible d'affirmer que le pic B correspond à l'oxydation de la BH4. Les potentiels d'oxydation du pic B sont à 200 mV à pH 3, à 100 mV à pH 5 et à 50 mV à pH 7. En analysant les potentiels d'oxydation obtenus en fonction du pH, on remarque que plus le pH est acide, plus le potentiel d'oxydation est élevé. Ainsi, à l'instar de ce qui a été observé pour la BH2, il est plus difficile d'oxyder la BH4 à des pH faibles. On en arrive à la même conclusion qu'avec la BH2 : à savoir, l'existence d'un équilibre chimique de déprotonation, après oxydation électrochimique. Ces résultats expliquent l'augmentation du rendement d'oxydation de la BH4 obtenu en fluorescence à des pH neutres par rapport à des pH acides. En effet, l'augmentation du pH va favoriser la déprotonation de la forme électro-oxydée de la BH4.

Au balayage retour, un pic de réduction C apparait à un potentiel de -400 mV, attribué à la réduction d'un produit d'oxydation primaire de la BH4. En effet, le voltamogramme cyclique d'une solution de BH4, enregistré de -800 mV à 500 mV (figure 5.5), domaine de potentiel où la BH2 n'est pas oxydée, vérifie la présence de ce pic associé au pic B. Le pic C pourrait correspondre à l'existence d'une étape d'électro-oxydation réversible.

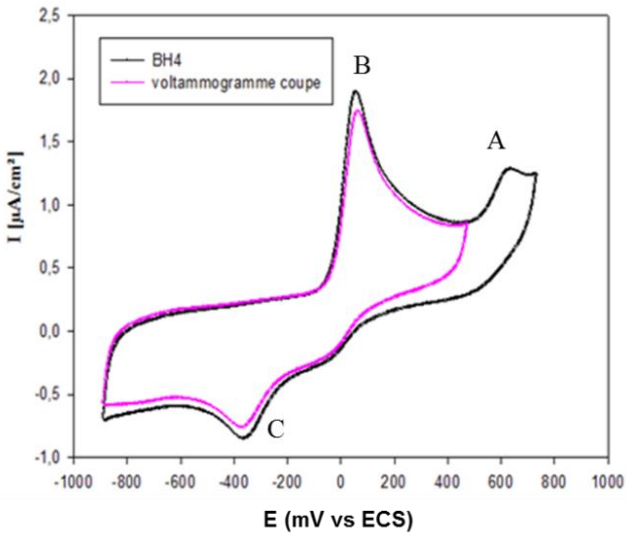


Figure 5.5 : Superposition des voltamogrammes cycliques de la BH4 (32 mM) dans une solution d'acide citrique (0,5 M) à pH 7. Gamme de balayage de -800 mV à 800 mV pour la courbe noire, et de -800 mV à 500 mV pour la courbe violette.

IV.3.3. Étude de l'oxydation de la BH2 et de la BH4 en chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse après oxydation électrochimique post-colonne

Afin d'identifier les produits d'électro-oxydation de la BH4 et de la BH2 que l'on dose véritablement durant les analyses biochimiques et de comprendre la cause du faible rendement d'électro-oxydation de la BH4, nous avons reproduit le montage mis en place pour doser les neurotransmetteurs et les ptérines. Cependant, le chromatographe en phase liquide et la cellule électrochimique ont été couplés cette fois-ci avec un spectromètre de masse au lieu d'un détecteur de fluorescence. Ce spectromètre de masse, utilisé en mode *full scan*, servira à repérer les ions/fragments formés lors de chaque analyse pour un pH et un potentiel donnés.

Étude de l'oxydation de la BH2 en fonction du potentiel et du pH :

Pour étudier l'influence du pH sur le rendement d'oxydation de la BH2, nous avons utilisé trois phases mobiles de même composition mais de pH différents : pH 2,3, pour avoir un pH acide compatible avec la stabilité de la phase stationnaire, pH 5,6 pour avoir le pH optimal de séparation des ptérines sur une silice gréffée C18 [8, 130] et, enfin, pH 7,4 pour le pH du maximum du rendement d'électro-oxydation de la BH4 [131]. À chaque pH, nous avons fait varier le potentiel d'oxydation des électrodes de 0 mV à 700 mV. En se positionnant sur le pic d'élution de la BH2, l'intensité correspondant à l'ion de la B (m/z 238) et de la BH2 (m/z

240) a été relevée à chaque mesure. Ceci a permis d'établir le rendement d'oxydation de la BH2 en B, représenté à la figure 5.6, pour chaque pH à chaque potentiel.

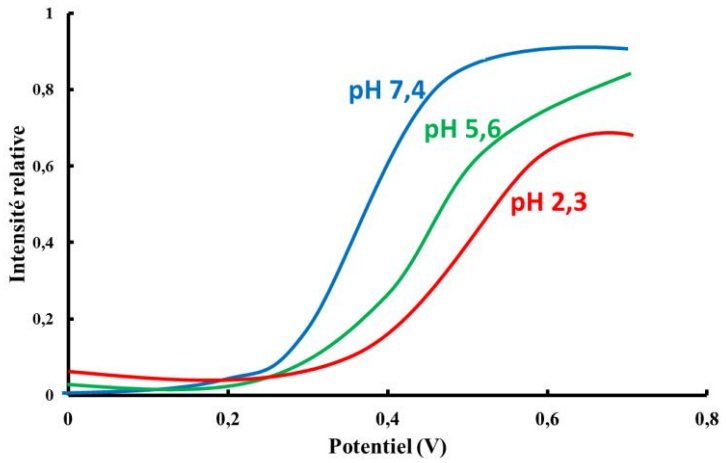


Figure 5.6 : Taux d'oxydation de la BH2 (82 µM) en fonction du potentiel et du pH de la phase mobile.

La figure 5.6 montre que le rendement d'oxydation de la BH2 en B à 600 mV est de 60 % à pH 2,3, de 70 % à pH 5,6 et de 80 % à pH 7,4. Ainsi, plus le pH est acide, moins la BH2 s'oxyde en B. Toutefois, à des potentiels suffisamment élevés, la BH2 s'oxyde relativement aisément même à des pH acides. Ces résultats sont en accord avec ceux obtenus en voltammétrie cyclique (Figure 5.3).

<u>Étude de l'oxydation de la BH4 en fonction du potentiel et du pH</u> :

L'étude de l'influence du pH et du potentiel sur le rendement d'oxydation de la BH4 a été réalisée dans les mêmes conditions que pour la BH2. Étant donné que la BH4 s'oxyde en qBH2 puis s'isomérise ensuite en BH2, comme nous l'avons démontré dans le chapitre précédent, il est nécessaire de séparer ces composés par chromatographie afin d'étudier individuellement le comportement de chaque espèce. .

La figure 5.7 montre les résultats obtenus à pH 2,3. À ce pH, plus le potentiel est élevé plus la BH4 s'oxyde en un dérivé ayant m/z de 240 correspondant à celui de la BH2. Toutefois, elle ne s'oxyde pas davantage car l'intensité de cet ion atteint un palier à partir de 200 mV. Étant donné que la BH2 s'oxyde en B à ce pH pour des potentiels élevés, l'ion à m/z 240 n'est donc pas de la BH2, comme en témoigne l'absence du fragment caractéristique de la BH2 (196 m/z) dans les spectres de masse (Figure 2). En revanche, l'augmentation de l'intensité de l'ion m/z 240 en fonction du potentiel s'accompagne de l'augmentation du fragment 166 m/z

caractéristique de la qBH2. Ce dernier augmente progressivement pour atteindre un palier à partir de 200 mV. Ces résultats montrent que l'intermédiaire réactionnel formé au cours de l'électro-oxydation est la qBH2 et que cette dernière n'est pas oxydable aux pH étudiés, ce qui confirme notre hypothèse de départ.

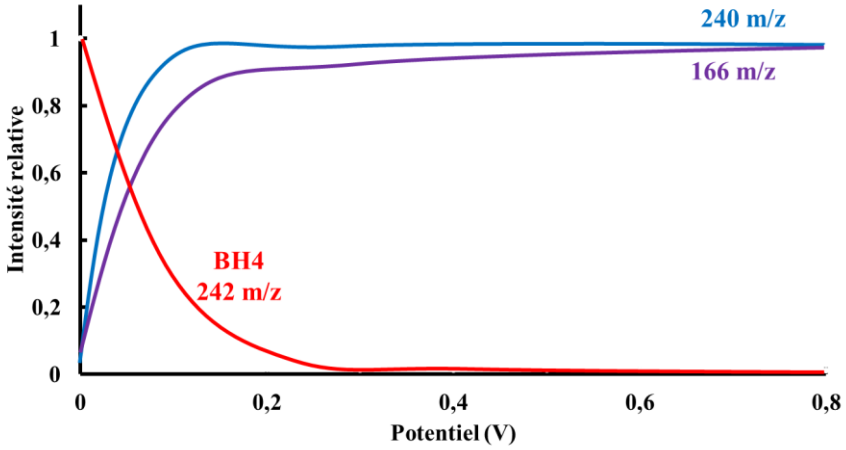


Figure 5.7 : Intensités relatives de l'ion m/z 242 (BH4) et des ions m/z 240 et m/z 166 à pH 2,3, et en fonction du potentiel.

La figure 5.8a montre l'électro-oxydation de la BH4 à pH 5,4 en fonction du potentiel. En particulier, nous avons représenté l'évolution des ions m/z 242 (correspondant à la BH4), m/z 240 (correspondant à la BH2 et à la qBH2), m/z 238 (correspondant à la bioptérine), m/z 196 (correspondant à la perte d'une partie de la chaine latérale de la BH2 ou de la qBH2), 166 m/z (correspondant à la dihydroptérine ou (PH2)) et 164 m/z (correspondant à la ptérine (P)) en fonction du potentiel (figure 5.8a). A l'instar de ce qui se passe à pH 2,3, la BH4 s'oxyde davantage avec des potentiels élevés pour donner l'ion 240 m/z. L'intensité de l'ion 240 m/z augmente progressivement au fur et à mesure que l'on augmente le potentiel. Toutefois, à partir de 500 mV, l'intensité de ce pic diminue progressivement témoignant d'une transformation progressive au-delà de ce potentiel. L'intensité des ions 196 m/z et 166 m/z suit à peu près la même tendance que celle de l'ion 240 m/z. La présence des fragments 196 m/z et 166 m/z permet de confirmer la coexistence des molécules qBH2 et BH2 durant l'électro-oxydation. Ainsi, contrairement à pH 2,3, à pH 5,6 on assiste ici à l'isomérisation relativement rapide d'une partie de la qBH2, probablement favorisée par une déprotonation plus rapide. La diminution de l'intensité de l'ion 240 m/z (somme de l'intensité de la qBH2 et de la BH2) à partir de 500 mV correspond à son oxydation en B (238 m/z) et en P (164 m/z), comme en témoigne l'augmentation de leurs intensités respectives. À pH 5,6, la BH2 formée s'oxyde donc en B. La

formation de la P, en revanche, ne peut pas provenir de l'oxydation de la BH2, car aucun ion 164 m/z n'a été trouvé dans les spectres de masse obtenus après électro-oxydation de la des standards BH2 seule (Figure 5.7). La P ne peut donc être formée qu'à partir de la qBH2 qui perd sa chaine latérale pour donner de la PH2 qui s'oxyde ensuite en P. Par ailleurs, la figure 5.8a montre que quel que soit le potentiel, l'oxydation de l'ion 240 m/z ne peut être que partielle à pH 5,6, comme en témoigne la persistance des pics de m/z 240, 196 et 166 à 0,8 V. La présence simultanée de toutes ces espèces explique la déformation du pic de la BH4 observée sur les chromatogrammes correspondants (Figure 5.8b).

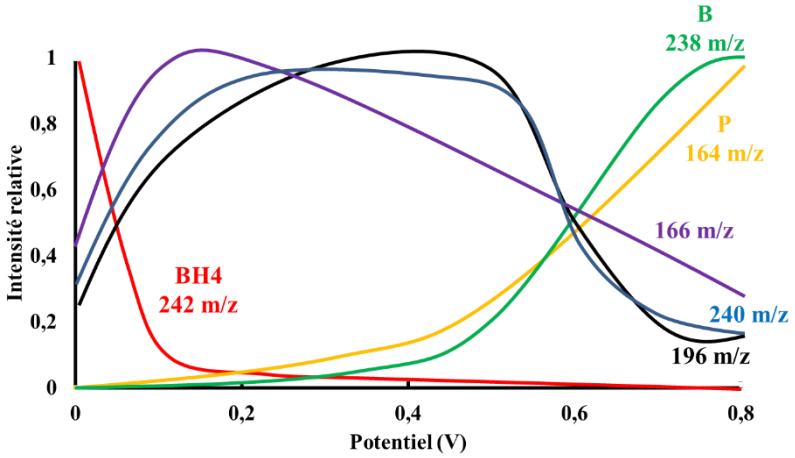


Figure 5.8a : Intensité relative des ions 242 m/z (BH4), 238 m/z (B), 164 m/z (P), 240 m/z, 196 m/z et 166 m/z à pH 5,6, en fonction du potentiel.

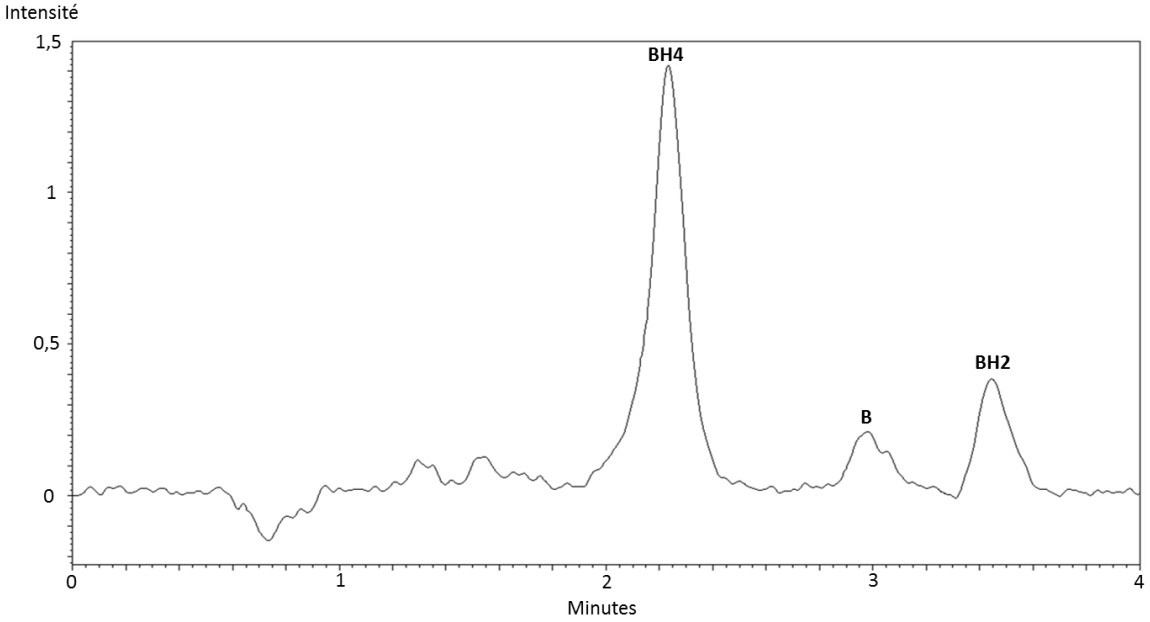


Figure 5.8b : Chromatogramme d'une solution standard de BH4 à 50 nM en LC-MS, après oxydation

électrochimique post-colonne.

L'étude de l'électro-oxydation de la BH4 à pH 7,4 est représentée sur la figure 5.9. On y observe l'évolution des ions 242 m/z, 240 m/z, 166 m/z et 164 m/z en fonction du potentiel.. L'intensité de l'ion 240 m/z augmente de 0 mV à 100 mV, puis diminue progressivement comme celle du fragment 166 m/z. Cependant, les ions 196 m/z et 238 m/z, respectivement caractéristique de la BH2 et de la B, ne sont pas présent sur les spectres de masse. Ainsi, à pH 7,4, durant l'électro-oxydation de la BH4 la qBH2 produite ou présente dans le mélange ne s'isomérise pas en BH2. Ceci confirme les résultats observés dans le chapitre précedent montrant que l'isomérisation de la qBH2 eest beuacoup plus lente à ce pH qu'à pH acide. Cependant, l'intensité de l'ion correspond à la P augmente avec le potentiel montrant que cette éspèce provient plutôt de la perte de la chaine latérale de la qBH2. De plus, la diminution de l'intensité de l'ion 240 m/z est observée à des potentiels plus bas (0,1 mV) à pH 7,4 qu'à pH 5,6 (0,5 mV). Il est donc plus facile d'oxyder l'ion qBH2 à pH 7,4 qu'à pH 5,6, comme observé en voltammétrie cyclique et lors de l'auto-oxydation de la BH4.

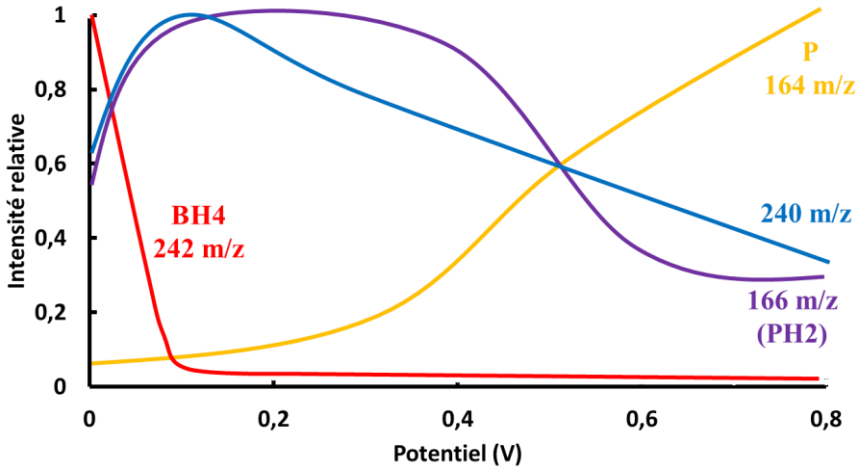


Figure 5.9 : Intensités relatives des ions 242 m/z (BH4), 164 m/z (P), 240 m/z et 166 m/z à pH 7,4, en fonction du potentiel.

Les résultats obtenus à pH 7,4 montrent donc que le produit final d'électro-oxydation de la BH4 est la P. Ainsi, c'est la P qui est dosée durant les dosages cliniques de la BH4, effectués à pH 7,4 [131], à l'aide de l'UHPLC couplée à une cellule électrochimique et à un détecteur de fluorescence (voir chapitre 6). Lors du développement de la méthode de dosage de la BH4 (130), il était attendu que la BH4 s'électro-oxyde en B à pH 7,4 et le rendement de fluorescence de la BH4 a donc été calculé par rapport à la fluorescence de la B. Pour comparer

leur fluorescence respective, une linéarité a été réalisée (Figure 5.10).

Nonobstant, ces résultats montrent que l'électro-oxydation de la qBH2 en PH2 puis en P, n'est que partielle à pH 7,4 (Fig. 5.8) puisque l'intensité du pic à m/z 240 représente environ 40 % de celui de la P (m/z 164) au potentiel le plus élevé. Ces résultats expliquent le rendement observé, ne dépassant pas 45 %, lors du dosage de la BH4 par fluorescence après électro-oxydation post-colonne [131].

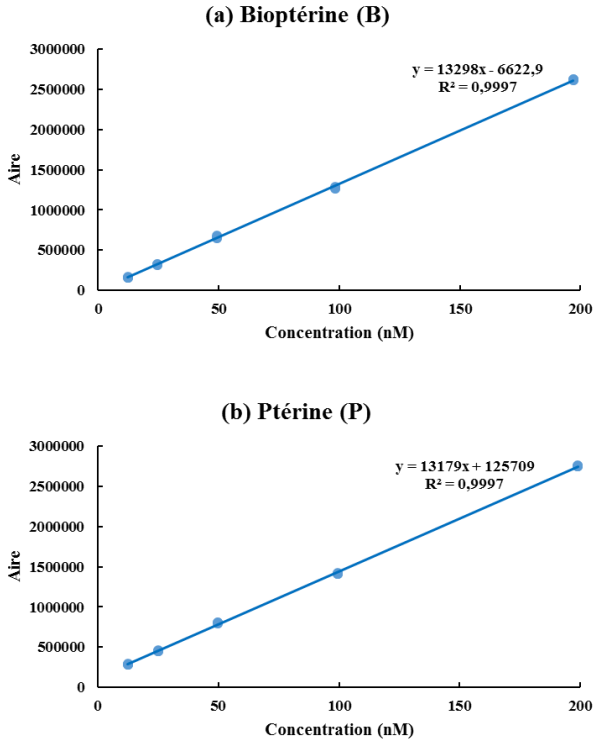


Figure 5.10 : Intensité de la fluorescence en fonction de la concentration de la P et de la B. Les intensités de fluorescence de la B et de la P sont sensiblement identiques car les pentes des droites sont équivalentes. Les rendements d'oxydation de la BH4 calculés précédemment en fluorescence sont donc valables [131].

IV.4. Conclusion générale sur l'auto-oxydation et l'électro-oxydation de la tétrahydrobioptérine

Les études de l'oxydation et de l'électro-oxydation de la BH4 nous ont permis :

1. D'isoler et d'identifier pour, la première fois, l'intermédiaire réactionnel qBH2 pressenti depuis le siècle dernier et dont l'existence n'avait jamais été directement démontrée, à notre connaissance

2. De vérifier les hypothèses de départ quant à l'existence d'un intermédiaire réactionnel non électro-actif à pH acide
3. D'expliquer le rendement d'électro-oxydation de seulement 40 % obervé lors du dosage de la BH4 par fluorescence après électro-oxydation post-colonne [131].

Enfin, l'ensemble de ces résultats nous permet de proposer, pour la première fois, les mécanismes d'électro-oxydation de la BH4 en fonction du pH selon le shéma représenté sur la figure 5.11a.

En fait, l'électro-oxydation de la BH4 en B relève d'un mécanisme complexe de type électrochimique-chimique-électrochimique-chimique (ECEC) selon le schéma suivant (Figure. 5.11a):

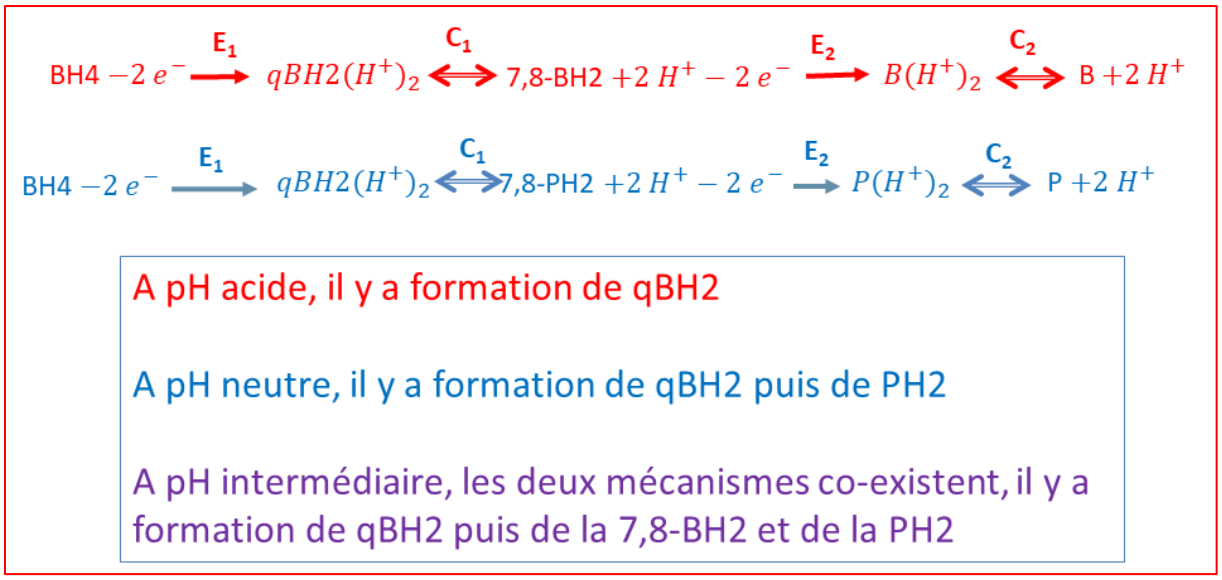


Figure 5.11a. Mécanisme d'électro-oxydation de la BH4 en fonction du pH.

La première étape (E1) est la perte de deux électrons par la BH4 pour donner la forme protonée de la qBH2. La deuxième étape (C1) est l'étape limitante. Il s'agit d'un équilibre chimique entre la forme protonée de la qBH2 et la 7,8-BH2. Dans cet équilibre, il y a isomérisation concomitamment à la libération de deux protons. La troisième étape (E2) correspond à l'oxydation de la BH2 en B sous sa forme protonée. Enfin, la dernière étape (C2) est un équilibre chimique entre la B et sa forme protonée.

La figure 5.11b représente les différentes étapes de l'électro-oxydation et de la fragmentation des différentes espèces étudiées en fonction du pH.

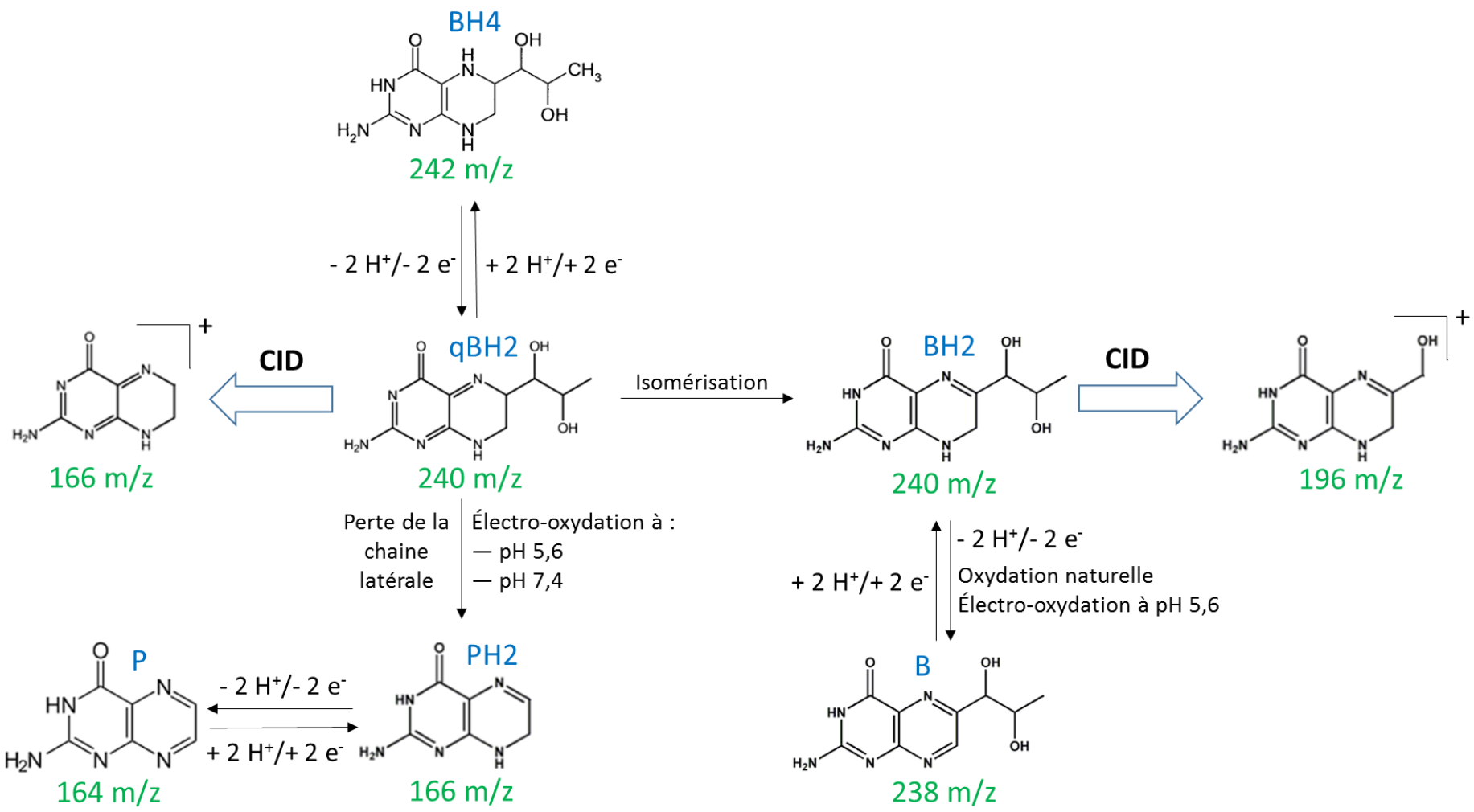


Figure 5.11b : Schéma récapitulatif du mécanisme d'électro-oxydation et de fragmentation de la BH4

Chapitre V : Développement et validation d'une méthode de dosage simultané des métabolites de la dopamine, de la sérotonine et des ptérines par chromatographie liquide couplée à une détection séquentielle électrochimique et fluorimétrique (article publié)

De nombreuses erreurs innées du métabolisme (EIM) affectant la synthèse, la dégradation et le transport de la dopamine et de la sérotonine ont été recensées dans la littérature (voir le chapitre II). Ces EIM de la dopamine et de la sérotonine sont principalement dues à un déficit enzymatique, ou bien à un défaut dans la synthèse ou la régénération de la BH4 principale cofacteur enzymatique des hydroxylases inetrvenant dans la synthèse de ces amines biogènes. Chaque déficit enzymatique induit un profil biochimique caractéristique dans le LCR. Il est nécessaire de diagnostiquer rapidement les désordres métaboliques de la dopamine, de la sérotonine et de la BH4 afin de mieux prendre en charge l'évolution de la maladie. Pour ce faire, il est impératif de doser les métabolites d'intérêt dans le LCR car le LCR est le seul fluide biologique à refléter l'activité du système nerveux central.

C'est pour cela que des méthodes de dosage des amines biogènes et des ptérines ont été développées. Cependant, les méthodes de dosage actuelles présentent deux inconvénients majeurs :
— elles ne dosent pas directement la BH4 ;
— elles nécessitent 3 étapes chromatographiques : une pour les amines biogènes et 2 autres étapes pour le dosage des ptérines.

Pour améliorer le diagnostic biologique, Pierre GUIBAL a proposé, lors de ses travaux de thèse [130], de doser simultanément les métabolites de la dopamine, de la sérotonine et des ptérines. Toutefois, sa méthode restait à valider.

Cette méthode d'analyse consiste à coupler un chromatographe en phase liquide (LC) avec un détecteur électrochimique (ECD) suivi d'un détecteur fluorimétrique (FD). Le détecteur électrochimique permet de détecter les métabolites de la dopamine et de la sérotonine, et d'oxyder les ptérines. Ce qui permet de détecter simultanément les ptérines en fluorescence, car seule la forme oxydée fluoresce. Le mécanisme d'auto et d'électro-oxydation de la BH4 proposés au

chapitre précédent permet de mieux comprendre les différentes étapes de ce dosage, notamment le rendement d'oxydation des ptérines.

Cette méthode d'analyse requiert une phase mobile à pH 5,2 ou bien à pH 7,4. Lorsqu'une phase mobile à pH 5,2 est utilisée, les ptérines dosées sont la N, la NH2, la B et la BH2. Ceci est largement suffisant pour établir un diagnostic médical. A pH 7,4, il est possible de doser en plus la BH4. Le dosage de la BH4 n'est en fait nécessaire que pour des études pharmacologiques.

Nous avons donc repris les travaux de Pierre GUIBAL pour développer une méthode permettant de doser simultanément les métabolites de la dopamine, de la sérotonine et des ptérines, en moins de 10 minutes, et ce, à l'aide du même système chromatographique (UHPLC-ECD-FD). Comme étape de préparation de l'échantillon, cette méthode nécessite une simple filtration pour éliminer les protéines présentes dans le liquide céphalorachidien (LCR) avant injection dans le chromatographe.

Après avoir validé la méthode à pH 5,2 puis à pH 7,4, nous avons analysé 1650 échantillons de LCR (âgés de 1 jour à 83,5 ans avec une médiane de 3,97 ans) prélevés soit chez de jeunes patients hospitalisés dans le Service de Neuropédiatrie de l'hôpital Armand Trousseau (APHP), soit chez des adultes hospitalisés dans le Service de Neurologie du groupe hospitalier Pitié-Salpétrière (APHP), afin d'établir les valeurs de référence des métabolites étudiés en fonction de l'âge. Cette méthode nous a permis également d'identifier 19 cas de déficits enzymatiques et 115 cas de syndrome d'activation auto-immune.

Outre l'utilisation quotidienne pour le diagnostic des maladies métaboliques associées à des troubles neurologiques, notamment celles se manifestant par des troubles du mouvement et du comportement, chez des patients hospitalisés dans la plupart des Services de Neurologie du territoire national, cette méthode nous a permis d'être sollicités par des partenaires nationaux et internationaux pour collaborer sur l'étude des ptérines dans différents domaines. C'est ainsi que nous avons analysés, par exemple, des séries d'échantillons céphalorachidiens et tissulaires, chez l'animal en collaboration avec :

— le laboratoire NutriNeurO de l'INRA de Bordeaux ;

— et le laboratoire de l'Université d'Ottawa (Canada).

Ces deux collaborations nous ont permis d'étudier l'influence des lipopolysaccharides (LPS)

sur la synthèse de la BH4.

En outre, nous avons analysés des séries d'écantillons de LCR prélevés chez des patients HIV-positifs suivis dans le département des sciences médicales de l'université de Torino (Italie), afin d'explorer les mécanismes des troubles neurologiques associés à cette maladie virale. Ce travail a fait l'objet d'une communication affichée qui a reçu le prix du meilleur poster au 16e congrès européen sur le SIDA (*16th European AIDS Conference*).

L'ensemble des travaux de développement et de validation de cette méthode de dosage a fait l'objet d'une publication dans la revue ACS Omega reportée dans ce chapitre.

Article : Diagnostic rapide en une seule étape des désordres métaboliques de la sérotonine et de la dopamine

Single-step rapid diagnosis of dopamine and serotonin metabolism disorders

Aurélien Lo,[1] Pierre Guibal,[1] Diane Doummar,[2] Diana Rodriguez,[2] Jean-Yves Hautem,[2] Rémy Couderc,[2] Thierry Billette De Villemeur,[2] Emmanuel Roze,[3,4] Pierre Chaminade,[1] and Fathi Moussa*,[1,2]

[1] Letiam, Lip(Sys)², EA7357, IUT d'Orsay, Université Paris Sud, Plateau de Moulon. 91400 Orsay, France

[2] Services de Neuropédiatrie et de Biochimie, Groupe Hospitalier Trousseau − Laroche − Guyon, 26 avenue du Dr Arnold Netter, 75012 Paris, France

[3] Department of Neurology, Pitié-Salpêtrière Hospital, AP-HP, 75013 Paris, France

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

Abstract

Early diagnosis of dopamine and serotonin metabolic defects is of importance notably because of the availability of therapeutic strategies able to prevent the associated progressive brain dysfunction. The diagnosis of these diseases relies on the determination of monoamine metabolites and pterins in cerebrospinal fluid (CSF). Current methods involve at least two HPLC runs of CSF analysis. The first one is devoted to the quantification of dopamine and serotonin metabolites and the second one to the quantification of pterins.

Here we describe a single-step method to measure monoamine neurotransmitter metabolites and pterins of interest in less than 10 minutes by UHPLC coupled to sequential coulometric oxidation and fluorescence detections.

All target compounds were quantified in CSF with a small volume (50 µL), and a single filtration step for sample preparation and analysis. After validation, the proposed method was applied to the determination of age-related reference ranges in CSF of target compounds from a series of 1372 samples collected in France from 2008 to 2014. In the same period, the results obtained for 18 CSF samples from patients with known neurotransmitter disorders and 115 CSF samples with known immune system activation confirmed the expected pattern of changes in monoamine metabolites and pterins.

KEYWORDS: dopamine, serotonin, neurotransmitters, pterins, diagnosis, UHPLC.

Introduction

Since the description of the Segawa syndrome also known as dopa-responsive dystonia, several neurotransmitter inherited metabolic disorders including biosynthesis, breakdown, or transport defects of dopamine and serotonin have been reported.[1-3] Inherited defects leading to these metabolic diseases have been described or predicted at the level of each enzyme involved in the metabolism of dopamine and serotonin (Fig. 1). [1-3]

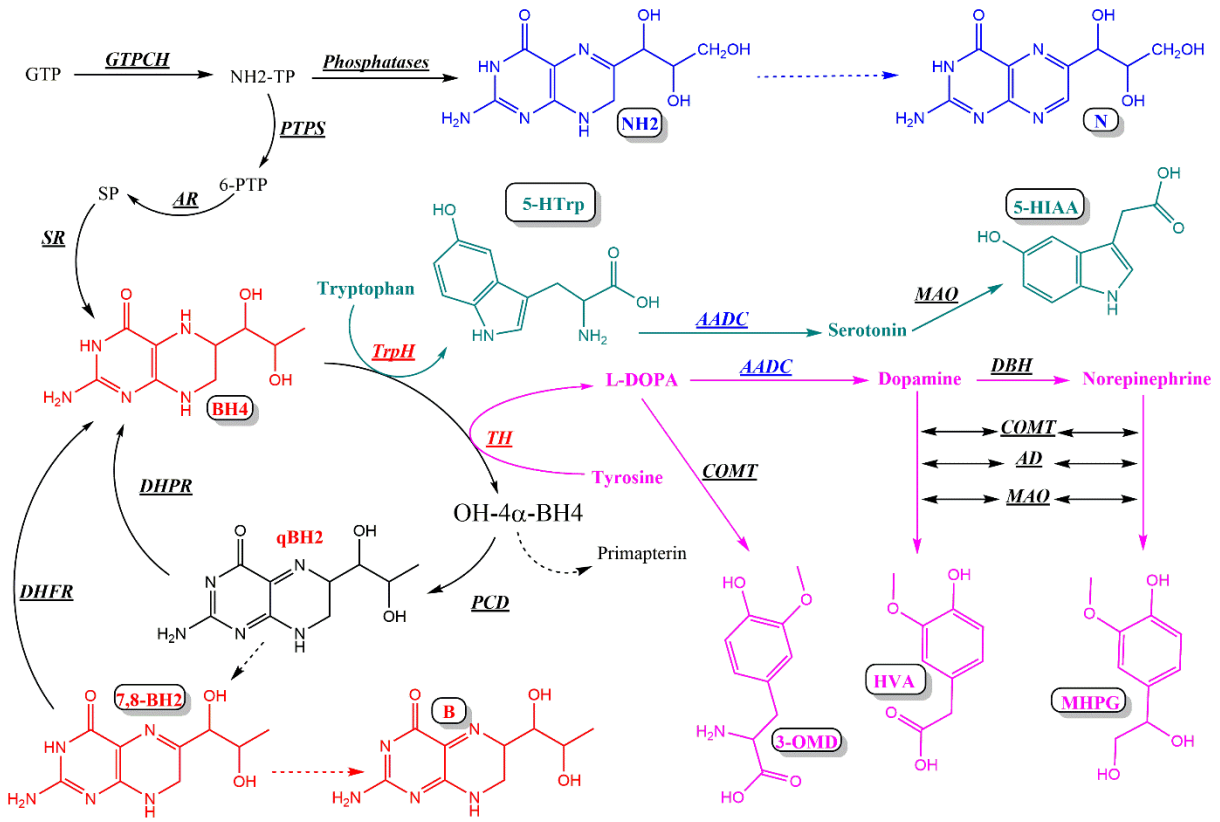


Figure 1: Tetrahydrobiopterin (BH4) and monoamine neurotransmitter metabolism.
GTP (guanosine triphosphate); GTPCH (guanosine triphosphate cyclohydrolase); NH2-TP (dihydroneopterin-triphosphate); NH2 (dihydroneopterin); N (neopterin); PTPS (6-pyruvoyl-tetrahydropterin synthase); AR (aldose reductase); SR (sepiapterin reductase); BH4 (tetrahydrobiopterin): PCD (pterin-4α-carbinolamine dehydratase); qBH2 (quinonoid dihydrobiopterin); DHPR (dihydropteridin reductase); 7,8-BH2 (dihydrobiopterin); DHFR (dihydrofolate reductase); B (biopterin); TrpH (tryptophan hydroxylase); 5-HTrp (5-hydroxytryptophan); AADC (aromatic amino-acid decarboxylase, cofactor: pyridoxal phosphate); MAO (monoamine oxidase); 5-HIAA (5-hydroxyindoleacetic acid); TH (tyrosine hydroxylase); L-DOPA (L-dihydroxyphenylalanine); DBH (dopamine β-hydroxylase); COMT (catechol-O-methyltransferase); AD (aldehyde dehydrogenase); 3-OMD (3-ortho-methyl DOPA); HVA (homovanillic acid); MHPG (3-methoxy-4-hydroxyphenylglycol). (Dashed arrows: nonenzymatic.)

Tetrahydrobiopterin (BH4), the co-factor of aromatic amino-acid hydroxylases, plays a pivotal role in the synthesis of dopamine and serotonin (Fig. 1).[4-6] Hence defects in biosynthesis or regeneration of BH4 result in several dopamine and serotonin metabolic disorders. Each of these conditions exhibits a characteristic cerebrospinal fluid (CSF) profile of dopamine and serotonin precursors and metabolites (Table 1).[4-6]

Table 1: Changes in CSF neuroransmitter metabolites and pterins concentrations in disorders of dopamine and serotonin metabolism (According to ref. 4-6). *Phe (phenylalanine as determined in plasma). N (normal); GTPCH AR (GTP-cyclohydroxylase deficiency autosomal recessive); PTPS (6-pyruvoyl-tetrahydropterin synthase deficiency); PCD (pterin-4α-carbinolamine dehydratase deficiency); DHPR (dihydropteridine reductase deficiency); GTPCH AD (GTP-cyclohydroxylase deficiency autosomal dominant also known as Segawa syndrome or Dopa-responsive dystonia); SR (sepiapterin reductase deficiency; TH (tyrosine hydroxylase deficiency); AADC (aromatic L-amino acid decarboxylase deficiency: DTDS (dopamine transporter deficiency syndrome).

Enzymatic defect	Phe*	Pterins			Neurotransmitter metabolites					
		BH4	BH2	NH2	HVA	HIAA	HVA/HIAA	3-OMD	5-HTrp	MHPG
GTPCH AR	↑	↓	N	↓	↓	↓	N	N	N	↓
PTPS	↑	↓	N	↑	↓	↓	N	N	N	↓
PCD	↑	↓	N	N	N	N	N	N	N	N
DHPR	↑	↓	↑	N	↓	↓	N	N	N	↓
GTPCH AD	N	↓	N	↓	↓	N or↓	↓	N	N	↓
SR	N	↓	↑	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

As BH4 is also the cofactor of phenylalanine hydroxylase (Fig. 1), BH4 deficiencies can be detected at the time of newborn screening except for autosomal dominant GTPCH deficiencies, certain cases of heterozygote GTPCH deficiencies, and autosomal recessive SR deficiencies, which do not lead to hyperphenylalaninemia (Table 1).[4-6]

Early diagnosis of dopamine and serotonin metabolic disorders is of importance notably because some of these diseases can be well treated.[7-9] In addition to the determination of CSF neurotransmitter metabolites, the etiologic diagnosis of these inherited disorders also require the determination of pterins in CSF, notably dihydro-neopterin (NH2), the precursor of BH4, and 7,8-dihyro-biopterin (BH2), the stable oxidized form of the latter (Fig. 1, Table 1).[1-6]

To sum it up, the differential diagnosis of dopamine and serotonin metabolic disorders

requires the determination of homovanillic acid (HVA), 5-hydroxyindoleacetic acid (5-HIAA), 3-ortho-methyl-di-hydroxyphenylalanine (*3-OMD*), 5-hydroxytryptophan (*5-HTrp*), NH2, and BH2 in the CSF (Table 1). To this purpose, current methods 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.[10-19]

As dopamine and serotonin metabolites are oxidizable compounds, high performance liquid chromatography coupled to electrochemical detection (HPLC-ECD) is commonly used to quantify them in the CSF.[10-17] More recently, some LC-MS methods have been also implemented.[19-20] On the other hand, CSF pterin concentrations are in the low nM range at basal levels. Thus, their direct quantification does require an HPLC method coupled to fluorescence or MS detections.[10, 11, 1, 17, 19]

Here we describe a single-step ultra-high performance liquid chromatography (UHPLC) method for the rapid diagnosis of dopamine and serotonin metabolic disorders. Neurotransmitter metabolites as well as pterins of interest are determined in a single step in less than 10 minutes by UHPLC coupled to sequential electrochemical and fluorescence detections.

After validation, the proposed method requiring only a single filtration step for sample preparation and analysis was applied to the analysis of a series of 1650 CSF samples including several cases of known neurotransmitter disorders and known immune system activation.

Results and discussion

Method development. Preliminary HPLC separations were achieved using the same polar embedded C18 column (4.6 x 150 mm, 3 µm, Atlantis T3) previously used for neurotransmitter metabolites[17] and pterins separation.[18] In contrast to classical Si-C18 columns, this stationary phase allows the separation of polar compounds including both neurotransmitter metabolites and pterins without using an ion pairing reagent. [18]

Systematic investigation of the effects of pH, mobile phase composition, and temperature allowed us to obtain a separation with high efficiency and high resolution of all target compounds in less than 50 min (Fig. S1A). High resolution is mandatory for the specific electrochemical detection and quantification of neurotransmitter metabolites because real CSF samples exhibit several unknown additional peaks (Fig. S1C). The electrochemical detector also served as a post-column coulometric oxidation reactor for oxidation of reduced pterins prior to sequential

fluorescence detection (Fig. S1B, D). Hence, this method allows the simultaneous separation of both neurotransmitter metabolites and pterins in a final run-time of 50 min.

In order to speed up the separation, we converted the HPLC method to UHPLC. For this purpose we used an Acquity UPLC HSS T3 column (2.1 x 100 mm, 1.8 µm) with the same mobile phase as for the HPLC separation, delivered at a flow rate of 0.4 mL/min at 30 °C. This conversion resulted in the separation of the whole of analytes in less than 8 min (Fig. 2) with a final run time of 10 min for real samples thus allowing the complete elution of possible unknown peaks eluting after the HVA peak (Fig. 2C).

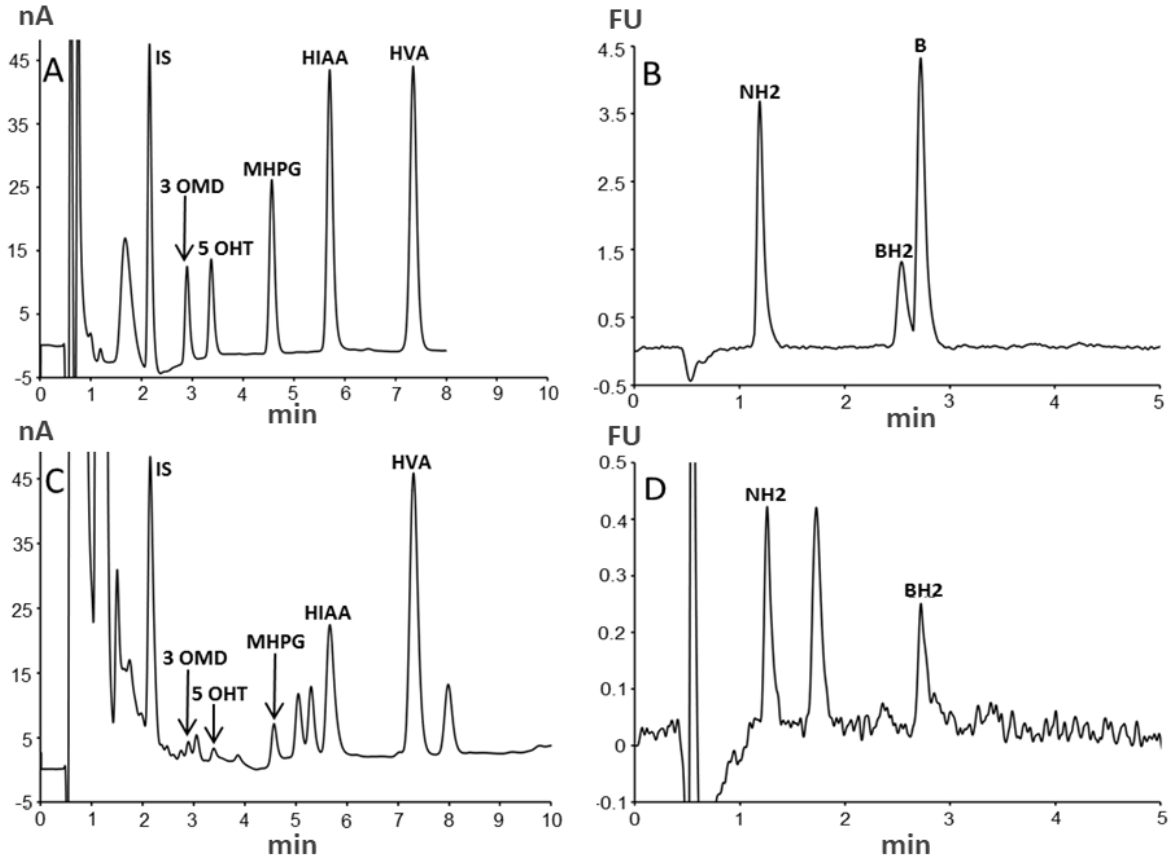


Figure 2: Chromatographic profiles obtained by the proposed method of (A-B) a standard mixture with (A) electrochemical detection followed by (B) sequential fluorescence detection and (C, D) a CSF sample of a patient from the control group with (C) electrochemical detection and (D) sequential fluorescence detection. Chromatographic conditions: stationary phase = Atlantis T3 (4.6 x 150 mm, 3 µm) column; mobile phase: pH 5.2, 0.05 M citrate buffer and methanol (97/3, v/v). Flow rate was set at 0.5 mL/min at 30°C. The metabolites present in the effluent are measured at the second electrode with a potential set at 400 mV while the fluorescence of pterins is sequentially measured at 450 nm after post-column electro-oxidation at the same potential and excitation at 350 nm. (FU: arbitrary fluorescence units).

The best separation in terms of efficiency and resolution is obtained with a mobile phase consisting of a mixture of pH 5.2, 0.05 M citrate buffer and methanol (97/3, v/v). The pH of the mobile phase should not fall below 5.2, otherwise the run-time becomes too long. Increasing the pH above 5.4 results in shortening the run-time together with a loss of resolution. The concentration of methanol should not vary by more than 1%. Increasing methanol concentration above 4 % results in shortening the run-time with a concomitant loss of resolution. Decreasing the % of methanol below 2% results in a dramatic loss of efficiency and resolution. In the same way, the best efficiency and resolution were obtained at 30 °C.

We checked the absence of possible endogenous interferences including dihydroxy-phenyl-alanine (DOPA), dopamine, dihydoxy-phenylacetic acid (DOPAC), serotonin, and 3 methoxy-tyramine, which is the intermediate degradation product of dopamine leading to HVA. All these metabolites are oxidizable compounds that could co-elute with the targeted metabolites. Figure S2 shows that under our conditions, there is no co-eluting peak with the used internal standard (IS). Dopamine elutes before the IS with a resolution higher than 1.3. Although serotonin and 3MT are not separated these metabolites cannot interfere with 5HIAA because their co-eluting peaks are well separated from the latter with a resolution higher than 1.4.

Proposed method. Taken together, these analytical developments led us to adopt the following chromatographic conditions: separations were performed on an Acquity UPLC HSS T3 (2.1 x 100 mm, 1.8 µm) column protected by an ACQUITY UPLC HSS T3 VanGuard pre-column (2.1 mm x 5 mm, 1.8 µm)**,** with a mobile phase consisting of pH 5.4, 0.05 M sodium citrate/methanol (97/3, v/v) delivered at a flow rate of 0.5 mL/min at 30 °C. The electrochemical detection of neurotransmitter metabolites is performed at + 600 mV at the second electrode and the sequential fluorescence detection of pterins was performed at λex 350 nm and λem 450 nm after coulometric oxidation at the same potential. The final run time was 10 min.

Method evaluation. The identification of metabolites and pterins in authentic CSF samples was based on their retention factors, and their electrochemical and fluorescence properties as well as proportional increases of corresponding peak areas after spiking with known amounts of each target compound (Table S2).

All unknown peaks are well separated from the target metabolites under our chromatographic conditions. After more than 8 years of experience and more than 1500 handled CSF samples we never observed any interfering peak at the level of the IS.

In some rare cases, probably due to the treatment, an interfering peak may co-elute with 3-OMD. In these cases, this peak disappears just by decreasing the potential of the working electrode from 0.6 V to 0.4 V. It is then necessary to calibrate the method at 0.4 V in order to determine the 3-OMD concentration. Nevertheless, such an interfering peak cannot influence the diagnosis, because the diagnosis is not only based on the variation of a metabolite alone. As shown in table 1, the diagnosis is rather based on the modification of the CSF metabolic profile.

Table S1 summarizes linearity data and LOQs for target analytes. The method was linear for all compounds over the calibration range with a correlation coefficient (R^2) higher than 0.99 for all instances. However, the intercepts are negative in all instances. Hence, with this regression model it will be not possible to make a prediction for a point that is outside the range of the data.
Within-run and between-run precision for standard solutions did not exceed 9.7 % for all instances (Table S2). Within-run precision for authentic CSF samples spiked with known amounts of metabolites and pterins did not exceed 9.5 % with a recovery higher than 91.8% for all instances. For each compound, the recovery was determined after analyzing a pool of authentic CSFs before (P0) and after (Ps) spiking it with a known amount of the corresponding analyte, by calculating the ratio: obtained amount (Ps) vs the theoretical amount (Th = P0 + added concentration) that gives [R= (Ps/Th) x 100]. Furthermore, there was no significant differences between within-run precision for spiked CSF samples and standard solutions as evidenced by p-values greater than 0.05, with recoveries higher than 91.8 % for all instances (table S2), thus indicating the absence of significant matrix effect. Hence, we used aqueous standard samples rather than authentic pooled CSF samples for method calibration.

We checked the stability of the samples at 10 °C in the dark in the injector after several hours. We did not observe significant differences during 24 h. After 24 h, NH2 concentrations decreased of about 15% while BH2 concentrations increased of about 10% of their respective initial values (Fig. S3). Hence, using this method, the samples kept at 10 °C in the dark should be analyzed within 24 h following defrosting.

In the same way, we checked the stability of the samples frozen at −80 °C immediately after collection. As compared with the initial values determined at day 4 after collection (and

extemporaneous defrosting), the data obtained for the aliquots of the same samples defrosted after 12 months of storage at -80 °C showed no significant differences . Hence, we avoided adding a preservative agent to the samples thus facilitating the collection procedure.

Age-related reference ranges of neurotransmitter metabolites and pterins in cerebrospinal fluid. Figure 3 shows the distribution of the data obtained with the proposed method for 1516 CSF samples collected from 1386 infants and children aged 1 day to 16 years (median 3.34 years) and 130 patients aged 16.01 to 80 years (median 21 years) without known neurotransmitter disorder or 5 MTHF deficiency.

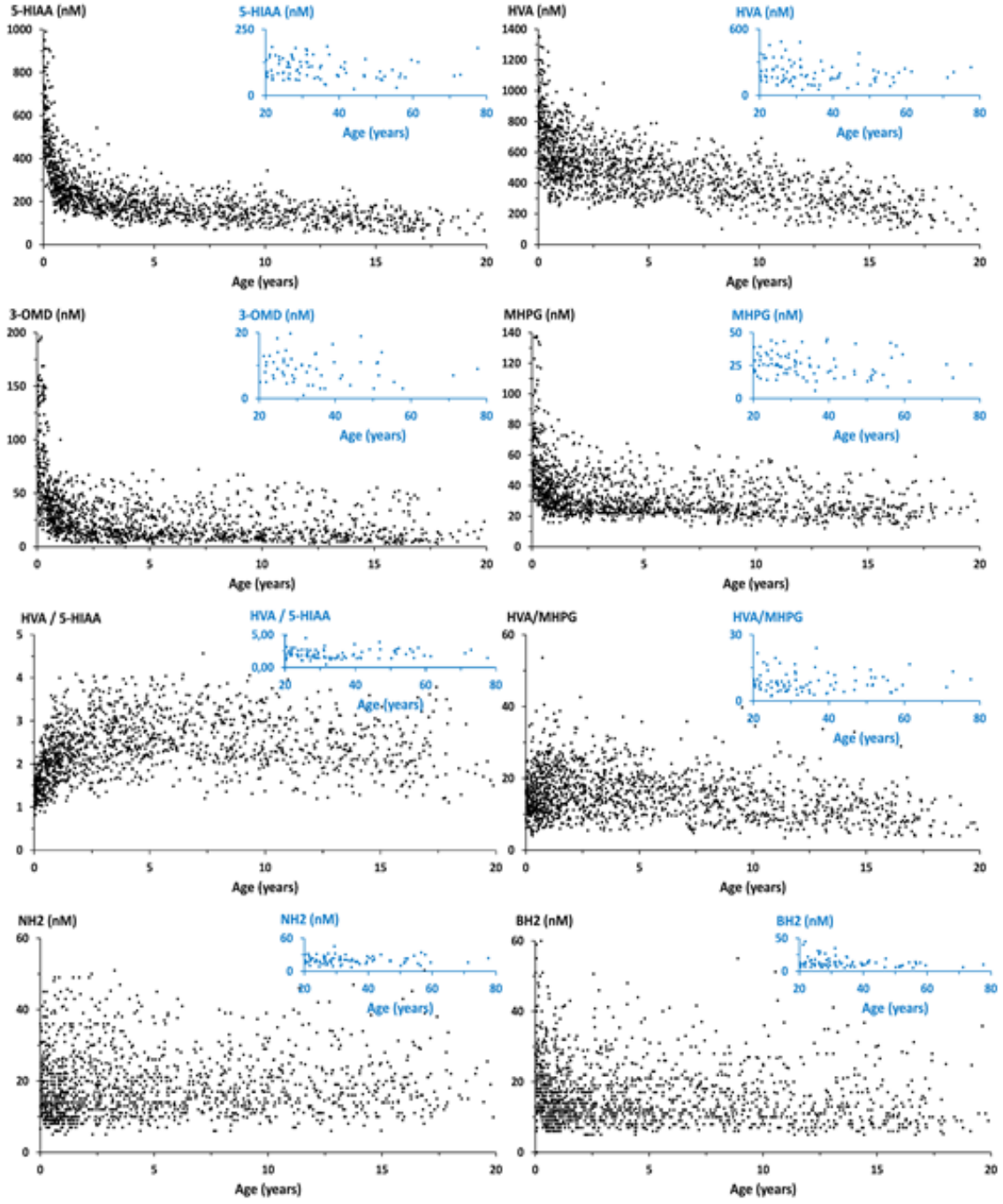


Figure 3: Variation of metabolite concentrations in human CSF with patient age.

A first PCA model was built with HVA, 5HIAA, MHPG, 3OMD, 5OTRP, BH2 and NH2 as variables and 1516 observations remaining after removing the outliers corresponding to the knowing 19 cases of neurotransmitter disorders and 115 cases of immune system activation. Figure 4A shows the score plot where observations are colored according to patient's age, from bleu for the lowest values to red for the highest values. Principal Component (CP) 1 and 2 account for 37 and 17% of the total variance respectively. There is an evolution as a function of the age, however, the overlap of the colored points indicates that it will be difficult to distinguish age intervals.

In a second step, we considered only HVA, 5 HIAA, and MHPG, which are the main metabolites of dopamine, serotonin, and norepinephrine, respectively. The score plot still indicates that there is an obvious evolution with age but it is still difficult to distinguish the age intervals (Fig. S4A). Nevertheless, the loading plot (Fig. S4B) clearly shows that HVA and 5 HIAA are the mains contributors to the principal component 1, and that they are strongly correlated. MHPG also contributes to the principal component 1 but to a less extent. MHPG mainly contributes to the principal component 2 (Fig. S4B). This make sense once we consider the metabolic pathway of these metabolites (Fig. 1). While HVA and 5 HIAA derive from Dopamine and serotonin, which are the products of the same enzyme, namely AADC, MHPG derives from norepinephrine, which depends of the action of an additional enzyme, namely DHB (Fig. 1). This is also true for 3-OMD and 5-HTrp, which are the substrates of AADC but the products of two different hydroxylases, TH and TrpH (Fig. 1). The loading plot (Fig. S4C) obtained in a third step clearly shows that the latter mainly contribute to the principal component 2, which separates them.

In a fourth step we added BH2 and we observed that this parameter is a major outlier, contributing to a third principal component (Fig. S4D). This also make sense as BH2 results from the slow isomerization of qBH2, which is the oxidized intermediate of BH4 the common cofactor of TrpH and TH (Fig. 1). Finally, in a last step we added NH2 and we observed that it also contributes to the third component while it is slightly correlated with BH2. These latter are being separated by the axis of the third component (Fig. 4B). This also make sense once we consider that NH2 is the precursor of BH4 (Fig. 1).

In conclusion, although the PCA model well establishes the evolution of the main metabolites with the age of patients as well as the correlations between these parameters, it remains difficult to distinguish with this model the relevant age intervals and thus to establish the reference ranges.

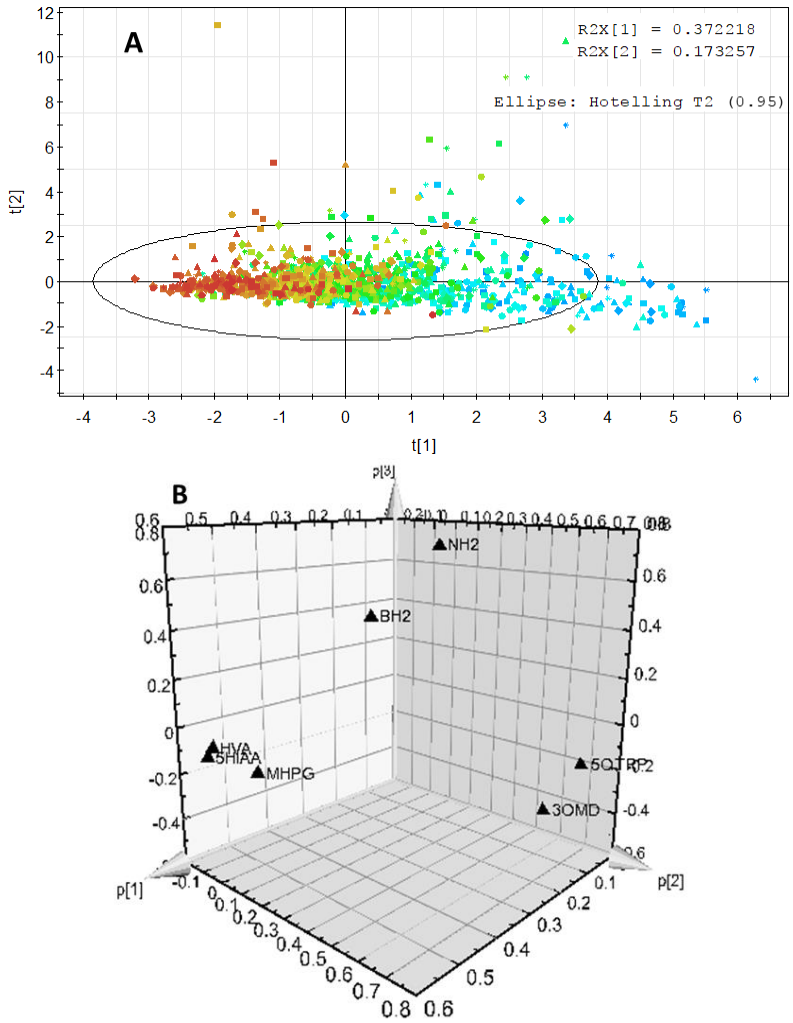


Figure 4. Principal component analysis with HVA, 5HIAA, MHPG, 3OMD, 5OH-Trp, BH2, and NH2 as variables and 1516 observations. (A) Score plot and (B) loading plot.

Hence, we investigated the normality of the data by using both graphical representation (histograms and Q-Q plots) and Shapiro-Wilk or Shapiro-Francia tests depending on the kurtosis.[21] In most cases the data were not normally distributed but they are lognormally distributed as shown by p-value less than 0.001 (Table S3). Nevertheless, we used Pearson correlation coefficient to study the correlation between metabolites concentrations and age.

As expected[16, 18, 22, 23] a negative correlation was observed between most metabolites and age in the whole group of patients (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: $r = -0.1459$, $p < 0.0001$). While HVA/MHPG ratio showed a slight negative correlation with age ($r = -0.1829$, $p < 0.0001$), HVA/HIAA and HVA/3-OMD ratios showed a positive correlation with age ($r = 0.2365$, $p <$

0.0001, and r = 0.0790, p = 0.0157, respectively). In contrast, NH2 did not exhibit any correlation with age (r = 0.0373, p = 0.2613).

In a second step we grouped the patients by age month by month for the first year and year by year for the patients older than one year. We also grouped the patients according to previously published data.[16] Considering a p-value less than 0.05 statistically significant, data were mostly lognormally distributed in all groups older than one month (Table S-3).

Age groups were then compared by using Student's t-test. For HVA and 5-HIAA concentrations, the differences between the groups older than 1 month were significant. However in contrast to previous studies,[16] HVA, MHPG, and BH2 concentrations in the group of newborns younger than one month was not statistically different from the group aged from 1 to 6 months. This discrepancy may be attributed to the lower number of patients included in previous studies.[16] 5-HTrp was found to be less than 12 nmol/L in every CSF sample (Table 2). Nevertheless, the correlation with age among the target metabolites was mostly similar to those previously published.[16, 22]

Irrespective of the age or 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 NH2 also exhibited a slightly positive correlation (r = 0.1241, p = 0.0002). The correlations between HIAA, HVA, and BH2 confirm that BH2 concentration well reflects the BH4 availability in the CSF.

Table 2 summarizes the reference intervals obtained with the proposed method. Except for the patients aged less than one month, which are not different from those aged from 1 to 6 months, the obtained reference ranges are similar to those previously obtained in other countries by classical methods.[16, 22, 23] These results thus strengthen the validation of the proposed method.

Analysis of known cases of dopamine and serotonin metabolism disorders. The proposed method was applied to the diagnosis of several know inborn error of dopamine and serotonin metabolism including two cases of Segawa syndrome, one case of sepiapterin reductase deficiency, three cases of AADC deficiency, one case of dopamine transporter deficiency, one case of PTPS deficiency, eleven cases of tyrosine hydroxylase deficiency, as well as more than one hundred cases of intracerebral immune activation with elevated levels of NH2 (Table 2, Fig. 5).

The obtained results (Table 2) confirmed the expected CSF pattern of changes in pterins and monoamine metabolites in patients.

Table 2: Reference ranges for CSF concentration of neurotransmitter metabolites and pterins. Results are expressed in nM as average (median) and range.

Groups	5-HIAA	HVA	HVA/5-HIAA	3-OMD	MHPG	NH2	BH2
	Mean (med.)						
A (n = 27) **0 - 1 month**	661 (620) 426 -1186	868 (838) 405 - 1430	1.31 (1.37) 0.81 - 1.73	109 (100) 37 - 156	62 (56) 37 - 110	19 (17) 7 - 36	27 (26) 9 - 59
A vs B	p = 0.002	p = 0.111	p = 0.122	p < 0.001	p = 0.172	p = 0.543	p = 0.030
B (n = 166) **1 month - 0.5 year**	468 (441) 185 - 990	726 (700) 274 - 1487	2 (2) 0.8 - 3.7	74 (61) 11 - 250	54 (47) 18 - 138	18 (15) 7 - 65	21 (18) 6 - 69
B vs C	p < 0.001	p < 0.001	p < 0.001	p < 0.001	p < 0.001	p = 0.704	p < 0.001
C (n = 457) **0.5 - 3 years**	249 (235) 111 - 631	555 (539) 174 -1176	2.33 (2.23) 0.79 - 4.95	32 (26) 4 - 209	35 (31) 11 - 106	19 (16) 5 - 50	16 (14) 5 - 51
C vs D	p < 0.001	p < 0.001	p < 0.001	p < 0.001	p < 0.001	p = 0.667	p = 0.758
D (n = 328) **3 - 7 years**	179 (170) 46 - 583	473 (463) 62 -1185	2.78 (2.71) 1.29 - 5.96	21 (15) 3 - 179	30 (26) 8 - 67	19 (17) 6 - 69	16 (113) 5 - 48
D vs E	p < 0.001	p < 0.001	p = 0.159	p = 0.490	p = 0.490	p = 0.498	p = 0.666
E (n = 222) **7 - 11 years**	156 (149) 57 - 406	402 (386) 81 - 815	2.69 (2.63) 1.20 - 4.61	20 (13) 4 - 113	30 (27) 14 - 66	19 (17) 6 - 40	16 (14) 6 - 55
E vs F	p < 0.001	p < 0.001	p < 0.001	p = 0.069	p = 0.003	p = 0.669	p = 0.009
F (n = 186) **11 - 16 years**	132 (129) 46 - 276	309 (300) 67 - 669	2.41 (2.34) 0.85 - 5.74	17 (12) 3 - 69	27 (10) 12 - 71	19 (17) 6 - 47	14 (12) 5 - 41
F vs G	p < 0.001	p < 0.001	p < 0.001	p = 0.656	p = 0.913	p = 0.100	p = 0.421
G (n = 130) **over 16 years**	113 (112) 40 - 186	241 (215) 65 - 488	2.20 (2.07) 1.04 - 4.90	18 (12) 3 - 55	27 (25) 12 - 59	21 (20) 7 - 51	14 (11) 5 - 45
Known metabolic disorders (n = 18) and elevated levels of NH2 (n =115)							
Segawa (n = 2) **4.2 and 5.6 years**	10 - 17	15 - 20	1.50 - 1.18	2 - 3	4 - 6	2 - 4	1 - 3
SR (n = 1) **27.88 years**	21	56	0.72	25	3	35	67
TH (n = 11) **0.01 - 18.63 years**	212 (189) 104 - 405	129 (117) 44 - 256	0.62 (0.62) 0.31 - 1.1	40 (22) 5 - 167	35 (33) 7 - 71	15 (12) 8 - 49	28 (26) 6 - 58
AADC* (n = 3) **0.46 - 2.40 years**	9 (3) 2 - 23	15 (15) 3 - 27	5.55 (7.50) 0.15 - 9	1939 (2500) 252 - 3065	28 (25) 7 - 50	15 (17) 10 - 55	21 (21) 14 - 47
PTPS (n = 1) **24.46 years**	15	109	7.38	29	11	4	5
DTDS (n = 1) **0.92 year**	302	2426	8.03	96	38	48	7
Elevated levels of NH2 **(n = 115)** **0.02 - 60.64 years**	258 (232) 26 - 732	498 (490) 23 - 1091	2.09 (2.11) 0.49 - 3.84	44 (29) 3 - 116	34 (28) 4 - 76	316 (184) 90 - 2500	38 (24) 21 - 91

* For AADC, the main concentration of 5-Htrp is 505 nM, with a median of 316 nM (range: 300 – 900 nM).

Otherwise, the proposed method allows the unambiguous detection of NH2 increase, which is a known biomarker of immune system activation.[24] It is worth noting that about 7 % of the analyzed CSF samples exhibited elevated level of NH2. Hence, the proposed method is a useful tool for the diagnosis of not only neurotransmitter disorders but also all cases of intracerebral immune system activation, which appear much more frequent than the former in the studied population.

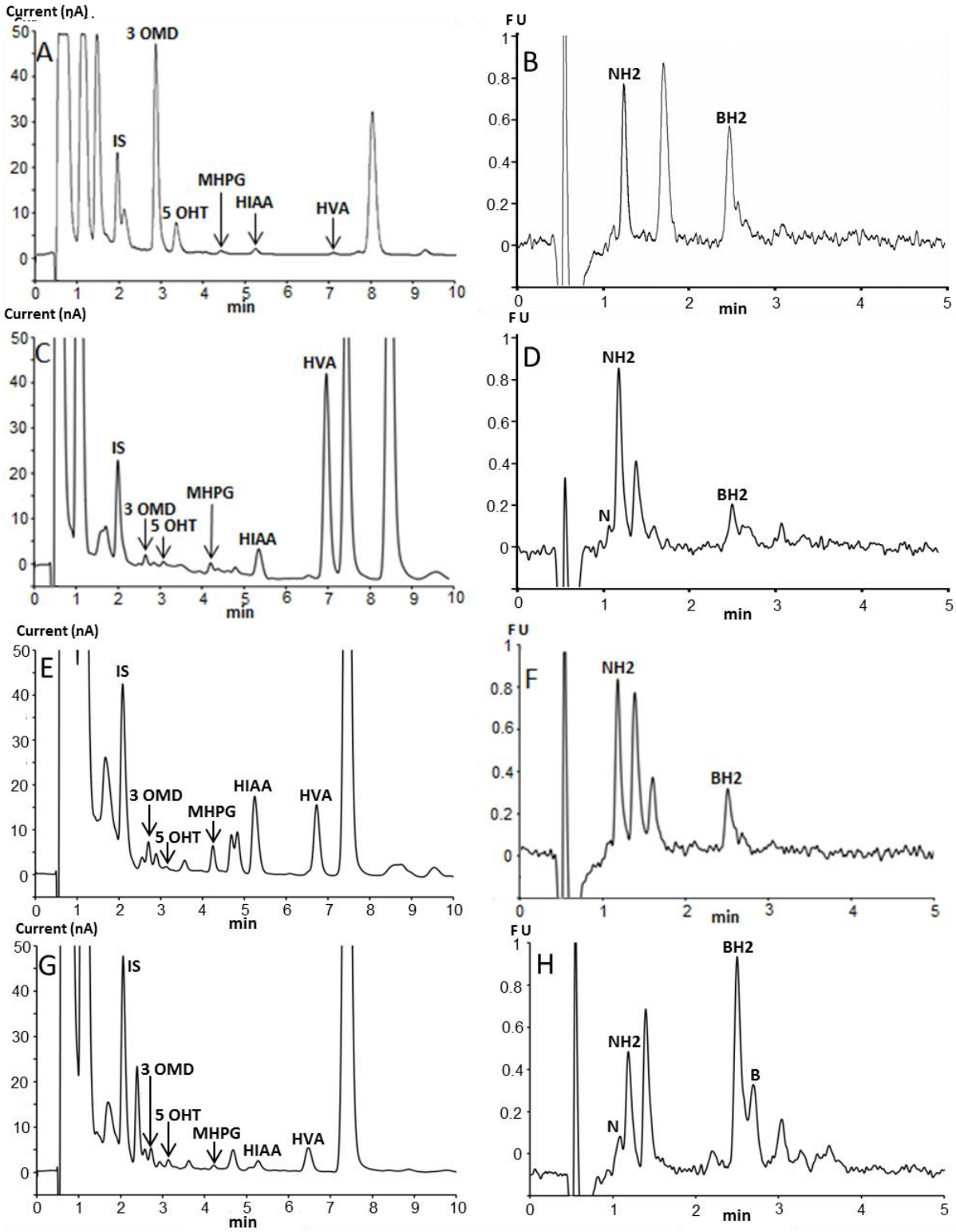


Figure 5: Chromatographic profiles obtained with the proposed method for some patients with known neurotransmitter disorders. (A, B) AADC deficiency; (C, D) DTDS; (E, F) TH deficiency; and (G, H) SR deficiency. The CSF sample (C) has been diluted twice before injection. The injection volume was 25 µL for A and C, and 50 µL for E and G.

Simultaneous determination of BH4. Although BH4 determination is not mandatory for the etiologic diagnosis of neurotransmitter disorders, the determination of this cofactor may be interesting for metabolism and pharmacokinetics studies.[18]

As BH4 cannot be detected at pH 5.4 and can be detected at pH 7.4,[18] we later developed a variant of the proposed method able to simultaneously determine BH4. In fact, this variant only differs in the pH of the mobile phase, pH 7.4 instead of pH 5.4 as used in the proposed method.

Setting the pH of the mobile phase at 7.4 resulted in the simultaneous detection of BH4 in addition to all target compounds (Fig. 6) with a good resolution but with different selectivity as reflected in the changes of the elution order. Under these conditions, the optimum sensitivity is obtained at an oxidation potential of +400 mV (first working electrode) for 5-HTrp and 5-HIAA (Fig. 6A) and an oxidation potential of +600 mV (second working electrode) for 3-OMD, HVA and MHPG (Fig. 6B). The signal decrease for 5-HTrp and 5-HIAA at +600 mV is linked to the consumption of a large part of these metabolites at the first electrode set at +400 mV. In order to optimize the transformation of BH4 into its fluorescent counterpart it is mandatory of using both electrodes for post-column oxidation of this pterin.

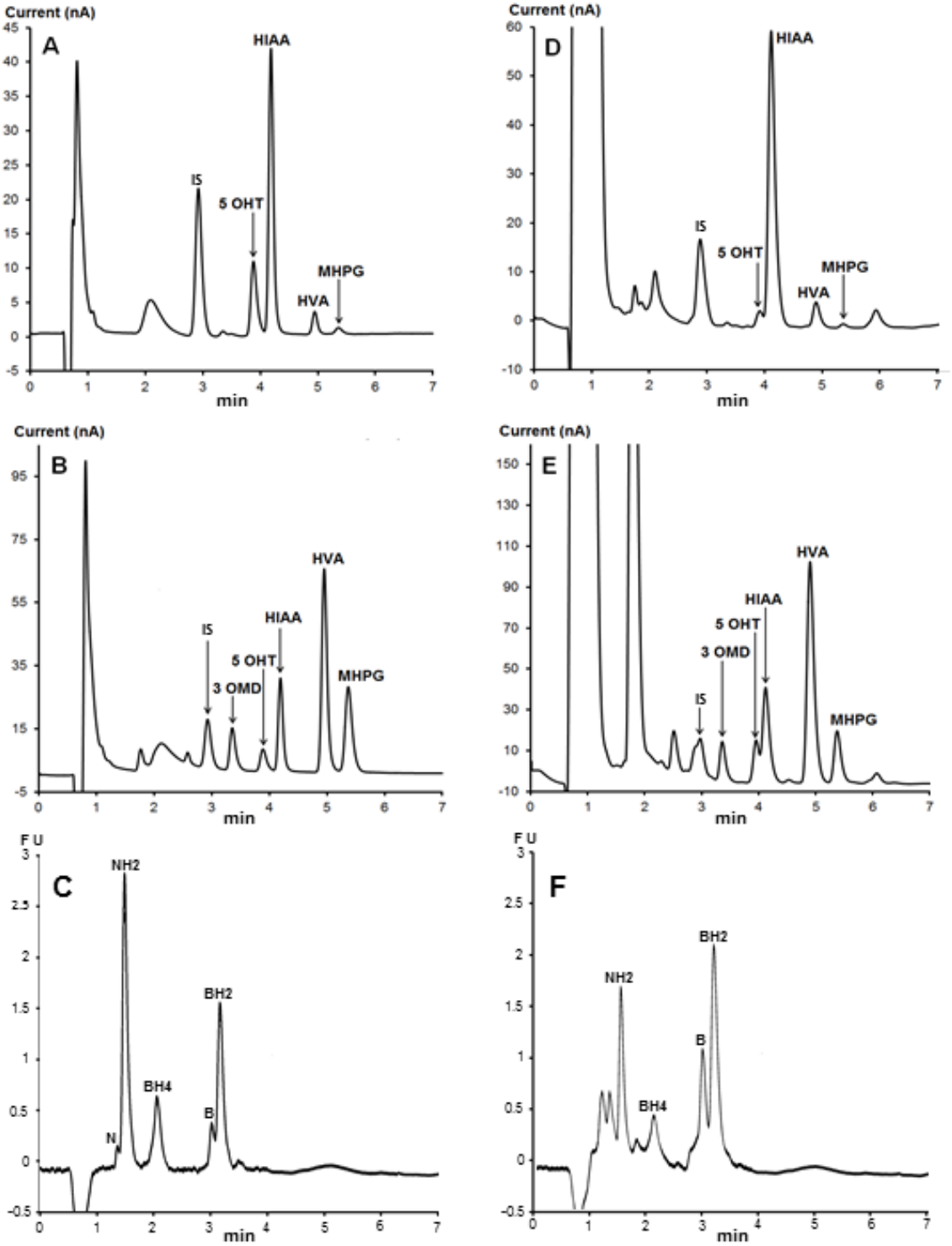


Figure 6: Chromatographic profiles of a standard mixture and a CSF sample obtained with a pH 7.4 mobile phase. (A – C) Standard mixture with electrochemical detection at (A) +400 mV for the first electrode, (B) +600 mV for the second electrode followed by (C) sequential fluorescence detection. (D –F) CSF sample with electrochemical detection at (D) +400 mV for the first electrode, (E) +600 mV for the second electrode followed by (F) sequential fluorescence detection. (See Fig. 2 for the other chromatographic conditions).

Method evaluation showed that the analytical performances of this variant method operating at pH 7.4 are similar to those of the proposed method operating at pH 5.4 (Table S4). Also, the results obtained with the variant operating at pH 7.4 for real CSF samples (n = 50) showed a good correlation with those obtained with the proposed method operating at pH 5.2 with a correlation coefficient higher than 0.99 for all target metabolites and pterins (Fig. S5).

As the stability of the CSF samples at pH 7.4 is limited to 6 hours in an auto-sampler at 10 °C [18] instead of 24 hours for the proposed method and because the stationary phase is less stable at pH 7.4 than under the conditions of the proposed method operating at pH 5.2, we recommend using the proposed method for routine diagnosis of neurotransmitter disorders. Nevertheless, the derived method operating at pH 7.4 can be used for the simultaneous quantification of BH4 if needed as well as for checking the results of any CSF sample suspected to contain some potential interferences. In such cases, the difference in selectivity observed at pH 7.4 may help detect the possible unexpected exogenous interfering compounds co-eluting with the targeted compounds at pH 5.4 and *vice versa*.

After more than 6 years of experience, the only possible interfering peaks we observed are those present on the chromatograms of figures 2, 5, and 6. As shown in these figures all unknown peaks are well separated from those of the targeted metabolites.

In fact, the only possible interferences that may occur are only unexpected exogenous interferences linked to unknown treatments. If there are some interferences co-eluting with analytes and resulting in one peak, which is obviously possible for any method of separation of complex mixtures, it would be easy to suspect their presence. Indeed, as the diagnosis of neurotransmitter disorders is based on characteristic CSF patterns (Table 1) such an interference would results in an unusual doubtful metabolic profile. Hence an alternative method of separation with a different selectivity may be helpful to highlighting such an interference.

Conclusions

An UHPLC method for one-step rapid diagnostic of inborn errors of metabolism of dopamine and serotonin is presented. The use of an embedded-polar-group bonded Phase (Aquity HSS T 3) and sequential coulometric and fluorescence detections allows the simultaneous quantification of neurotransmitter metabolites and pterins of interest. All target neurotransmitter

metabolites and pterins were quantified in a small volume of CSF (50 µL) using a single filtration step for sample preparation and analysis.

As the samples are stable without adding any antioxidant agent for 24 h in an auto-sampler at 10 °C and as the run time is 10 min, the number of samples including calibrators and quality control that can be analyzed per run is 144.

The application of the proposed method to the analysis of 1516 human CSF samples without known neurotransmitter disorders allowed us to give the age-related reference ranges for key metabolites and pterins among French population. Furthermore, the application of the proposed method to several cases of known enzymatic defects confirmed the expected CSF pattern of changes in pterins and monoamine metabolites in patients.

While previous methods using MS/MS detection were less sensitive than FD for pterin quantification,[18] recent advances in MS/SM detection[19] notably in term of sensitivity show that the latter mode of detection is now able to replace the former. As MS/MS detection is less dependent of the resolution of the separation, the translation of the proposed method to UHPLC-MS/MS is one avenue to improve overall throughput of this method. For the time being, the proposed method is quite appropriate for the laboratories not already equipped with the LC-MS/MS technology.

Methods

Chemicals and reagents.

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

Patient samples.

The CSF samples were collected from 2008 to 2014 by lumbar puncture as previously described.[18] Lumbar punctures were performed in several French hospitals covering the entire French territory as part of normal clinical management and research activities aiming to enhance the diagnosis of neurological disorders of unknown origin 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 collected in five fractions of 0.3 mL each as previously described[18] and 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, and L-Dopa and BH4 treatments. Determinations of 5-methyl tetrahydrofolate by HPLC-FD[17] were performed for all patients.

The collected CSF samples were divided in 3 groups. Group 1 includes CSF samples collected by lumbar puncture from 1386 infants and children aged 1 day to 16 years (median 3.34 years) and 130 patients aged 16.01 to 80 years (median 21 years). Group 1 was considered as a reference population with the same inclusion criteria as previously described (Ref Guibal). This group includes patients suffering several neurological disorders with initially unknown etiology including movement disorders with or without encephalopathy, epileptic or neurodegenerative encephalopathy, and meningo-encephalitis. Group 2 includes CSF samples with known neurotransmitter disorders collected from 16 infants and children (aged 1 day to 6.63 years, median 2.36 years) and 3 adults (aged 18.63 to 27.88 years, median 24.46 years). Group 3 includes CSF samples collected from 115 patients (aged 0.02 to 64.64 years, median 25.6 years) with known immune system activation.

Chromatographic conditions and sample preparation.

Preliminary HPLC separations were performed on a Dionex Summit HPLC system (Les Ulis, France). For method development the HPLC system was coupled to a model 5011 cell controlled by a Coulochem 5100A module (ESA, France) connected to a Jasco FP 920 detector equipped with a 16 µL standard cell. For simultaneous separation of neurotransmitter metabolites and pterins we used an Atlantis T3 (4.6 x 150 mm, 3 µm) column (Waters, France). The mobile phase consisted of a mixture of pH 5.2, 0.05 M citrate buffer and methanol (97/3, v/v). Flow rate was set at 0.5 mL/min at 30°C. The metabolites present in the effluent were measured at the second electrode with a potential set at 400 mV while the fluorescence of pterins was sequentially measured at 450 nm after post-column electro-oxidation at the same potential and excitation at 350 nm.

For UHPLC separations we used a Waters ACQUITY UPLC system connected to an ESA Coulochem III electrochemical detector equipped with a 6011 model cell followed by an Acquity UPLC fluorescence detector. For neurotransmitter metabolites and pterins separations, we used an Acquity UPLC HSS T3 (2.1 x 100 mm, 1.8 µm) column (Waters, France). The mobile phase consisted of a mixture of pH 5.2, 0.05 M citrate buffer and methanol (97/3, v/v). Flow rate was set at 0.5 mL/min at 30°C. The metabolites and pterins present in the effluent were sequentially measured under the same conditions as for the HPLC separation but with a potential set at 600 mV. We changed the potential to 600 mV in order to reach the limiting current. Obviously, the potential shift is due to the used reference electrodes that are likely different between the two used Coulochem models.

For sample preparation, 50 µL of CSF or calibrator or QC sample were diluted (1/1, v/v) in a solution of 2,5-dihydroxybenzoic acid (250 nM) used as internal standard (IS) prepared in the mobile phase, before filtration in a 5,000 MWCO PES Vivaspin 500 filter (Sartorius, Aubagne, France) and centrifugation (10 min at 12,000 g and 4° C). 50 µL of the resulting filtrate were injected into the chromatograph. However, in order to respect the linearity of the method the injected volume must be appropriately reduced for some CSF samples containing high levels of metabolites. Also, in order to avoid dramatically reducing the area of the IS peak, some samples containing high levels of metabolites must be appropriately diluted before addition of the IS and injection.

Calibrators and quality controls.

Stock standard solutions were prepared by dissolving 400 µM of biopterin (B), neoterin (N), BH2, and NH2 in 0.1M HCl or 1mM of HVA, HIAA, 3OMD, 5OHT, and MHPG 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 stock standard solutions of N, NH2, B and BH2 were diluted to give final concentrations of 5, 12.5, 25, 50 and 100 nM/L of each pterin. HVA was diluted to give final concentrations of 15, 75, 187.5, 375, 750, and 1500 nM/L. HIAA was diluted to give final concentrations of 10, 50, 125, 250, 500 and 1000 nM/L. MHPG, 3OMD, and 5OHT were diluted to give final concentrations of 5, 25, 62.5, 125, 250 and 500 nM.

Analytical recovery and precision studies were 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 µL of pooled CSF (p-CSF) sample residues (n = 10) spiked with 5, 12.5 and 50 nM/L of each pterin; 75, 187.5 and 750 nM/L of HVA; 50, 125 and 500 nM/L of HIAA, and 25, 62.5 and 250 nM/L of MHPG, 3OMD, and 5OHT. The basal content of the p-CSF sample was determined with the standard-addition method (Skoog, DA. 1996). As internal quality control (IQC) we used aliquots of p-CSF frozen at – 80 °C until analysis. As external QC (EQC) we used aliquots of water-diluted (1/100, v/v) “Special assays in urine” from ERNDIM (Manufactured by the MCA Laboratory of the Queen Beatrix Hospital, Netherlands) stored at – 80° C until analysis. This EQC is used to control the 5 HIAA and HVA levels. For the control of 3-OMD, 5-OHT and MHPG we used their response factors as compared to those of 5 HIAA and HVA.

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 0.05 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.

AUTHOR INFORMATIONS

Corresponding author:

Fathi Moussa

Letiam, Lip(Sys)², EA7357, IUT d'Orsay, Université Paris Sud, Plateau de Moulon. 91400 Orsay, France

E-mail: fathi.moussa@u-psud.fr

Author contributions

Aurélien Lo, Pierre Guibal, Jean-Yves Hautem, and Fathi Moussa performed research and analyzed data. Diane Doummar, Emmanuel Roze, Diana Rodriguez, and Thierry Billette de Villemeur managed children and collected CSF samples. Rémy Couderc provided material support. Fathi Moussa designed research and analyzed data. Aurelien Lo, Pierre Guibal, and Fathi Moussa wrote the paper. All authors discussed the results and comments on the manuscript.

Email addresses

Aurélien Lo : aurelien.lo@u-psud; Pierre Guibal : Pierre.Guibal@sanofi.com; Diane Doummar: diane.doummar@aphp.fr; Diana Rodriguez: diana.rodriguez@aphp.fr; Jean-Yves Hautem: jyhautem@hotmail.fr; Rémy Couderc: remy.couderc@aphp.fr; Thierry Billette De Villemeur : thierry.billette@aphp.fr; Emmanuel Roze: flamand.roze.75012@gmail.com; Pierre Chaminade : pierre.chaminade@u-psud.fr; Fathi Moussa : fathi.moussa@u-psud.fr.

Notes

The authors declare no competing financial interest.

SUPPORTING INFORMATION: Linearity, analytical recovery, and accuracy of the proposed method. Shapiro Wilk normality test on population and log transformed population. Chromatographic profiles of a standard mixture and a CSF sample with the proposed method under HPLC conditions. Correlation between the results obtained with the proposed method at pH 5.4 and at pH 7.4.

ABBREVIATIONS

3 OMD, 3 ortho-methyl dopa; 5 HIAA, hydroxyl indole acetic acid; 5 OHT, 5 hydroxy tryptophan, AADC, amino acid decarboxylase; AD, autosomal dominant; AR, autosomal recessive; B, biopterin; BH2, dihydrobiopterin; BH4, tetrahydrobiopterin; CSF, cerebrospinal fluid; DHPR, dihydropteridine reductase; DTDS, dopamine transporter deficiency syndrome; EQC, external quality control; FD, fluorescence detection; GTP-CH, guanosine triphosphate cyclohydrolase; HPLC, high performance liquid chromatography; HVA, homo vanillic acid; IQC, internal qualiy control; IS, internal standard; LOD, limit of detection; LOQ, limit of quantification; MHPG, 3-methoxy-4-hydroxyphenylglycol; N, neopterin; NH2 dihydroneopterin; Phe, phenylalanine; PCD, pterin-4α-carbinolamine dehydratase; PTPS, 6-pyruvoyl tetrahydropterin synthase; SR, sepiapterin reductase; TH, tyrosine hydroxylase; UHPLC, ultra-high performance liquid chromatography.

References

1. Hyland, K. Inherited disorders affecting dopamine and serotonin: critical neurotransmitters derived from aromatic amino acids. *J. Nutr.* 2007, *137*, 1568S–1575S.
2. Longo, N. Disorders of biopterin metabolism. *J. Inherit. Metab. Dis.* 2009, *32*, 333–342.
3. Kurian, M. A.; Gissen, P.; Smith, M.; Heales, S.; Clayton, P. T. The monoamine neurotransmitter disorders: an expanding range of neurological syndromes. *Lancet neurol.* 2011, *10*, 721–733.
4. Koshimura, K.; Murakami, Y.; Tanaka, J.; Kato, Y. The role of 6R-tetrahydrobiopterin in the nervous system. *Prog. Neurobiol.* 2000, *61*, 415–438.
5. Blau, N.; Bonafé L.; Blaskovics, M. E. Disorders of phenylalanine and tetrahydrobiopterin metabolism. In *Physician's Guide to the Laboratory Diagnosis of Metabolic Diseases* (Blau, N.; Duran, M.; Blaskovics, M. E.; Gibson, K. M., Ed.), 2nd ed., Springer, New York, 2003; pp 89-106.
6. Roze, E.; Blau, N. Biogenic monoamine disorders. In *Inherited Metabolic Disease in Adults: A Clinical Guide* (Hollak, C. E. M.; Lachmann, R., Ed.), 1st ed., OUP USA, Oxford, 2016; pp 203-208.
7. Hyland, K. Clinical utility of monoamine neurotransmitter metabolite analysis in cerebrospinal fluid. *Clin. Chem.* 2008, *54*, 633–641.
8. Allen, G. F. G.; Land, J. M.; Heales, S. J. R. A new perspective on the treatment of aromatic L-amino acid decarboxylase deficiency. *Mol. Genet. Metab.* 2009, *97*, 6–14.
9. Leu-Semenescu, S.; Arnulf, I.; Decaix, C.; Moussa, F.; Clot, F.; Boniol, C.; Touitou, Y.; Levy, R.; Vidailhet, M.; Roze, E. Sleep and Rhythm Consequences of a Genetically Induced Loss of Serotonin. *Sleep* 2010, *33*, 307–314.
10. Fukushima, T.; Nixon, J. C. Analysis of reduced forms of biopterin in biological tissues and fluids. *Anal. Biochem.* 1980, *102*, 176-188.
11. Howells, D.W.; Smith, I.; Hyland, K. Estimation of tetrahydrobiopterin and other pterins in cerebrospinal fluid using reversed-phase high-performance liquid chromatography with electrochemical and fluorescence detection. *J. Chromatogr. B: Biomed. Sci. Appl.* 1986, *381*, 285-294.

12. Koyama, E.; Mlnegishi, A.; Ishizaki, T. 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. *Clin. Chem.* 1988, *34*, 680–684.
13. 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. *J. Chromatogr. B: Biomed. Sci. Appl.* 1993, *617*, 249–255.
14. Hubbard, K. E.; Wells, A.; Owens, T. S.; Tagen, M.; Fraga, C. H.; Stewart, C. F. Determination of dopamine, serotonin, and their metabolites in pediatric cerebrospinal fluid by isocratic high performance liquid chromatography coupled with electrochemical detection. *Biomed. Chromatogr.* 2009, *24*, 626–631.
15. Manini, P.; Andreoli, R.; Cavazzini, S.; Bergamaschi, E.; Mutti, A.; Niessen, W. M. Liquid chromatography-electrospray tandem mass spectrometry of acidic monoamine metabolites. *J. Chromatogr. B: Biomed. Sci. Appl.* 2000, *744*, 423–431.
16. Ormazabal, A.; García-Cazorla, A.; Fernández, Y.; Fernández-Alvarez, E.; Campistol, J.; Artuch, R. HPLC with electrochemical and fluorescence detection procedures for the diagnosis of inborn errors of biogenic amines and pterins. *J. Neurosci. Methods* 2005, *142*, 153–158.
17. Verbeek, M. M.; Blom, A. M.; Wevers, R. A.; Lagerwerf, A. J.; van de Geer, J.; Willemsen, M. A. A. P. Technical and biochemical factors affecting cerebrospinal fluid 5-MTHF, biopterin and neopterin concentrations. *Mol. Genet. Metab.* 2008, *95*, 127–132.
18. Guibal, P.; Lévêque, N.; Doummar, D.; Giraud, N.; Roze, E.; Rodriguez, D.; Couderc, R.; Billette de Villemeur, T.; Moussa, F. Simultaneous Determination of All Forms of Biopterin and Neopterin in Cerebrospinal Fluid. *ACS Chem. Neurosci.* 2014, *5*, 533−541.
19. Arning, E.; Bottiglieri, T. LC-MS/MS analysis of cerebrospinal fluid metabolites in the pterin biosynthetic pathway. *JIMD Rep.* 2014, *29*, 1-9.
20. Bourcier, S.; Benoist, J.F.; Clerc, F.; Rigal, O.; Taghi, M.; Hoppilliard, Y. Detection of 28 neurotransmitters and related compounds in biological fluids by liquid chromatography/tandem mass spectrometry. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 2006, *20*, 1405-1421.

21. Razali, N. M.; Wah, Y. B. Power comparisons of Shapiro-Wilk, Kolmogorov-Smirnov, Lilliefors and Anderson-Darling tests. *J. Stat. Model. Anal.* 2011, *2*, 21–33.
22. Hyland, K.; Surtees, R. A.; Heales, S. J.; Bowron, A.; Howells, D. W.; Smith, I. Cerebrospinal fluid concentrations of pterins and metabolites of serotonin and dopamine in a pediatric reference population. *Pediatr. Res.* 1993, *34*, 10–14.
23. Molero-Luis, M.; Serrano, M.; Ormazábal, A.; Pérez-Dueñas, B.; García-Cazorla, A.; Pons, R.; Artuch, R. Homovanillic acid in cerebrospinal fluid of 1388 children with neurological disorders. *Dev. Med. Child Neurol.* 2013, *55*, 559–566.
24. Hagberg, L.; Cinque, P.; Gisslen, M.; Brew, B. J.; Spudich, S.; Bestetti, A.; Price, R. W.; Fuchs, D. Cerebrospinal fluid neopterin: an informative biomarker of central nervous system immune activation in HIV-1 infection. *AIDS Res. Ther.* 2010, *3*, 7-15.

Supporting information

Single-step rapid diagnosis of dopamine and serotonin metabolism disorders

Aurélien Lo,[1] Pierre Guibal,[1] Diane Doummar,[2] Diana Rodriguez,[2] Jean-Yves Hautem,[2] Rémy Couderc,[2] Thierry Billette De Villemeur,[2] Emmanuel Roze,[3,4] Pierre Chaminade,[1] and Fathi Moussa*,[1,2]

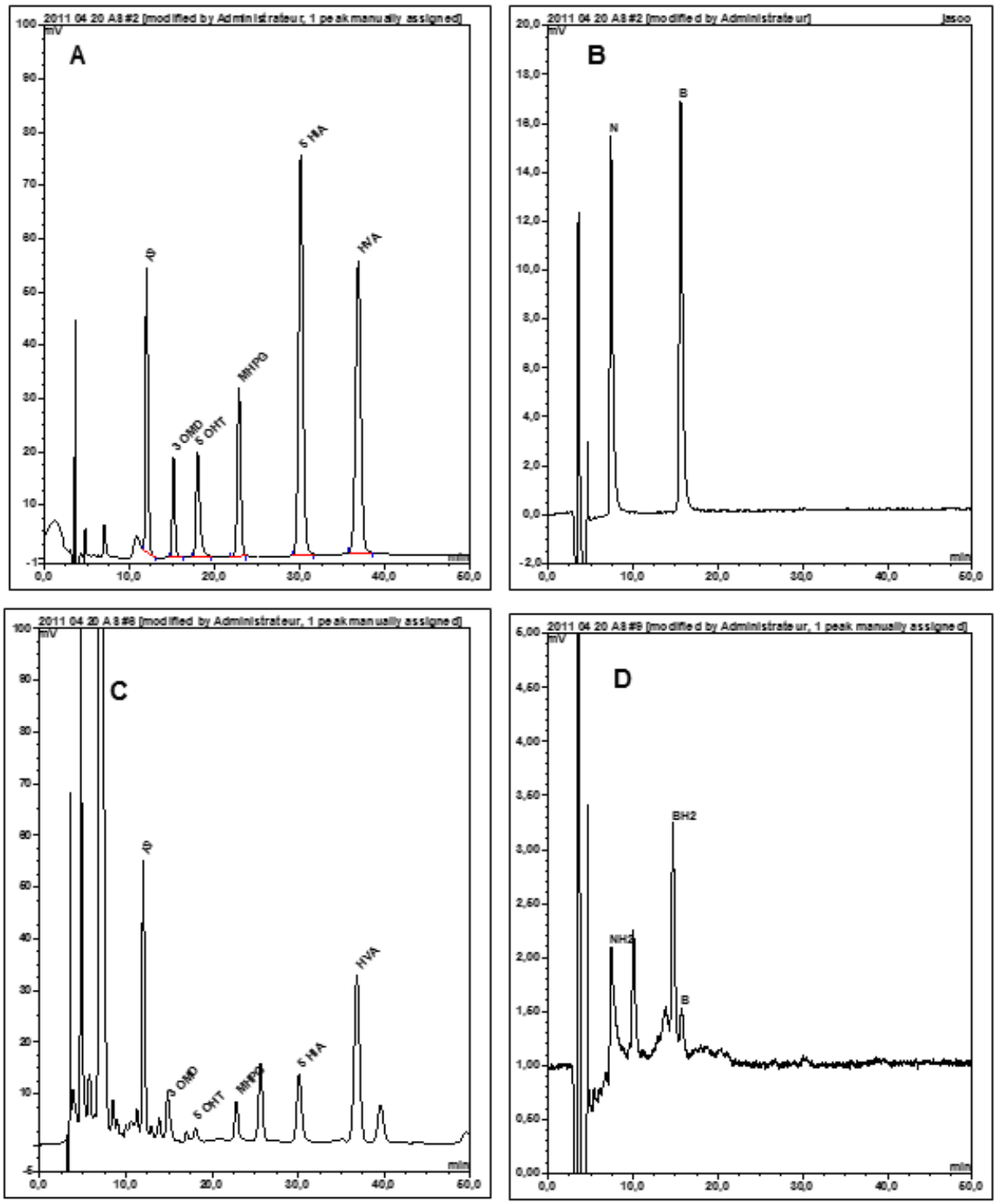


Figure S1: HPLC profiles of a standard mixture with (A) electrochemical detection followed by (B) sequential fluorescence detection, and a CSF sample of a patient from the control group with (C) electrochemical detection and (D) sequential fluorescence detection. Chromatographic conditions: column 4.6 x 150 mm, 3 µm Atlantis T3 (Waters, France); mobile phase: 0.05 M citrate buffer/methanol (97/3, v/v). Flow rate: 0.5 mL/min at 30°C

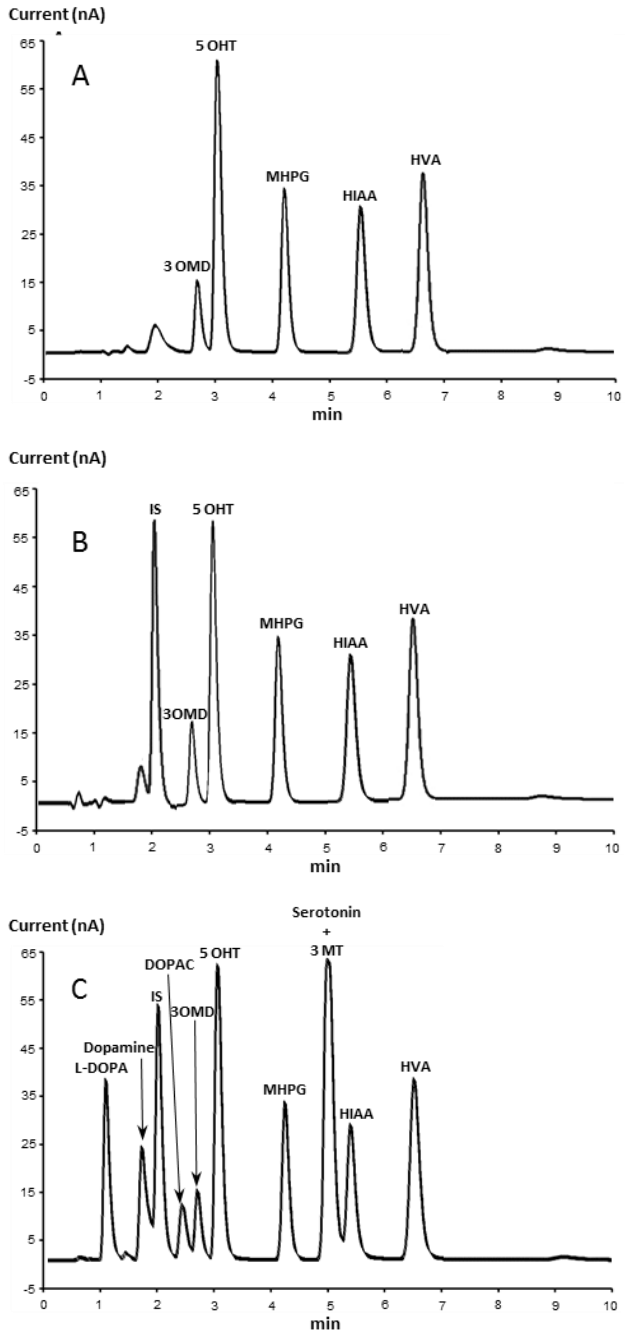


Figure S2. Chromatographic profiles of several metabolites (500 nM) obtained with the proposed method: (A) Standard mixture containing the targeted metabolites 3 OMD, 5 OHT, MHPG, HIAA, and HVA; (B) Addition of the IS to mixture A, and (C) Addition of L-DOPA, dopamine, DOPAC, serotonin, and 3 methoxy-tyramine (MT) to mixture B.

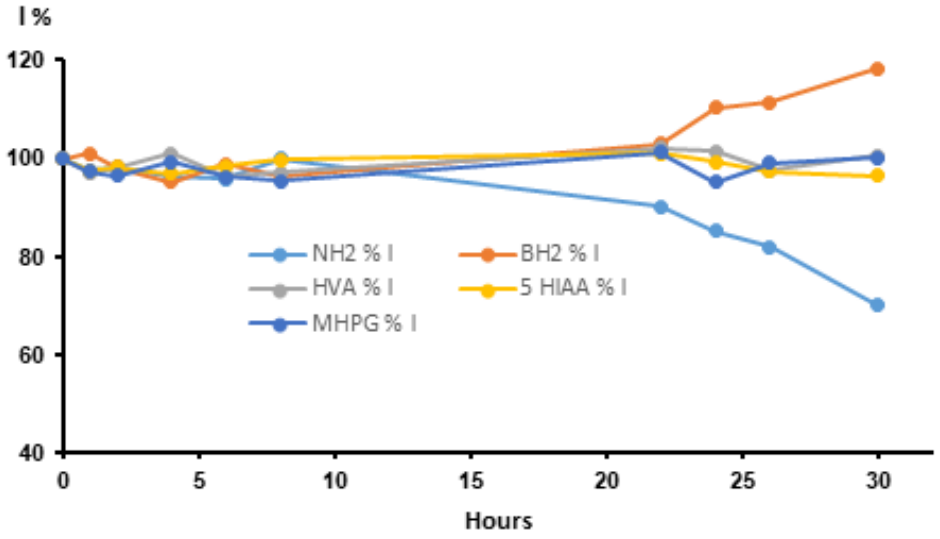


Figure S3: Stability of the analytes in the auto-sampler (10 °C, in the dark). I % = relative intensity vs initial intensity (Time 0; 100 %)

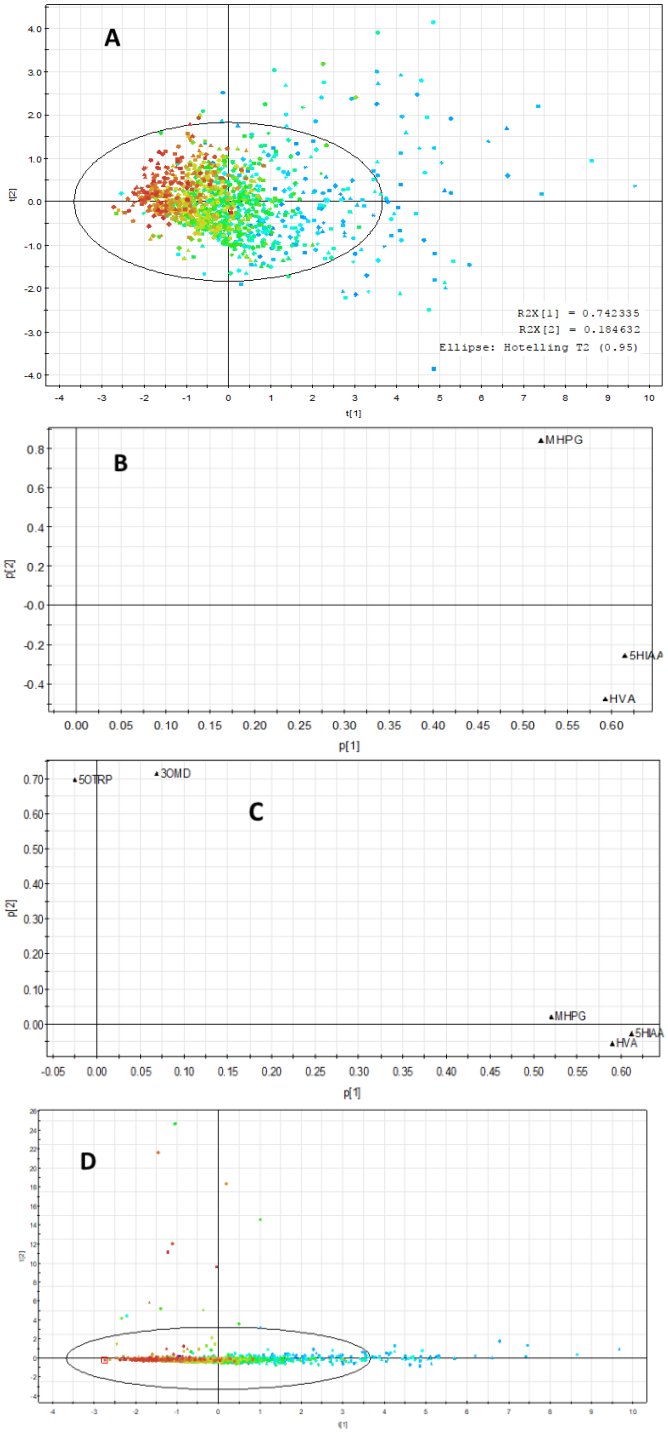


Figure S4. PCA results: (A) Score plot and (B) loading plot obtained after considering HVA, 5 HIAA, and MHPG, only, (C) loading plot after adding 3-OMD and 5-HTrp, and (D) score plot evolution after adding 3-OMD, T-HTrp, and BH2.

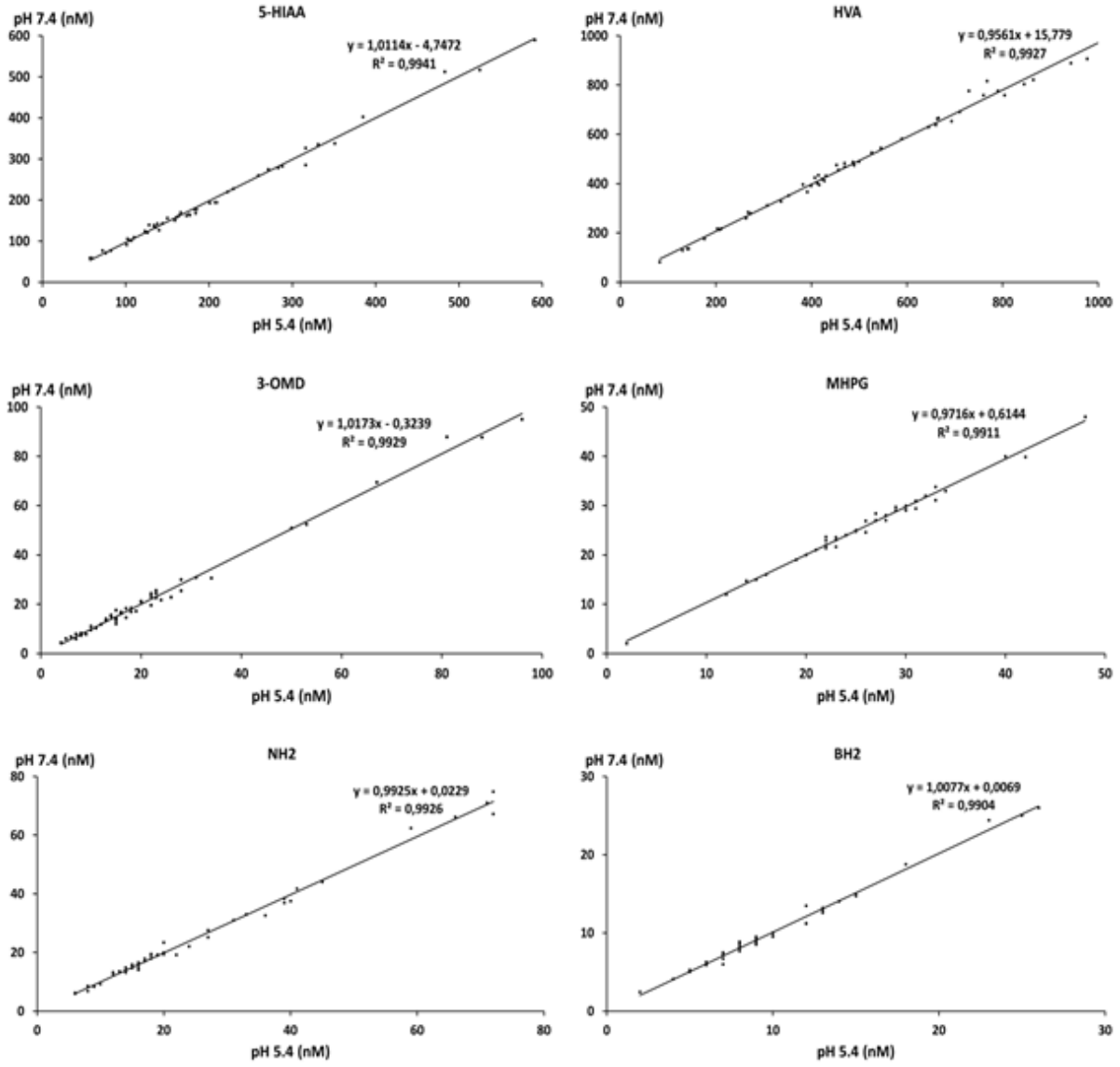


Figure S5: Correlation between the results obtained with the proposed methods at pH 5.4 and at pH 7.4.

Table S1: Linearity of the proposed method at pH 5.2

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: limit of quantification; [a] Standard error of the estimate; [b] Standard error of the slope; [c] Standard error of the intercept.

Table S2: Analytical recovery and accuracy of the proposed method at pH 5.2.

Analytes	Standard solutions (n = 6)			Authentic CSF (n = 6)				
	Concentration (nM)	Within-run (CV%)	Between-run (CV %)	Added concentration (nM)	Measured concentration (nM)	Recovery (%)	Within-run CV (%)	p-values
3-OMD	0	-	-	0	30	-	8.9	
	5	6.8	6.5	5	-	-	-	
	25	5.0	7.5	25	56	101.8	7.5	0.0515
	62.5	3.0	4.0	62.5	91	98.4	8.7	0.0536
	125	1.5	2.0	125	-	-	-	
	250	0.9	2.0	250	266	95.0	4.8	0.0576
	500	1.0	2.1	500	-	-	-	
5-OHT	0	-	-	0	24	-	7.2	
	5	7.2	9.3	5	-	-	-	
	25	4.0	8.6	25	48	98.6	9.5	0.2571
	62.5	2.7	7.1	62.5	88	101.7	8.6	0.9098
	125	2.9	4.5	125	-	-	-	
	250	1.5	2.8	250	263	96.0	7.7	0.0508
	500	0.9	2.0	500	-	-	-	
MHPG	0	-	-	0	21	-	9.4	
	5	2.7	6.2	5	-	-	-	
	25	2.6	7.4	25	48	104.3	6.9	0.6734
	62.5	1.3	3.5	62.5	81	97.0	5.1	0.8737
	125	0.9	2.7	125	-	-	-	
	250	0.9	2.6	250	266	98.2	1.4	0.0527
	500	0.5	2.5	500	-	-	-	
5 HIAA	0	-	-	0	113	-	8.5	
	10	6.1	9.7	10	-	-	-	
	50	5.5	8.9	50	158	96.9	8.6	0.8418
	125	5.0	5.6	125	240	100.8	6.8	0.0860
	250	4.2	8.8	250	-	-	-	
	500	4.2	6.6	500	596	97.2	2.8	0.3197
	1000	3.1	5.7	1000	-	-	-	
HVA	0	-	-	0	370	-	8.1	
	15	2.3	5.7	15	-	-	-	
	75	1.1	5.7	75	437	98.2	6.6	0.1700
	187.5	0.7	3.7	187.5	560	100.3	5.1	0.3810
	375	0.6	3.0	375	-	-	-	
	750	0.4	2.6	750	1105	98.7	2.8	0.0613
	1500	0.3	2.5	1500	-	-	-	
NH2	0	-	-	0	11	-	2.8	
	5	4.9	7.5	5	15	93.8	7.4	0.4965
	12.5	7.6	7.1	12.5	22	93.6	3.8	0.0628
	25	6.8	8.7	25	-	-	-	
	50	5.4	6.4	50	56	91.8	5.7	0.0556
	100	3.4	7.4	100	-	-	-	
BH2	0	-	-	0	22	-	4.5	
	5	5.6	7.9	5	26	96.3	6.4	0.6612
	12.5	6.3	5.7	12.5	33	95.7	6.3	0.5649
	25	5.9	8.5	25	-	-	-	
	50	6.7	6.3	50	69	95.8	8.7	0.2674
	100	4.7	6.2	100	-	-	-	
B	0	-	-	0	10	-	9.0	
	5	8.9	9.7	5	14	93.3	4.2	0.6776
	12.5	5.4	7.0	12.5	23	102.2	3.4	0.2423
	25	8.8	6.3	25	-	-	-	
	50	7.4	6.5	50	59	98.3	4.3	0.4988
	100	4.9	7.2	100	-	-	-	

Table S3: p value as a result of Shapiro Wilk normality test on population and log transformed population.

p - value	HVA		5 HIAA		HVA / 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

Table S4. Linearity of the method with a mobile phase pH set at 7.4

Analyte	LOQ nM	Slope	Intercept	R^2	$S_{y/x}$	S_a	S_b
3-OMD	6,1	1971	-2973	0,9998	3499	967	7,1
5-OHT	6,6	1682	705	0,9998	3451	954	6,9
5-HIAA	9,4	1651	-1816	0,9989	5969	1650	6,5
HVA	10,0	1803	6852	0,9999	6242	1725	6,5
MHPG	3,5	4421	-1013	0,9999	7466	2063	17,5
N	2,4	10842	-60626	0,9991	2660	735	14,4
NH2	3,2	6055	-1070	0,9995	3086	2070	83,4
B	1,6	11291	-67127	0,9994	2930	810	15,7
BH2	3,2	6584	-2313	0,9997	1923	533	12,8
BH4	4,2	4817	7871	0,998	3481	1626	97,2

Table S5: Analytical recovery and accuracy of the method with mobile phase pH set at 7.4.

Analytes	Standard solution (n = 6)			Authentic CSF (n = 6)			
	Concentration (nM)	Within-run (CV%)	Between-run (CV %)	Added concentration (nM)	Measured concentration (nM)	Recovery (%)	Within-run CV (%)
3-OMD	0	-	-	0	15,1	-	5,5
	17,4	0,8	2,6	16,5	-	-	-
	33,1	0,4	3,0	33	48,5	101,1	4,4
	65,4	0,7	2,8	66	83,7	103,9	1,9
	131,0	2,5	2,6	132	142,7	96,6	4,6
	264,6	0,4	2,0	264	280,6	100,6	3,3
5-OHT	0	-	-	0	14,6	-	0,0
	17,4	3,4	8,1	16,6	-	-	-
	33,3	1,0	9,2	33,3	48,2	101,2	10,4
	66,0	0,5	7,6	66,5	87,5	109,6	4,9
	132,2	2,5	9,0	133	146,9	99,5	5,3
	266,5	0,7	12,3	266	279,3	99,5	7,6
5-HIAA	0	-	-	0	100,6	-	6,9
	31,6	3,2	4,2	31	-	-	-
	61,8	0,9	4,4	61,9	166,0	105,5	5,0
	123,3	0,6	4,7	123,9	231,4	105,5	3,8
	247,6	2,1	3,6	247,8	347,8	99,8	5,3
	495,7	0,7	5,1	495,5	594,3	99,6	3,4
HVA	0	-	-	0	251,7	-	4,7
	32,4	0,3	2,9	31,9	-	-	-
	63,9	0,2	2,8	63,8	318,0	103,9	1,4
	128,2	0,6	3,9	127,6	391,7	109,7	1,5
	253,4	2,4	3,1	255,3	504,6	99,1	3,4
	511,2	0,4	6,4	510,5	760,0	99,6	2,0
MHPG	0	-	-	0	12,4	-	7,5
	15,2	0,4	3,2	14,3	-	-	-
	28,8	0,3	3,2	28,6	42,0	103,2	8,1
	56,8	0,7	4,0	57,3	69,6	99,9	4,8
	113,2	2,5	2,4	114,5	126,3	99,5	6,4
	229,7	0,4	3,6	229	241,6	100,1	3,3
N	0	-	-	0	n.d.	-	n.d.
	6,9	4,7	2,3	6,2	-	-	-
	12,5	2,1	7,2	12,3	13,3	107,6	8,3
	24,4	2,4	5,0	24,7	25,5	103,1	6,8
	48,2	1,9	7,0	49,4	50,5	102,3	3,8
	99,3	0,8	1,0	98,8	97,9	99,1	1,2
NH2	0	-	-	0	n.d.	-	n.d.
	7,2	4,9	9,9	6,2	-	-	-
	12,7	3,2	5,9	12,3	12,5	101,1	8,9
	24,5	2,1	6,3	24,7	26,4	106,9	4,3
	47,0	3,2	5,1	49,4	49,5	100,3	3,6
	99,8	0,4	5,8	98,7	98,2	99,5	3,9
B	0	-	-	0	n.d.	-	n.d.
	6,5	6,2	6,1	6,3	-	-	-
	12,2	3,7	4,8	12,5	11,6	92,8	5,7
	25,3	2,8	5,0	25	25,8	103,2	7,0
	49,6	1,8	6,1	50	49,9	99,8	2,4
	100,1	0,6	0,6	100	100,0	100,0	3,0
BH2	0	-	-	0	n.d.	-	n.d.
	6,1	5,0	6,6	6,2	-	-	-
	12,3	4,5	3,1	12,3	15,4	124,6	2,8
	24,6	2,8	5,7	24,7	28,0	113,6	7,3
	49,7	2,7	9,0	49,3	47,2	95,8	11,3
	98,4	2,4	9,1	98,6	98,4	99,8	5,9
BH4	0	-	-	0	n.d.	-	n.d.
	12,9	5,7	9,9	12,4	13,6	109,8	6,9
	19,6	9,0	8,9	18,6	-	-	-
	23,7	2,7	7,7	24,8	26,4	106,7	9,2
	35,2	3,3	3,3	37,1	-	-	-
	51,0	2,2	4,2	49,5	56,9	114,9	7,9
	-	-	-	99	94,7	95,7	2,5

Chapitre VI : Dosage simultané de la dopamine, de la sérotonine, des ptérines et des folates par chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse

VI.1. Introduction

Le métabolisme de la dopamine, de la sérotonine, des ptérines et des folates étant étroitement lié, il est nécessaire de doser leurs métabolites d'intérêts pour établir un profil biochimique complet. Jusqu'à présent, le dosage de ces neurotransmetteurs se faisait en deux analyses, où la première consistait à doser les métabolites de la dopamine, de la sérotonine et des ptérines par chromatographie liquide (LC) couplée à un détecteur électrochimique (ECD) et à un détecteur de fluorescence (FD), et la seconde à doser les folates par LC-FD. Cependant, l'acquisition récente d'un couplage UHPLC-TQ, nous avons incité à développer une nouvelle méthode de dosage par UHPLC-MS/MS. L'intérêt de ce nouveau montage par rapport au couplage UHPLC-ECD-FD est d'identifier les molécules autrement que par leur temps de rétention et de discriminer les analytes par leur masse sur charge (m/z), permettant ainsi de lever certaines ambiguïtés au niveau de l'identification des composés.

L'objectif principal de ce chapitre a donc été de valider une nouvelle méthode d'analyse en LC-MS qui permet de doser, en une seule étape, tous les métabolites d'intérêt ainsi que la BH4 et les folates.

VI.2. Matériels et méthode

Réactifs :

Le d_5-Tryptophane, le $^{13}C_5$-^{15}N-acide folique, la 3-OMD, le 5-OHT, le 5-HIAA, le HVA et le MHPG proviennent de Sigma-Aldrich (Saint-Quentin Fallavier, France) ; la ^{15}N-Néoptérine, la ^{15}N-Bioptérine, la N, la NH2, la B, la BH2 et la BH4 de Schircks Laboratories (Genève, Suisse) ; le méthanol, l'acide citrique et la soude de Merck (Fontenay-sous-Bois, France), la d_2-dopamine de Cambridge Isotope Laboratories (Tewksbury, États-Unis).

Étalons internes :

Le d_5-Tryptophane, la d_2-dopamine, le $^{13}C_5$-^{15}N-acide folique, la ^{15}N-Néoptérine et la ^{15}N-Bioptérine étaient respectivement les étalons internes des métabolites de la dopamine (3-OMD, HVA et MHPG), de la sérotonine (5-OHT et 5-HIAA), des folates (5-MTHF), des néoptérines (N et NH2) et des bioptérines (B, BH2 et BH4). La concentration de chaque étalon interne était de 50 nM dans tous les échantillons.

Préparation des solutions standards :

Les solutions standards de N, NH2, B et BH2 ont été préparées en dissolvant les poudres dans du HCl à 0,1 M. Pour celles de 3-OMD, 5-OHT, 5-HIAA, HVA et MHPG, les poudres ont été dissoutes dans de l'eau déionisée. La solution standard de BH4 a été réalisée en dissolvant la poudre dans de l'acide formique à 0,1 M. Tous les solutions standards ont été congelées et stockées à -80°C.

Pour valider la méthode, nous avons choisi cinq concentrations différentes pour chaque composé. Pour ce faire, les dilutions successives permettant d'atteindre la concentration désirée ont été réalisées à l'aide d'une solution de NaCl. En revanche, la dernière dilution est un mélange volume à volume avec la phase mobile. Le volume d'injection des solutions standards dans la colonne était de 50 µL.

Préparation des échantillons :

Dilution volume à volume d'un liquide céphalo-rachidien (LCR) avec la phase mobile. Puis, filtration sur un filtre 5000 MWCO PES Vivaspin 500 (Sartorius, Aubagne, France) et

centrifugation pendant 10 min à 12000 g et à 4°C. Ensuite, récupération du filtrat et injection de 50 µL de ce filtrat dans la colonne.

Instrumentations :

Un chromatographe de type Ultimate 3000 de marque « Dionex » a été employé pour séparer les composés. Il a été couplé à un spectromètre de masse Endura et de marque « Thermo Scientifique » de type TSQ.

Conditions analytiques :

La séparation des amines biogènes et des ptérines a été menée sur une colonne C18 Acquity UPLC HSS T3 (2,1 x 100 mm ; 1,8 µm) de marque « Waters ». maintenue à une température de 20 °C.

Les analyses ont été réalisées en mode gradient. La phase mobile A était composée de 97% d'une solution aqueuse d'acide formique à 0,05 M et de 3% de méthanol. La phase mobile B était composée uniquement de méthanol. Le débit était de 0,4 mL/min.

La détection en masse a été réalisée en mode positif. Le voltage de la source électrospray était de 3000 V. Le potentiel de la source de fragmentation était de 20 V. La température de la cellule d'ionisation et du tube de transfert a été fixée à 300°C. Les flux du gaz de nébulisation, du gaz auxiliaire et du gaz écran étaient respectivement à 45 unités arbitraires (ua), 5 ua et 1 ua. L'argon a été utilisé pour fragmenter les molécules par CID. La pression du gaz de collision était de 1,5 mTorr.

VI.3. Résultats et discussion

VI.3.1. Optimisation de la méthode de dosage en UHPLC-MS

Pour développer la méthode de dosage en UHPLC-MS, nous avons étudié l'influence du pH et du pourcentage en méthanol de la phase mobile sur le signal des différents composés, afin d'optimiser la réponse.

Détection en « *Single Reaction Monitoring* » (SRM) :

Le tableau 6.1 répertorie les fragments générés par Collision Induced Dissociation (CID) pour chaque molécule, permettant ainsi leur détection en « Single Reaction Monitoring » ou SRM. L'ion fils de quantification est le fragment le plus intense d'une molécule. L'ion fils de confirmation est le fragment caractéristique d'une molécule qui permet ainsi de confirmer son identification.

Composé	Ion parent (m/z)	Ion fils de quantification (m/z)	Ion fils de confirmation (m/z)
d2-dopamine	156,16	139,04	93,15
			121,11
d5-tryptophane	210,16	192,06	150,11
			193,06
^{15}N-Néoptérine	255,12	190,99	206,99
			237,00
^{15}N-Bioptérine	239,15	194,93	178,99
			221,00
$^{13}C_5$-^{15}N-acide folique	447,95	295,04	119,95
			176,11
3-OMD	212,16	194,99	149,04
5-OHT	221,15	204,38	161,99
5-HIAA	192,15	146,04	91,22
HVA	137,18	122,11	94,17
MHPG	167,13	77,22	107,11
N	254,13	236,00	206,00
NH2	256,15	207,97	238,04
B	238,03	220,13	178,13
BH2	240,16	196,06	165,04
BH4	242,20	166,04	206,04
5-MTHF	460,31	313,11	180,11

Tableau 6.1 : Table de SRM de chaque composé.

Influence du pH :

L'influence du pH de la phase mobile a été étudiée avec des phases mobiles dont le pH a été ajusté à 2,3, 5,4 et 7,4 à l'aide d'une solution d'ammoniac. Le choix des différents pH est dicté par les impératifs explicités dans les chapitres précédents. Le tableau 6.2 répertorie les temps de

rétention (t_r) et le rapport signal sur bruit (S/B) obtenus pour chaque composé en fonction du pH.

Composé	Concentration (nM)	pH 2,3		pH 5,4		pH 7,4	
		t_r (min)	S/B	t_r (min)	S/B	t_r (min)	S/B
3-OMD	54	5,37	82	2,68	47	3,66	41
5-OHT	62	5,25	22	3,04	1	4,30	2
5-HIAA	264	n.d.	n.d.	5,36	3	4,54	50
HVA	371	n.d.	n.d.	7,10	1	5,37	2
MHPG	56	n.d.	n.d.	4,24	0,2	5,8	0,2
N	107	1,16	53,5	1,10	3,5	1,45	5,0
NH2	88	1,12	16,0	1,20	0,8	1,62	3,8
B	123	2,55	12,2	2,55	3,9	3,25	5,6
BH2	67	2,28	5,8	2,45	1,0	3,64	6,0
BH4	50	0,81	20,2	1,82	1,4	2,35	1,0

Tableau 6.2 : Temps de rétention (t_r) et rapport signal sur bruit (S/B) obtenus pour chaque molécule en fonction du pH. (n.d. : non détecté)

À pH 5,4 et 7,4, tous les composés sont détectés. Par contre, à pH 2,3, le 5-HIAA, le HVA et le MHPG sont les seuls à ne pas avoir été détectés car ils étaient trop retenus dans la colonne. En prenant en compte uniquement ces observations, il serait plus judicieux de travailler à pH 5,4 ou à 7,4. Toutefois, à ces deux pH, les S/B obtenus sont le plus faible. Comme nous détectons en mode positif, les meilleurs S/B à pH 2,3 s'expliquent par le fait que ces molécules sont plus facilement protonées à pH acide..

Face à ce dilemme, il a été décidé de favoriser la sensibilité pour pouvoir doser les métabolites ayant une faible concentration dans les fluides biologiques en cas de déficits enzymatiques, en travaillant avec une phase mobile à pH 2,3, en mode gradient d'élution, avec une phase mobile A contenant 97 % d'acide formique 0,05 M, pH 2,3 et 3 % de méthanol et une phase mobile B à base d'une solution pure de méthanol.

Différents tests ont été effectués afin d'éluer le plus rapidement possible les composés, et

d'équilibrer la colonne. Les meilleurs résultats en termes de sensibilité, de séparation et de durée de l'analyse ont été obtenus avec les conditions présetées dans le tableau suivant :

Temps (min)	% A	% B
0	100	0
3,2	100	0
4,2	53	47
6,1	53	47
7,1	100	0
10	100	0

Tableau 6.3 : Gradient d'élution proposé

Cette programmation, utilisée pour la suite de cette étude, dure 10 minutes, avec un temps d'équilibrage de la phase stationnaire de 3 minutes, et élue les différents composés avec les temps de rétention suivants :

Composé	t_r (min)
BH4	0,80
NH2	1,10
N	1,30
^{15}N-Néoptérine	1,30
d_2-dopamine	1,65
BH2	2,00
B	2,25
^{15}N-Bioptérine	2,25
MHPG	4,50
3-OMD	4,50
5-OHT	4,50
5-MTHF	5,70
d_5-Tryptophane	6,00
$^{13}C_5$-^{15}N-acide folique	6,10
5-HIAA	6,10
HVA	6,40

Tableau 6.4 : Temps de rétention (tr) de chaque molécule éluée

L'élution totale des composés d'intérêt est réalisée en moins de 7 minutes. On peut remarquer que certains composés ont des temps de rétention très proches voire égaux. Toutefois, comme ils n'ont ni la même masse, ni les mêmes fragments, ils peuvent être distingués grâce au mode MRM.

VI.3.2. Validation de la méthode

Pour valider la méthode proposée en UHPLC-MS, il a fallu établir la linéarité de chacun des composés. Pour ce faire, cinq concentrations différentes ont été sélectionnées. La gamme des concentrations choisies pour chaque métabolite correspond aux valeurs usuelles que l'on retrouve dans le liquide céphalo-rachidien (LCR). Pour chaque concentration, la mesure a été répétée six fois afin de vérifier la répétabilité de la mesure. Cette expérience a été aussi répétée pendant quatre jours afin de vérifier la reproductibilité de la méthode. Des ajouts dosés ont été également effectués sur du LCR pour s'assurer de la justesse de la méthode. La quantification de la concentration de chaque molécule a été effectuée à partir de l'aire du pic de l'ion caractéristique de quantification (Tableau 6.1). Les tableaux 6.5 et 6.6 résument l'ensemble des résultats obtenus.

Analyte	LOQ (nM)	Pente	Ordonnée à l'origine	R^2	$S_{y/x}$	S_a	S_b
3-OMD	11,9	3253	9410	0,9991	7555	2951,4	26,5
5-OHT	3,9	1716,8	11876	0,9918	14154	5529,5	43,2
5-HIAA	8,2	8175	147557	0,9982	134939	52716,2	96,7
HVA	3,6	72	175	0,9983	1629	636,5	0,8
MHPG	4,2	613	710	0,984	6411	2504,5	21,7
N	1,7	286	4133	0,9779	266	74,0	1,3
NH2	2,1	106	4345	0,9852	21	5,7	0,1
B	0,4	160	3624	0,9791	103	28,5	0,4
BH2	0,5	216	-47	0,9956	25	6,7	0,1
BH4	5,7	497	-2222	0,9924	235	62,8	1,2
5-MTHF	2,7	10997	-7428	0,9906	78599	30721,9	297,6

Tableau 6.5 : Données de la linéarité et limite de quantification (LOQ) établies pour chaque composé. R^2 représente le coefficient de régression linéaire, $S_{y/x}$, l'erreur type de l'estimation, S_a, l'erreur type de l'ordonnée à l'origine et S_b, l'erreur type de la pente.

Analytes	Concentration ajoutée (nM)	Solution standard					LCR		
		Analyses intrajours (n=6)			Analyses interjours (n=4)		Analyses intrajours (n=3)		
		Concentration mesurée (nM)	Recouvrement analytique (%)	CV (%)	Concentration mesurée (nM)	CV (%)	Concentration mesurée (nM)	Recouvrement analytique (%)	CV (%)
3-OMD	0,0	-	-	-	-	-	9,6	-	1,2
	13,4	13,1	97,8	6,3	10,7	9,2	-	-	-
	26,8	27,0	100,7	1,3	24,2	5,3	35,8	97,8	0,3
	54,0	54,1	100,2	1,8	59,7	5,7	61,9	96,9	1,6
	108,0	108,1	100,1	2,2	109,2	0,7	117,6	100,0	1,4
	216,0	215,9	100,0	1,8	214,4	0,4	-	-	-
5-OHT	0,0	-	-	-	-	-	1,0	-	4,6
	15,5	11,3	72,9	7,3	11,1	6,2	-	-	-
	30,8	30,7	99,7	2,5	27,8	6,7	32,4	101,9	3,5
	62,0	64,4	103,9	3,5	69,0	4,8	62,3	98,9	0,7
	124,0	128,3	103,5	1,4	127,0	0,7	125,2	100,2	2,5
	248,0	245,5	99,0	6,1	245,4	0,1	-	-	-
5-HIAA	0,0	-	-	-	-	-	45,9	-	4,7
	65,8	55,4	84,2	3,4	57,6	9,7	-	-	-
	131,2	129,7	98,9	2,4	123,9	6,1	164,2	90,2	3,2
	264,0	266,2	100,8	2,4	286,9	8,4	310,8	100,3	1,5
	528,0	555,2	105,2	1,8	521,8	3,5	569,4	99,1	2,8
	1056,0	1043,9	98,9	0,5	1054,7	0,6	-	-	-

HVA	0,0	-	-	-	-	-	104,3	-	2,5
	92,4	92,4	100,0	2,0	77,5	9,4	-	-	-
	184,1	180,6	98,1	6,3	178,7	8,9	259,1	84,1	0,4
	370,5	382,0	103,1	7,3	381,3	5,0	425,9	86,8	3,1
	741,0	729,9	98,5	4,2	762,1	5,5	840,9	99,4	3,2
	1482,0	1485,1	100,2	0,7	1470,3	1,5	-	-	-
MHPG	0,0	-	-	-	-	-	4,4	-	9,4
	14,0	15,5	110,7	2,6	14,7	3,1	-	-	-
	27,8	29,8	107,2	3,2	27,0	6,1	33,9	106,1	6,4
	56,0	54,7	97,7	5,0	58,6	3,9	61,5	102,0	4,1
	112,0	107,6	96,1	1,7	108,1	0,3	116,9	100,4	3,4
	224,0	226,2	101,0	9,1	225,3	0,2	-	-	-
N	0,0	-	-	-	-	-	1,4	-	5,2
	6,5	6,1	94,3	5,3	6,6	2,6	-	-	-
	13,4	12,3	91,8	4,3	13,8	4,8	14,1	94,8	1,4
	26,9	28,4	105,6	5,9	24,4	6,7	28,0	98,9	2,6
	53,8	59,6	110,8	5,3	46,1	2,2	54,9	99,4	2,3
	107,5	104,5	97,2	3,9	99,7	0,8	-	-	-
NH2	0,0	-	-	-	-	-	43,5	-	3,6
	6,2	6,2	100,0	10,5		6,9	-	-	-
	12,4	15,2	122,6	4,3	13,8	7,9	55,8	99,2	6,3
	24,8	24,3	98,0	12,1	24,6	3,2	67,4	96,4	5,4
	49,5	45,6	92,1	2,0	46,4	3,5	96,1	106,3	2,8
	99,0	101,0	102,0	9,1	100,4	1,2	-	-	-

B	0,0	-	-	-	-	-	0,0	-	-
	7,4	5,8	78,4	6,4	5,2	1,2	-	-	-
	15,4	13,0	84,4	4,8	12,7	8,9	15,7	101,9	1,2
	30,8	38,3	124,4	2,4	32,3	8,7	31,3	101,6	2,5
	61,6	67,4	109,4	4,2	68,1	2,8	61,7	100,2	0,6
	123,3	119,0	96,5	1,1	120,1	0,9	-	-	-
BH2	0,0	-	-	-	-	-	91,2	-	2,0
	6,2	8,4	135,5	7,8	8,1	6,2	-	-	-
	12,4	12,1	97,6	7,9	12,8	10,2	105,0	111,3	1,3
	24,8	23,9	96,4	3,0	24,0	3,0	113,7	90,7	3,3
	49,6	47,3	95,4	4,5	46,6	5,3	163,7	146,2	1,1
	99,2	100,4	101,2	1,4	100,7	1,9	-	-	-
BH4	0,0	-	-	-	-	-	0,0	-	-
	6,3	5,6	89,6	5,7	7,0	7,6	-	-	-
	12,5	10,5	84,0	4,1	11,3	7,7	12,0	96,0	6,2
	25,0	26,3	105,2	7,3	24,1	7,9	25,6	102,4	6,0
	50,0	56,4	112,8	4,4	52,1	9,2	50,5	101,0	6,6
	100,0	96,8	96,8	5,5	99,3	2,5	-	-	-
5-MTHF	0,0	-	-	-	-	-	3,3	-	8,6
	12,0	11,3	94,2	0,5	12,1	10,6	-	-	-
	24,8	23,1	93,1	3,6	25,0	5,1	23,8	82,7	3,0
	50,0	49,4	98,8	1,6	48,1	1,8	46,0	85,4	2,3
	100,0	105,1	105,1	1,7	102,4	3,2	102,6	99,3	4,1
	200,0	197,9	99,0	6,8	199,3	0,8	-	-	-

Tableau 6.6 : Recouvrement analytique et coefficient de variation de chaque composé d'intérêt diagnostic.

Linéarité :

Le tableau 6.5 montre des valeurs de coefficient de régression linéaire comprises entre 0,97 et 0,99. Une bonne régression linéaire a donc été obtenue.

Coefficients de variation (CV) :

Les coefficients de variation intra-jours et inter-jours, répertoriés dans le tableau 6.6 sont inférieurs à 12,1 %.

Limite de quantification (LOQ) :

Dans le tableau 6.5, les limites de quantification obtenues sont inférieures à 12 nM. Les métabolites peuvent donc être dosés à de très faibles concentrations, permettant le diagnostic clinique des déficits enzymatiques déjà recensés dans le chapitre II de la partie I. Hormis les LOQ de la 3-OMD, MHPG et BH4, les LOQ obtenues avec la méthode de dosage en UHPLC-MS sont légèrement inférieures à celles obtenus avec la méthode de dosage en UHPLC-ECD-FD (voir le chapitre IV). Cependant, la méthode de dosage en UHPLC-MS offre plus de garanties quand à la spécificité du dosage, que la méthode en UHPLC-ECD-FD (Figure 6.1a et figure 6.1b).

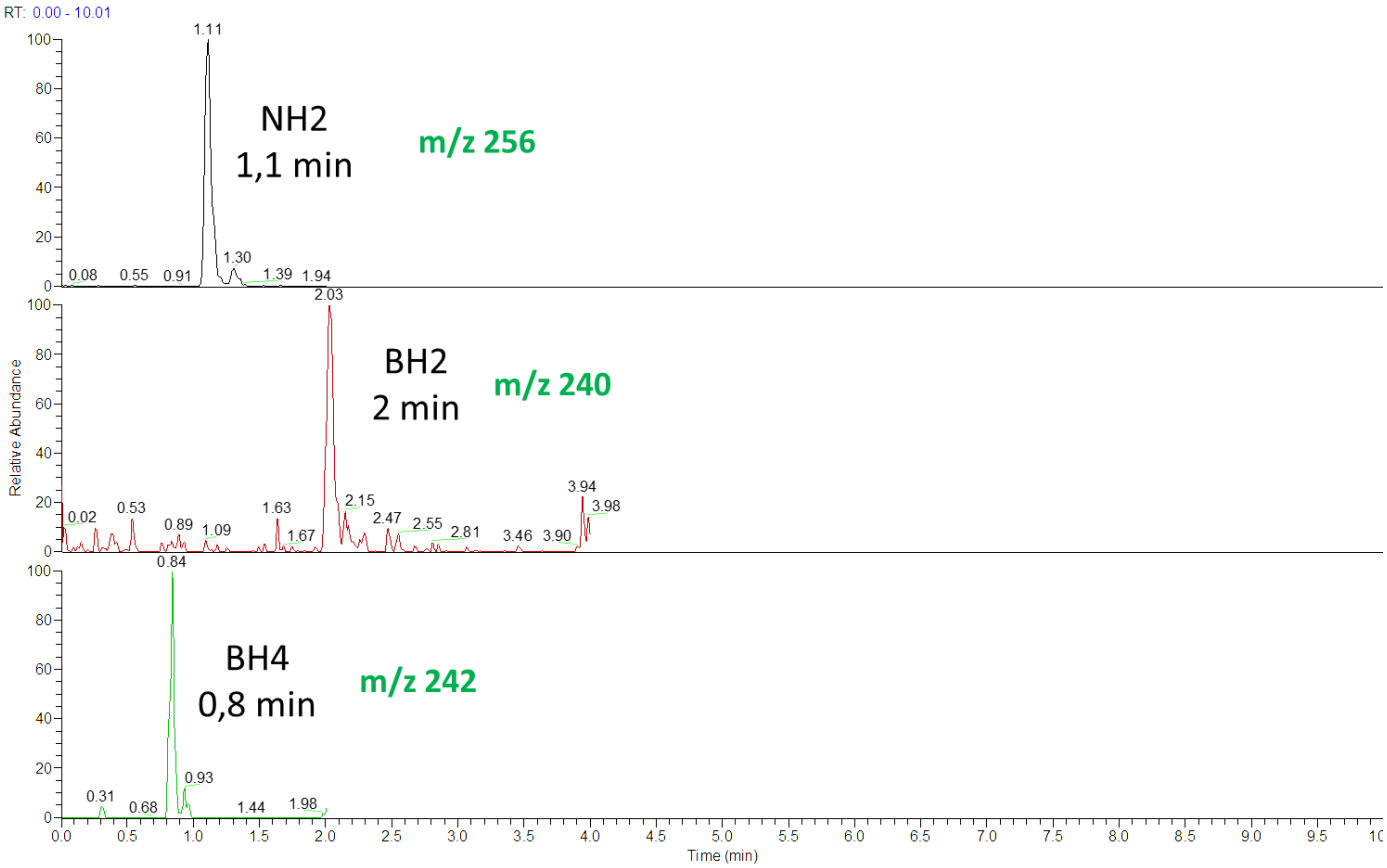


Figure 6.1a : Séparation des ptérines.

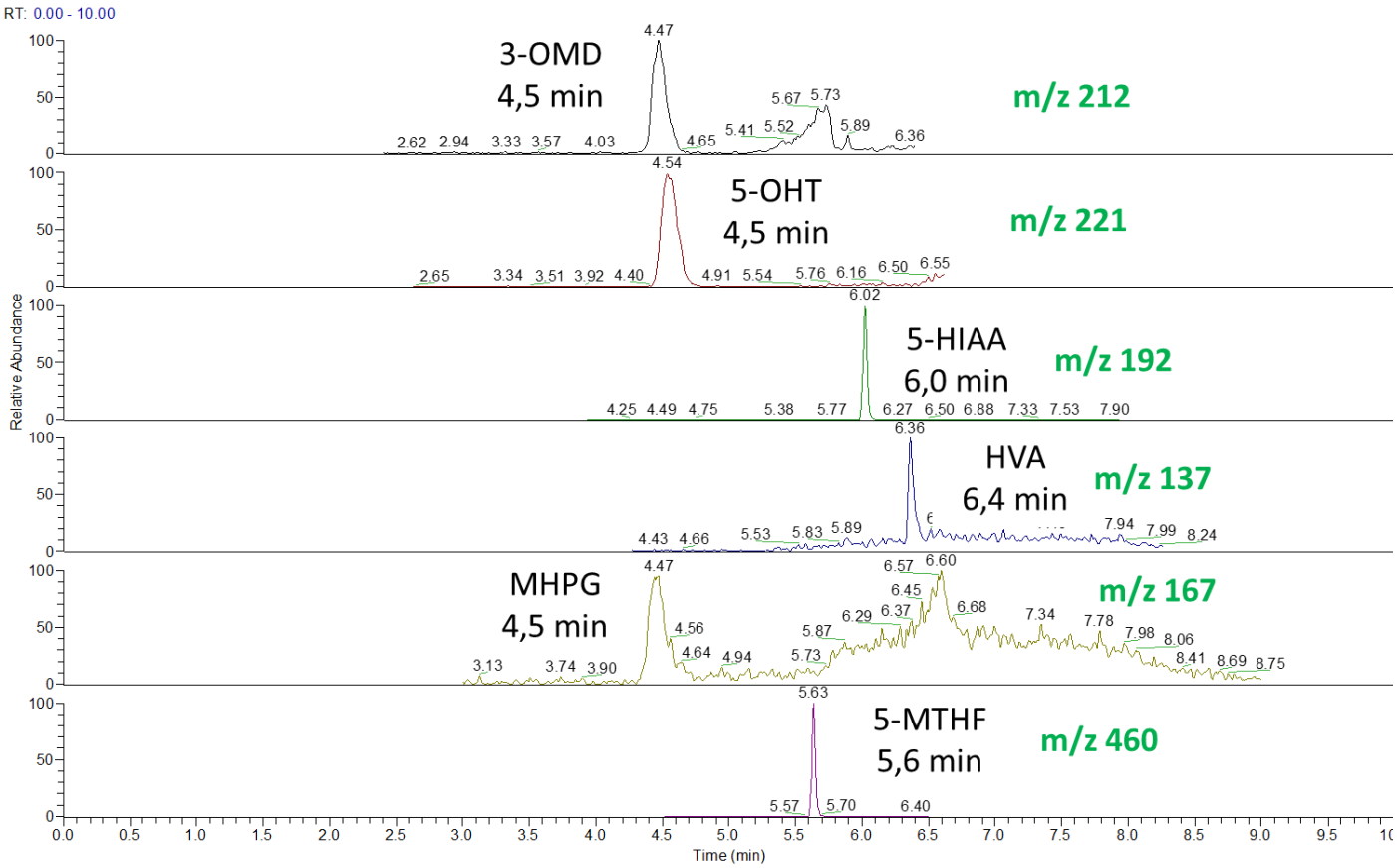


Figure 6.1b : Séparation des amines biogènes et du 5-MTHF.

VI.4. Conclusion

La méthode de dosage simultané des métabolites de la dopamine, de la sérotonine, des ptérines et des folates en UHPLC-MS est ainsi validée. Le temps d'analyse des échantillons de LCR par UHPLC-MS est le même que celui par UHPLC-ECD-FD, à savoir 10 minutes. Toutefois, la méthode par UHPLC-MS offre deux avantages : 1- elle offre plus de garanties de spécificité et 2- elle est limite le diagnostic biologique à une seule étape chromatographique grâce à l'intégration du dosage du 5 MTHF.

Conclusion générale et perspectives

Les principaux objectifs de ces travaux de thèse ont été de développer des méthodes rapides de diagnostic biologique des troubles de la neurotransmission liée aux déficits héréditaires en amines biogènes et en folates.

Dans le cadre du diagnostic des troubles neurologiques liés aux erreurs innées du métabolisme de la dopamine, de la sérotonine, des ptérines et des folates, deux méthodes de dosage simultané par UHPLC de toutes ces substances ont été développées. Les deux méthodes sont rapides puisqu'elles permettent de doser simultanément l'ensemble de ces métabolites en moins de dix minutes. Elles diffèrent, cependant, par le mode de détection utilisé.

La première méthode fait appel à la détection séquentielle électrochimique et fluorimétrique. Une fois validée, l'application de cette méthode à plus de 1300 échantillons de LCR nous a permis d'établir les valeurs fréquentes pour la population française, et de diagnostiquer plusieurs cas de déficits enzymatiques ainsi que de nombreux cas de troubles liés à un processus d'activation immune. Par ailleurs, la méthode a été appliquée au dosage de la BH4 et de ses formes oxydées B et BH2 ainsi qu'au dosage de la neoptérine réduite et oxydée (NH2 et N) dans des tissus biologiques chez la souris, ainsi que dans le LCR et le plasma de patients atteints de VIH, dans le cadre de collaborations nationales et internationales (INRA de Bordeaux, Italie et Canada). Les résultats des dosages effectués, visant à étudier l'effet des infections bactériennes dans des modèles expérimentaux chez la souris, d'une part, et du VIH, d'autre part, sur la synthèse de la BH4 sont en cours d'interprétation.

La seconde méthode plus récente utilise la détection par spectrométrie de masse. Cette méthode, encore plus rapide, car plus spécifique et donc ne nécessitant pas une résolution totale des différents métabolites, devrait remplacer à court terme la première méthode. En outre, la méthode UHPLC-MS/MS proposée permet désormais le dosage simultané du 5-MTHF, en plus de l'ensemble des métabolites des amines biogènes impliquées dans les troubles de la neurotransmission.

Pour mieux comprendre la réactivité chimique et l'instabilité de la BH4, ses mécanismes d'auto-oxydation et d'électro-oxydation ont été étudiés par spectrométrie de masse tandem, éventuellement haute résolution (FT-ICR), mobilité ionique différentielle (DIMS) et spectroscopie Infrarouge intégrée à la spectrométrie de masse, d'une part, et par voltammétrie cyclique et par HPLC couplée à une cellule électrochimique elle-même couplée à un spectromètre de masse à temps de vol, d'autre part. C'est ainsi que nous avons pu isoler et caractériser, pour la première fois, la qBH2,

intermédiaire réactionnel fugace de la BH4 impliqué dans l'auto-oxydation et le mécanisme d'action de cette dernière. Ce travail nous a permis, en outre, de mieux cerner l'instabilité de la BH4 et d'optimiser les conditions de sa conservation.

Selon nos partenaires neuropédiatres, parmi tous les cas d'enfants hospitalisés pour un trouble neurologique, la moitié seulement bénéficie d'un diagnostic précis. Et, dans la majorité des cas diagnostiqués, la physiopathologie de l'atteinte reste méconnue. Il est donc urgent de poursuivre ces travaux par l'exploration systématique du métabolome du LCR, afin de rechercher de nouveaux candidats biomarqueurs. Toutes les compétences et le matériel nécessaires à la réalisation de cette tâche sont disponibles à l'Université Paris Sud – Paris – Saclay.

Bibliographie

[1] Peter Fitzgerald and Timothy G. Dinan (2008) Prolactin and dopamine: what is the connection? A review article. Journal of psychopharmacology 22:12-19.

[2] Roy A; Wise (2004) Dopamine, learning and motivation. Nature Reviews Neuroscience 5:483-494.

[3] Dale Purves, George J. Augustine, David Fitzpatrick, William C. Hall, Anthony-Samuel Lamantia, James O. McNamara and S. Mark Williams (2004) Neuroscience, 3rd edition. Sinauer Associates, Inc.

[4] Nicola Longo (2009) Disorders of biopterin metabolism. Journal of inherited metabolic disease 32:333-342.

[5] Toshiharu Nagatsu, Morton Levitt and Sidney Udenfriend (1964) Tyrosyne hydroxylase, the initial step in norepinephrine biosynthesis. The journal of biological chemistry 239:2910-2917.

[6] Tessa Wassenberg, Michel A. A. P. Willemsen, Ben P. B. H. Geurtz, Martin Lammens, Kiek Verrijp, Martin Wilmer, Wang Tso Lee, Ron A. Wevers and Marcel M. Verbeek (2010) Urinary dopamine in aromatic L-amino acid decarboxylase deficiency: the unsolved paradox. Molecular genetics and metabolism 101:349-356.

[7] Haydeh Niazi Shahabi, Filip Bergquist and Hans Nissbrandt (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 neurotransmitter metabolites. Neuroscience 120:145-433.

[8] Isaac Marin-Valencia, Mercedes Serrano, Aida Ormazabal, Belen Perez-Duenas, Angels Garcia-Cazorla, Jaume Campistol and Rafael Artuch (2008) Biochemical diagnosis of dopaminergic disturbances in paediatric patients: analysis of cerebrospinal fluid homovanillic acid and other biogenic amines. Clinical Biochemistry 41:1306-1315.

[9] David S. Goldstein, Graeme Eisenhofer and Irwin J. Kopin (2003) Sources and significance of plasma levels of catechols and their metabolites in humans. The journal of pharmacology and experimental therapeutics 305:800-811.

[10] Joana Bicker, Ana Fortuna, Gilberto Alves and Amilcar Falcao (2013) Liquid chromatography methods for the quantification of cathecolamines and their metabolites in several biological samples- -a review. Analytica chimica acta 768:12-34.

[11] Marco Bortolato, Nela Pivac, Dorotea Muck Seler, Matea Nikolac Perkovic, Mauro Pessia and Guiseppe Di Giovanni (2013) The role of serotoninergic system at the interface of aggression and suicide. Neuroscience 236:160-185.

[12] Ido P. Kema, Elisabeth G. E. de Vries and Friets A. Muskiet (2000) Clinical chemistry of serotonin and metabolites. Journal of chromatography B, biomedical sciences and application 747:33-48.

[13] Ernst R. Werner, Nenad Blau and Beat Thöny (2011) Tetrahydrobiopterin: biochemistry and pathophysiology. Biochemical journal 438:397-414.

[14] Kunio Koshimura, Yoshio Murakami, Junko Tanaka and Yuzuru Kato (2000) The role of 6R-tetrahydrobiopterin in the nervous system. Progress in Neurobiology 61:415-438.

[15] Keith Hyland (2007) Inherited disorders affecting dopamine and serotonin: critical neurotransmitters derived from aromatic amino acids. The journal of nutrition 137:1568S-1572S; discussion 1573S-1575S.

[16] Gregory Kapatos (2013) The neurobiology of tetrhydrobiopterin biosynthesis: a model for regulation of GTP cyclohydrolase I gene transcription within nigrostriatal dopamine neurons. IUBMB life 65:323-333.

[17] Ernst R. Werner, Gabriele Werner-Felmayer and Helmut Wachter (1996) High performance liquid chromatographic methods for the quantification of tetrahydrobopterin biosynthetic enzymes synthase. Journal of chromatography B, biomedical applications 684:51-58.

[18] Dorothee Heintel, Walter Leimbacher, Udo Redweik, Boleslaw Zagalak, Hans-Christoph Curtius (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.

[19] Michael Kirsch, Hans-Gert Korth, Verena Stenert, Reiner Sustmann, and Herbert de Groot (2003) The autooxidation of tetrahydrobiopterin revisited: proof of superoxide formation from reaction of tetrahydrobiopterin with molecular oxygen. Journal of biological chemistry 278, 24481-24490.

[20] Kantilal B. Patel, Michael R.L. Stratford, Peter Wardman and Steven A. Everett (2002) Oxidation of tetrahydrobiopterin by biological radicals and scavenging of the trihydrobiopterin radical by ascorbate. Free radical biology and medicine 32:203-211.

[21] Jeannette Vasquez-Vivar, Damon Duquaine, Jennifer Whitsett, B. Kalyanaraman and Sanjay Rajagopalan (2002) Altered tetrahydrobiopterin metabolism in atherosclerosis. Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology 22:1655-1661.

[22] Michael D. Davis, Seymour Kaufman, and Sheldon Milstien (1988) The auto-oxydation of tetrahydrobiopterin. European journal of biochemistry 173, 345-351.

[23] Takeshi Fukushima, and Jon C. Nixon (1980) Analysis of reduced forms of biopterin in biological tissues and fluids. Analytical biochemistry 102, 176-188.

[24] R. Raghavan, and Glenn Dryhurst (1981) Redox chemistry of reduced pterin species. Journal of electroanalytical chemistry 129, 189-212.

[25] Antonius C. F. Gorren, Andreas J. Kungl, Kurt Schmidt, Ernst R. Werner, and Bernd Mayer (2001) Electrochemistry of pterin cofactors and inhibitors of nitric oxide synthase. Nitric oxide : biology and chemistry Vol 5, N°2, pp. 176-186.

[26] Kevin R. Hoke, and Brian R. Crane (2009) The solution electrochemistry of tetrahydrobiopterin revisited. Nitric Oxide 20, 79-87.

[27] Simon Heales, and Keith Hyland (1989) Determination of quinonoid dihydrobiopterin by high-performance liquid chromatography and electrochemical detection. Journal of chromatography 494, 77-85.

[28] Michael Fenech (2012) Folate (vitamin B9) and vitamin B12 and their function in the maintenance of nuclear and mitochondrial genome integrity. Micronutrients and genomic stability 733:21-33.

[29] Regine P. Steegers-Theunissen (1995) Folate metabolism and neural tube defects: a review. European journal of obstetrics & gynecology and reproductive biology 61:39-48.

[30] Rik P. Bogers, Pieter C. Dagnelie, Aalt Bast, Marcella van Leeuwen, Jacob D. van Klaveren and Piet A. van den Brandt (2007) Effect of increased vegetable and fruit consumption on plasma folate and homocysteine concentrations. Nutrition 23:97-102.

[31] Martha Savaria Morris, Paul F. Jacques, Irwin H. Rosenberg and Jacob Selhub (2007) Folate and vitamin B-12 status in relation to anemia, macrocytosis, and cognitive impairment in older Americans in the age of folic acid fortification. The American journal of clinical nutrition 85:193-200.

[32] Keith Hyland, John Shoffner and Simon J. Heales (2010) Cerebral folate deficiency. Journal of inherited metabolic disease 33:563-570.

[33] Vincent Ramaekers and Nenad Blau (2004) Cerebral folate deficiency. Developmental medicine and child

neurology 46:843-851.

[34] Manju A. Kurian, Paul Gissen, Martin Smith, Simon J. R. Heales and Peter T. Clayton (2011) The monoamine neurotransmitter disorders: an expanding range of neurological syndromes. Lancet neurology 10:721-733.

[35] François Feillet and Loïc de Parscau (2012) La phénylcétonurie. Consulté en date du 15/03/2017 sur le site orpha.net.fr : www.orpha.net/data/patho/Pub/fr/Phenylcetonurie-FRfrPub611v01.pdf

[36] Dimitrios I. Zafeiriou, Michel A. A. P. Willemsen, Marcel M. Verbeek, Euthymia Vargiami, Athina Ververi and Ron A. Wevers (2009) Tyrosine hydroxylase deficiency with severe clinical course. Molecular genetics and metabolism 97-18-20.

[37] Marta Ribasés, Mercedes Serrano, Emilio Fernandez-Alvarez, Sandra Pashida, Aida Ormazabal, Angels Garcia-Cazorla, Belen Perez-Duenas, Jaume Campistol and Rafael Artuch (2007) A homozygous tyrosine hydroxylase gene promoter mutation in a patient with dopa-responsive encephalopathy: clinical biochemical and genetic analysis. Molecular genetics and metabolism 92:274-277.

[38] Ching-Shiang Chi, Hsiu-Fen Lee and Chi-Ren Tsai (2012) Tyrosine hydroxylase deficiency in Taiwanese infants. Pediatric neurology 46:77-82.

[39] Guomei Tang, Daming Ren, Rener Xin, Yiping Qian, Dongyang Wang and Sanduo Jiang (2001) Lack of association between the tryptophan hydroxylase gene A218C polymorphism and attention-deficit hyperactivity disorder in China Han population. Neuropsychiatric genetics 105:485-488.

[40] Vincent Th. Ramaekers, Jan Senderek, Martin Hausler, Michael A. Haring, Nico G. Abeling, Klaus Zerres, Carsten Bergmann, Gerhard Heimann and Nenad Blau (2001) A novel neurodevelopmental syndrome responsive to 5-hydroxytryptophan and carbidopa. Molecular genetics and metabolism 73:179-187.

[41] George F. G. Allen, John M. Land and Simon J. R. Heales (2009) A new perspective on the treatment of aromatic L-amino acid decarboxylase deficiency. Molecular genetics and metabolism 97:6-14.

[42] Stacey K. H. Tay, Keng Soon Poh, Keith Hyland, Yun-Wei Pang, Hui Ting Hong, Poh Sim Low and Denise L. M. Goh (2007) Unusually mild phenotype of AADC deficiency in 2 siblings. Molecular genetics and metabolism 91:374-378.

[43] Morad Khayat, Stanley H. Korman, Pnina Frankel, Zalman Weintraub, Sylvia Hershckowitz, Vered Fleisher Sheffer, Mordechai Ben Elisha, Ronald A. Wevers and Tzipora C. Falik—Zaccai (2008) PNPO deficiency: an under diagnosed inborn error of pyridoxine metabolism. Molecular genetics and metabolism 94:431-434.

[44] David Robertson and Emily M. Garland (2003) Dopamine beta-hydroxylase deficiency. GeneReviews

[45] Jean-Michel Senard and Philippe Rouen (2006) dopamine beta-hydroxylase deficiency. Orphanet journal of rare diseases 1:1-7.

[46] Gordana Nedic, Nela Pivac, Dubravka Kocijan Hercigonja, Milivoj Jovancevic, Katarina Dodig Curkovic and Dorotea Muck-Seler (2009) Platelet monoamine oxidase activity in children with attention-deficit/hyperactivity disorder. Psychiatry research 175:252-255.

[47] Michael J. Minzenberg and Larry J. Siever (2007) Neurochemistry and pharmacology of psychopathy and related disorders. In Handbook of psychopathy (Christopher J. Patrick, Ed.), 1st ed, pp 251-264, The Guilford press, New York.

[48] Marko Huotari, Joseph A. Gogos, Maria Karayiorgou, Olli Koponen, Markus Forsberg, Atso Raasmaja, Juha Hyttinen and Pekka T. Mannisto (2002) Brain catecholamine metabolism in catechol-O-methyltransferase (COMT)-deficiency mice. European journal of neuroscience 15:246-256.

[49] Craig Blackstone (2009) Infantile parkinsonism-dystonia: a dopamine transportopathy. The journal of clinical investigation 119:1455-1458.

[50] Manju A. Kurian, Juan Zhen, Shu-Yuan Yan Li, Santosh R. Mordekar, Philip Jardine, Neil V. Morgan, Esther Meyer, Louise Tee, Shanaz Pasha, Evangeline Wassmer, Simon J. R. Heales, Paul Gissen, Maarten E. A. Reith and Eamonn R. Maher (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.

[51] Manju A. Kurian, Yan Li, Juan Zhen, Esther Meyer, Nebula Hai, Hans-Jurgen Christen, Georg F. Hoffmann, Phillip Jardine, Arpad von Moers, Santosh R. Mordekar, Finbar O'Callaghan, Evangeline Wassmer, Elizabeth Wraige, Christa Dietrich, Timothy Lewis, Keith Hyland, Simon J. R. Heales, Terence Sanger, Paul Gissen, Birgit E. Assmann, Maarten E. A. Reith and Eamonn R. Maher (2011) Clinical and molecular characterization of hereditary dopamine transporter deficiency syndrome: an observational cohort and experimental study. Lancet neurology 10:54-62.

[52] Murielle Assoun, Aline Cano, Dries Dobbelaere, Jean-Louis Dhondt, François Feillet, Alain Fouilhoux, Karine Mention, Hélène Ogier and Loic de Parscau (2010) Phénylcétonurie Protocole national de diagnostic et de soins. Consulté en date du 22/03/2017 sur le site has-sante.fr : https://www.has-sante.fr/portail/upload/docs/application/pdf/2010-05/ald_17_pnds_pcu_web.pdf

[53] William B. Hanley (2004) Adult phenylketonuria. The American journal of medicine 117:590-595.

[54] M. Grima (2008) Les antiparkinsoniens. Consulté en date du 22/03/2017 sur le site udsmed.u-strasbg.fr : http://udsmed.u-strasbg.fr/pharmaco/pdf/dcm3/DCEM3-Pharmaco_Chap8-Antiparkinsoniens_2008.pdf

[55] Emilia Romagna (2014) Review of the available evidence on oral dopamine agonists for Parkinson's disease. Consulté en date du 22/03/2017 sur le site who.int : http://www.who.int/selection_medicines/committees/expert/20/applications/Dopamine.pdf.

[56] ANSM (2016) Vous et vos médicaments dopaminergiques. Consulté en date du 22/03/2017 sur le site ansm.sante.fr : http://social-sante.gouv.fr/IMG/pdf/med-dopaminergiques-edition-2016.pdf

[57] P. Bousquet (2001) Sérotonine et médicaments. Consulté en date du 22/03/2017 sur le site udsmed.u-strasbg.fr : http://udsmed.u-strasbg.fr/pharmaco/pdf/dcm3/DCEM3-Pharmaco_Chap9-Serotonine_medicaments_2005.pdf

[58] M. Grima (2008) Les antidépresseurs. Consulté en date du 22/03/2017 sur le site udsmed.u-strasbg.fr : http://udsmed.u-strasbg.fr/pharmaco/pdf/dcm3/DCEM3-Pharmaco_Chap5-Antidepresseurs_2008.pdf

[59] Mathieu Chassot, Françoise Livio, Thierry Buclin and Thomas Munz (2012) Syndrome sérotoninergique : mise au point et revue des cas annoncés en Suisse. Revue médicale suisse 8:2086-2090.

[60] Tiffany Field, Maria Hernandez-Reif, Miguel Diego, Saul Schanberg and Cynthia Kuhn (2009) Cortisol decreases and serotonin and dopamine increase following massage therapy. International Journal of neuroscience 115:1397-1413.

[61] Chad D. Rethorst, Daniel M. Landers, Craig T. Nagoshi and Julianna T. D. Ross (2011) The association of 5-HTTLPR genotype and depressive symptoms is moderated by physical activity. Journal of psychiatric research 45:185-189.

[62] Masaya Segawa, K. Ohmi, S. Itoh, M. Aoyama and H. Hayakawa (1971) Childhood basal ganglia disease with remarkable response to L-dopa: hereditary ganglia disease marked with diurnal fluctuation. Shinryo (Tokyo) 24, 667-672.

[63] Inga Talvik, Masaya Segawa, Kadi Veri, Katrin Gross-Paju and Tiina Talvik (2010) Case of dopa-

responsive dystonia (Segawa disease) in Estonia. Brain & development 32:428-431.

[64] Pen-Jung Wang, You-Min Ko, Chainllie Young, Wuh-Liang Hwu and Yu-Zen Shen (1994) Hereditary progressive dystonia with marked diurnal fluctuation (Segawa syndrome) in Taiwan. Brain & development 16:126-131.

[65] Shizuaki Murata, Hiroshi Ichinose and Fumi Urano (2007) Tetrahydrobiopterin and related biologically important pterins. Top heterocycle chemistry 8:127-171.

[66] Hiroki Sato, Mitsugi Uematsu, Wakaba Endo, Tojo Nakayama, Tomoko Kobayashi, Naomi Hino-Fukuyo, Osamu Sakamoto, Haruo Shintaku and Shigeo Kure (2014) Early replacement therapy in a first Japanese case with autosomal recessive guanosine triphosphate cyclohydrolase I deficiency with a novel point mutation. Brain & development 36:268-271.

[67] Gabriella A. Horvath, Sylvia G. Stockler-Ipsiroglu, Ramona Salvarinova-Zivkovic, Yolanda P. Lillquist, Mary Connolly, Keith Hyland, Nenad Blau, Tony Rupar and Paula J. Waters (2008) Autosomal recessive GTP cyclohydrolase I deficiency without hyperphenylalaninemia: evidence of a phenotypic continuum between dominant and recessive forms. Molecular genetics and metabolism 94:127-131.

[68] Dau-Ming Niu (2011) Disorders of BH4 metabolism and the treatment of patients with 6-pyruvoyl-tetrahydrobiopterin synthase deficiency in Taiwan. Brain & development 33:847-855.

[69] Ni-Chung Lee, Ling-Yee Cheng, Tze-Tze Liu, Kwang-Jen Hsiao, Pao-Chin Chiu and Dau-Ming Niu (2006) Long-term follow-up of Chinese patients who received delayed treatment for 6-pyruvoyl-tetrahydrobiopterin synthase deficiency. Molecular genetics and metabolism 87:128-134.

[70] Haruo Shintaku, Minoru Asada and Yoshitomo Sawada (2000) Diagnosis and treatment of 6-pyruvoyl-tetrahydrobiopterin synthase deficiency. Brain & development 22:S118-121.

[71] Marcel M. Verbeek, Michel A. A. P. Willemsen, Ron A. Wevers, Aart J. Lagerwerf, Nico G. G. M. Abeling, Nenad Blau, Beat Thony, Euthymia Vargiami and Dimitrios I. Zafeirious (2008) Two Greek siblings with sepiapterin reductase deficiency. Molecular genetics and metabolism 94:403-409.

[72] Smaranda Leu-Semenescu, Isabelle Arnulf, Caroline Decaix, Fathi Moussa, Fabienne Clot, Camille Boniol, Yvan Touitou, Richard Levy, Marie Vidailhet and Emmanuel Roze (2010) Sleep and rhythm consequences of a genetically induced loss of serotonin. Sleep 33:307-314.

[73] Beat Thony, Frank Neuheiser, Lucja Kierat, Marie Odile Rolland, Pierre Guibaud, Tanja Schutler, Roger Germann, Randall Heidenreich, Marinus Duran, Johannis B. C. de Klerk, June E. Ayling and Nenad Blau (1998) Mutations in the pterin-4alpha-carbinolamine dehydratase (PCBD) gene cause a benign form of hyperphenylalaninemia. Human genetics 103:162-167.

[74] Nenad Blau, Beat Thony, Axel Renneberg, Lauren A. Arnold and Keith Hyland (1998) Dihydropteridine reductase deficiency localized to the central nervous system. Journal of inherited metabolic disease 21:433-434.

[75] Anne Romstad, H. Serap Kalkanoglu, Turgay Coskun, Mubeccel Demirkol, Aysegul Tokatli, Ali Dursun, Tolunay Baykal, Imran Ozalp, Per Guldberg and Flemming Guttler (2000) Molecular analysis of 16 Turkish families with DHPR deficiency using denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE). Human genetics 107:546-553.

[76] Kimberlee Michals-Matalon (2008) Sapropterin dihydrochloride, 6-R-L-erythro-5,6,7,8-tetrahydrobiopterin, in the treatment of phenylketonuria. Expert opinion on investigational drugs 17:245-251.

[77] Keiko Sawabe, Kazunori Osuke Wakasugi and Hiroyuki Hasegawa (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.

[78] Aida Ormazabal, Angels Garcia-Cazorla, Belen Perez-Duenas, Veronica Gonzalez, Emilio Fernandez-Alvarez, Merce Pineda, Jaume Campistol and Rafael Artuch (2006) Determination of 5-methyltetrahydrofolate in cerebrospinal fluid of paediatric patients: reference values for a paediatric population. Clinica chimica acta 371:159-162.

[79] Robert Steinfeld, Marcel Grapp, Ralph Kraetzner, Dreha-Kulaczewski, Gunther Helms, Peter Dechent, Ron Wevers, Salvatore Grosso and Jutta Gartner (2009) Folate receptor alpha defect causes cerebral folate transport deficiency: a treatable neurodegenerative disorder associated with disturbed myelin metabolism. American journal of human genetics 85:354-363.

[80] Belen Perez-Duenas, Claudio Toma, Aida Ormazabal, Jordi Muchart, Francesc Sanmarti, Georgina Bombau, Mercedes Serrano, Angels Garcia-Cazorla, Bru Cormand and Rafael Artuch (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.

[81] Mercedes Serrano, Belen Perez-Duenas, Julio Montoya, Aida Ormazabal and Rafael Artuch (2012) Genetic causes of cerebral folate deficiency: clinical, biochemical and therapeutic aspects. Drug discovery today 17:1299-1306.

[82] Megumi Tsuji, Atsushi Takagi, Kiyoko, Kiyoko Sameshima, Mizue Iai, Sumimasa Yamashita, Hiroko Shinbo, Noritaka Furuya, Kenji Kurosawa and Hitoshi Osaka (2011) 5,10-methylenetetrahydrofolate reductase deficiency with progressive polyneuropathy in an infant. Brain & development 33:521-524.

[83] Shay Ben-Shachar, Tai Zvi, Arndt Rolfs, Andrea Breda Klobus, Yuval Yaron, Anat Bar-Shira and Avi Orr-Urtreger (2012) A founder mutation causing a severe methylenetetrahydrofolate (MTHFR) deficiency in Bukharian Jews. Molecular genetics and metabolism 107:608-610.

[84] Kristin E. D'Aco, David Bearden, David Watkins, Keith Hyland, David S. Rosenblatt and Can Ficicioglu (2014) Severe 5,10-methylenetetrahydrofolate reductase deficiency and two MTHFR variants in an adolescent with progressive myoclonic epilepsy. Pediatric neurology 51:266-270.

[85] Siddarth Blanka, Henk J. Blom, John Walter, Majid Aziz, Jill Urquhart, Christopher M. Clouthier, Gillian I. Rice, Arjan P. M. de Brouwer, Emma Hilton, Grace Vassallo, Andrew Will, Desiree E. C. Smith, Yvo M. Smulders, Ron A. Wevers, Robert Steinfeld, Simon Heales, Yanick J. Crow, Joelle N. Pelletier, Simon Jones and William G. Newman (2011) Identification and characterization of an inborn error of metabolism caused by dihydrofolate reductase deficiency. American journal of human genetics 88:216-225.

[86] Holger Cario, Desiree E. C. Smith, Henk Blom, Nenad Blau, Harald Bode, Karlheinz Holzmann, Ulrich Pannicke, Karl-Peter Hopfner, Eva-Maria Rump, Zuleya Ayric, Elisabeth Kohne, Klaus-Michael Debatin, Yvo Smulders and Klaus Schwarz (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.

[87] Christa Brautigam, Ron A. Wevers, Keith Hyland, Ram Kumar Sharma, Andreas Knust and Georg F. Hoffmann (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 23:321-324.

[88] Zatollah Asemi, Zahra Vahedpoor, Mehri Jamilian, Fereshteh Bahmani and Ahmad Esmaillzadeh (2016) Effects of long-term folate supplementation on metabolic status and regression of cervical intraepithelial neoplasia: a randomized, double-blind, placebo-controlled trial. Nutrition 32:681-686.

[89] Tsunenobu Tamura (1998) Determination of food folate. The journal of nutritional biochemistry 9:285-293.

[90] Sunitha N. Wickramasinge (2006) Diagnosis of megaloblastic anaemias. Blood reviews 20:299-318.

[91] Richard T. Owen (2013) Folate augmentation of antidepressant response. Drugs of today 49:791-798.

[92] Raluca Ionescu-Ittu, Ariane J. Marelli and Andrew S. Mackie (2009) Prevalence of severe congenital heart disease after folic acid fortification of grain products: time trend analysis in Qebec, Canada. The british medical journal DOI: 10.1136/bmj.b1673

[93] Nenad Blau, Luisa Bonafe and Milan E. Blaskovics (2003) Disorders of phenylalanine and tetrahydrobiopterin metabolism. In *Physician's Guide to the Laboratory Diagnosis of Metabolic Diseases* (Blau, N., Duran, M., Blaskovics, M. E. and Gibson, K. M., Ed.), 2nd ed., pp 89-106, Springer, New York.

[94] Emmanuel Roze and Nenad Blau (2016) Biogenic monoamine disorders. In Inherited Metabolic Disease in Adults: A Clinical Guide (Hollak, C. E. M., and Lachmann, R.), 1st ed., pp 203-208, OUP USA, Oxford.

[95] Marcello Monteleone, Attilio Naccarato, Giovanni Sindona and Antonio Tagarelli (2013) A reliable and simple method for the assay of neuroendocrine tumor markers I human urine by solid-phase microextraction –gas chromatography-triple quadrupole mass spectrometry. Analytica chimica acta 759:66-73.

[96] Candito M., Billaud E., Chauffert M., Cottet-Emard J. M., Desmoulin D., Garnier JP, et al (2002) Diagnostic biochimique du phéochromocytome et du neuroblastome. Annales de biologie clinique 60/1:15-36.

[97] Mary C. Playdon, Joshua N. Sampson, Amanda J. Cross, Rashmi Sinha, Kristin A. Guertin, Kristin A. Moy, Nathaniel Rothman, Melinda L. Irwin, Susan T. Mayne, Rachael Stolzenberg-Solomon and Steven C. Moore (2016) Comparing metabolite profiles of habitual diet in serum and urine. American journal of clinical nutrition 104:776-789.

[98] Fujita K., Maruka 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 29:876-878.

[99] Candito M., Nagatsu T., Chambon P., Chatel M. (1994) High-performance liquid chromatographic measurement of cerebrospinal fluid tetrahydrobiopterin, neopterin, homovanillic acid and 5-hydroxindoleacetic acid in neurological diseases. Journal of chromatography B, Biomedical applications 657:61-66.

[100] Niazi Shahabi H., Bergquist F., Nissbrandt H. (2003) An investigation of dopaminergic metabolites in the striatum and in the substantion nigra in vivo utilising radiolabeled L-DOPA and high performance liquid chromatography: a nex approach in the search for transmitter metabolites. Neuroscience 120:425-433.

[101] Hubbard K. E., Wells A., Owens T. S., 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.

[102] Van Dam D., Vermeiren Y., Aerts T., De Deyn P. P. (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.

[103] 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 744:423-431.

[104] Tareke E., Bowyer J. F., Doerge D. R. (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.

[105] Su F., Wang F., Zhu R., Li H. (2009) Determinataion of 5-hydroxytryptamine, norepinephrine, dopamine and thei metabolites in rat brain tissue by LC-ESI-MS-MS. Chromatographia 69:207-213.

[106] Najmanova V., Rambousek L., Syslova K., et al (2011) LC-ESI-MS-MS method for monitoring dopamine, serotonin, and their metabolites in brain tissue. Chromatographia 73:S143-S149.

[107] Gonzales R. R., Fernandez R. F., Vidal J. L. M. 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 198:187-194.

[108] 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 47:816-824.

[109] 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-hynpotic effects observed during treatment with S. chinensis. Journal of pharmaceutical and biomedical analysis 88:416-422.

[110] 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.

[111] Sawada B. T., 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.

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

[113] Hong J. Y., Park N. H. Oh M. S., 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.

[114] Lucock M. D., Green M., Priestnall M., et al (1995) Optimisaation of chromatographic conditions for the determination of folates in foods and biological tissues for nutritional and clinical work. Food chemistry 53:329-338.

[115] Poo-Prieto R., Alonso-Aperte 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.

[116] Marszall M. L., Makarowski R., Hinc S., Czarnowski W. (2009) LC with coulometric detection for analysis of 5-methyltetrahydrofolate in human plasma. Chromatographia 69:829-835.

[117] Opladen T., Ramaekers V. T., Heimann G., Blau N. (2006) Analysis of 5-methyltetrahydrofolate in serum of healthy children. Molecular genetics and metabolism 87;61-65.

[118] Nelson B. C., Dalluge J. J., Margolis S. A. (2001) Preliminary application of liquid chromatography-electrospray-ionization mass spectrometry to the detection of 5-methyltetrahyfolic acid monoglutamate in human plasma. Journal of chromatography B 765:141-150.

[119] Nelson B. C., Pfeiffer C. M., Margolis S. A., Nelson C. P. (2004) Solid-phase extraction-electropray ionization mass spectrometry for the quantification of folate in human plasma or serum. Analytical biochemistry 325:41-51.

[120] Hannisdal R., Ueland P. M., Svardal A. (2009) Liquid chromatography-tandem mass spectrometry analysis of folate and folate catabolites in human serum. Clinical chemistry 55:1147-1154.

[121] Nelson B. C., Satterfield M. B., Sniegoski L. T., Welch M. J. (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.

[122] Kirsch S. H., Herrmann W., Geisel J., Obeid R. (2012) Assay of whole blood (6S)-5-CH3-CH4 folate using ultra performance liquid chromatography tandem mass spectrometry. Analytical and bioanalytical chemistry 404:895-902.

[123] van Haandel L., Becker M. L., Williams T. D., 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 26:1617-1630.

[124] 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.

[125] Liu J., Pickford R., Meagher A. P., Ward R. L. (2011) Quantitative analysis of tissue folate using ultra high-performance liquid chromatography tandem mass spectrometry. Analytical biochemistry 411:210-217.

[126] 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 27:487-495.

[127] Chandra-Hioe M. V., Bucknall M. P., 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 401:1035-1042.

[128] 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.

[129] 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.

[130] Pierre Guibal (2014) Contribution au développement de méthodes de diagnostic rapide des maladies innées du métabolisme associées à des troubles neurologiques. Thèse de doctorat sur travaux, école doctorale 470 : université Paris Sud.

[131] Pierre Guibal, Nathalie Lévêque, Diane Doummar, Nicolas Giraud, Emmanuel Roze, Diana Rodriguez, Rémy Couderc, Thierry Billette De Villemeur, and Fathi Moussa (2014) Simultaneous determination of all forms of bioperin and neopterin in cerebrospinal fluid. ACS chemical neuroscience 5, 533-541.

[132] 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.

[133] 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.

Liste des abréviations

3-OMD	3-ortho methyldopa
5-HIAA	5-hydroxy indole acetic acid
5-MTHF	5-méthyltétrahydrofolate
5-OHT	5-hydroxy tryptophane
6-PTP	6-pyruvoyl tetrahydropterin
7,8-BH2	Dihydrobioptérine
AADC	Amino acid decarboxylase
ACN	Acétonitrile
AO	Acide organique
B	Bioptérine
BH2	Dihydrobioptérine (voir aussi 7,8-BH2)
BH4	Tétrahydrobioptérine
BSTFA	N,O-Bis(trimethylsilyl)trifluoroacetamide
CID	(*Collision induced dissociation*) Dissociation induite pas collision
COMT	Catechol-O-methyl transférase
CV	Coefficient de variation
CV	(*Compensation voltage*) Voltage de compensation
DAT	(*Dopamine active transporter*) Transporteur en dopamine
DHPR	Dihydropterin reductase
DIMS	(*Differential ion mobility spectrometry*) Spectrométrie à mobilité ionique différentielle
DOPAC	(*Dihydroxyphenylacetic acid*) Acide dihydroxyphénylacétique
DTDS	(*Dopamine transporter deficiency syndrome*) Déficit en transporteur en dopamine
ECS	Électrode de calomel saturé
EIM	Erreurs innées du métabolisme
FT-ICR	(*Fourier transform ion cyclotronic resonance*) Résonnance cyclotronique d'ion à transformée de Fourier
GABA	(*Gamma aminobutyric acid*) Acide gamma-aminobutyrique
GABA-T	GABA transaminase
GAD	(*Glutamic acid decarboxylase*) Acide glutamique décarboxylase
GC-2D	(*Two-dimensional gas chromatography*) Chromatographie en phase gazeuse bidimensionnelle
GC-MS	(Gas chromatography- Mass spectrometry) Chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse
GS	Glutamine synthétase
GTP	Guanosine triphosphate
GTP-CH	Guanosine triphosphate cyclohydrolase
HFBuCF	Heptafluorobutylchloroformiate
HILIC	(*Hydrophilic interaction liquid chromatography*) Chromatographie à interaction hydrophile
HPLC	(*High performance liquid chromatography*) Chromatographie en phase liquide à haute performance
HVA	(*Homovanillic acid*) Acide homovanillique
IR	Infrarouge
IRMPD	(*Infrared multiphoton dissociation*) Dissociation multiphotonique infrarouge
LC	(*Liquid chromatography*) Chromatographie en phase liquide
LC-MS	(Liquid chromatography – Mass spectrometry) Chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse
LCR	Liquide céphalorachidien
LOD	Limite de détection
LOQ	Limite de quantification

LPS	Lipopolysaccharide
MAO	Monoamine oxydase
MHPG	3-methoxy-4-hydroxyphenylglycol
MTBSFA	N-tert-Butyldimethylsilyl-N-methyltrifluoroacetamide
N	Néoptérine
NH2	Dihydronéoptérine
NH2 triP	Dihydronéopérine triphosphate
P	Ptérine
P4C	Ptérine 4α-carbinolamine
PAH	Phenylalanine hydroxylase
PCD	Pterin 4α-carbinolamine dehydratase
PH2	Dihydroptérine
PH4	Tétrahydroptérine
PLP	Pyridoxal phosphate
PNPO	Pyridoxamine phosphate oxidase
PTPS	Pyruvoyl tetrahydropterin synthase
qBH2	Quinonoid dihydrobioptérine
RMN	Résonnance magnétique nucléaire
SA	(*Succinic acid*) Acide succinique
SIM	(*Selected ion monitoring*) Monitorage d'ions sélectionnés
SNC	Système nerveux central
SR	Sepiapterin reductase
SRM	(*Selected reaction monitoring*) Monitorage de réactions sélectionnées
SSA	(*Semi-aldehyde succinic acid*) Acide succinique semi-aldéhyde
SSADH	(*Semi-aldehyde succinic acid deshydrogenase*) Acide succinique semi-aldéhyde déshydrogénase
TBDMSCl	Tert-Butyldimethylchlorosilane
TH	Tyrosine hydroxylase
TMCS	Triméthylchlorosilane
t_r	Temps de rétention
UHPLC	(*Ultra high performance liquid chromatography*) Chromatographie liquide à ultra haute performance
VIH	Virus de l'immunodéficience humaine

université PARIS-SACLAY
ÉCOLE DOCTORALE
Sciences chimiques : molécules, matériaux, instrumentation et biosystèmes

Titre : Développement de méthodes de diagnostic rapide d'erreurs innées du métabolisme associées à des troubles neurologiques

Mots clés : Dopamine, Sérotonine, Tétrahydrobioptérine, Folates, Chromatographie, Spectrométrie de masse, Chimie Analytique, troubles neurologiques

Résumé : Les erreurs innées du métabolisme sont des maladies héréditaires pouvant affecter, entre autres, la synthèse et le transport des neurotransmetteurs. Le diagnostic de ces pathologies repose essentiellement sur l'analyse par chromatographie d'un fluide biologique [plasma, urine, liquide céphalorachidien (LCR)].
L'objectif de cette thèse était de développer des méthodes simples et rapides pour le diagnostic des troubles de la neurotransmission.
Dans un premier temps, nous avons développé et validé le dosage simultané, en moins de 10 minutes, des métabolites de la dopamine, de la sérotonine et de la tétrahydrobioptérine (BH4), par chromatographie liquide ultra-haute pression (UHPLC) couplée à une détection séquentielle électrochimique et fluorimétrique. Cette méthode a été appliquée à l'analyse de 1372 échantillons de LCR, permettant ainsi d'établir les valeurs fréquentes de la population française.
Afin de transposer la méthode précédente en UHPLC couplée à la spectrométrie de masse (MS), nous avons étudié les mécanismes d'auto- et d'électro- oxydation de la BH4, par mobilité ionique différentielle couplée à la MS haute résolution (résonance cyclonique ionique FTICR) et à la photodissociation Infra-rouge. Ce travail nous a permis d'isoler et de caractériser pour la première fois la qBH2, intermédiaire réactionnel fugace de la BH4, impliqué dans le mécanisme d'action de cette dernière. La méthode UHPLC-MS/MS développée, permet en outre le dosage simultané du 5-Méthyl-tétrahydrofolate.

Title : Rapid diagnostic method development of inborn errors of metabolism associated to some neurological disorders

Keywords: Dopamine, Serotonin, Tetrahydrobiopterin, Folates, Chromatography, Mass spectrometry, Analytical Chemistry, neurological troubles

Abstract: Inborn errors of metabolism are inherited diseases that can alter the synthesis and transport of neurotransmitters. The diagnosis of these conditions is currently based on the chromatographic analysis of a biological fluid [plasma, urine, cerebrospinal fluid (CSF)].
The aim of this thesis was to develop simple and rapid methods for the diagnosis of neurotransmitter disorders.
Firstly, we developed and validated the simultaneous determination of dopamine, serotonin, and tetrahydrobiopterin (BH4) metabolites by ultrahigh pressure liquid chromatography (UHPLC) coupled to sequential electrochemical and fluorimetric detection. This method was applied to the analysis of 1372 CSF samples, thus establishing the frequent ranges of the French population. In order to transpose the previous method into UHPLC coupled to mass spectrometry (MS), we studied the mechanisms of auto- and electro- oxidation of BH4, by Differential Ion Mobility coupled to high resolution MS (FTICR) in conjunction with Infra-Red photo-dissociation. This work allowed us to isolate and characterize qBH2, the transient reaction intermediate of BH4, involved in the mechanism of action of the latter. The proposed UHPLC-MS/MS method also allows the simultaneous determination of 5-methyltetrahydrofolate.