



HAL
open science

Mise au point du dosage sanguin des métabolites de la voie du tryptophane en HPLC-MS/MS et perspectives dans le suivi biologique des patients atteints de phénylcétonurie

Lysiane Boulet-Le Gouar

► To cite this version:

Lysiane Boulet-Le Gouar. Mise au point du dosage sanguin des métabolites de la voie du tryptophane en HPLC-MS/MS et perspectives dans le suivi biologique des patients atteints de phénylcétonurie. Sciences pharmaceutiques. 2016. dumas-01628511

HAL Id: dumas-01628511

<https://dumas.ccsd.cnrs.fr/dumas-01628511>

Submitted on 3 Nov 2017

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.

AVERTISSEMENT

Ce document est le fruit d'un long travail approuvé par le jury de soutenance et mis à disposition de l'ensemble de la communauté universitaire élargie.

Il n'a pas été réévalué depuis la date de soutenance.

Il est soumis à la propriété intellectuelle de l'auteur. Ceci implique une obligation de citation et de référencement lors de l'utilisation de ce document.

D'autre part, toute contrefaçon, plagiat, reproduction illicite encourt une poursuite pénale.

Contact au SID de Grenoble : thesebum@ujf-grenoble.fr

LIENS

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 122. 4

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 335.2- L 335.10

<http://www.cfcopies.com/juridique/droit-auteur>

<http://www.culture.gouv.fr/culture/infos-pratiques/droits/protection.htm>

**UNIVERSITÉ GRENOBLE ALPES
FACULTÉ DE PHARMACIE DE GRENOBLE**

Année : 2016

N°

**MISE AU POINT DU DOSAGE SANGUIN DES METABOLITES DE LA VOIE DU
TRYPTOPHANE EN HPLC-MS/MS ET PERSPECTIVES DANS LE SUIVI BIOLOGIQUE
DES PATIENTS ATTEINTS DE PHENYLCETONURIE.**

MEMOIRE DU DIPLOME D'ETUDES SPECIALISEES DE BIOLOGIE MEDICALE
Conformément aux dispositions du décret N° 90-810 du 10 septembre 1990, tient lieu de THESE

Lysiane BOULET-LE GOUAR

[Données à caractère personnel]

**MEMOIRE SOUTENU PUBLIQUEMENT À LA FACULTÉ DE PHARMACIE DE
GRENOBLE**

Le : 22 septembre 2016

DEVANT LE JURY COMPOSÉ DE

Président du jury :

M. le Professeur Patrice Faure

Membres :

M. le Docteur Gérard Besson

Mme le Docteur Christelle Corne

Mme le Docteur Véronique Ducros

M. le Professeur François Maillot

M. le Professeur Bertrand Toussaint

La Faculté de Pharmacie de Grenoble n'entend donner aucune approbation ni improbation aux opinions émises dans les mémoires ; ces opinions sont considérées comme propres à leurs auteurs.

Liste des enseignants UFR



Doyen : SEVE Michel
Vice-doyenne : DEMEILLIERS Christine

Année 2015-2016

ENSEIGNANTS A L'UFR DE PHARMACIE

PROFESSEURS DES UNIVERSITES

BAKRI	Aziz	Pharmacie Galénique et Industrielle, Formulation et Procédés Pharmaceutiques (TIMC-IMAG)
BOUMENDJEL	Ahcène	Chimie Organique (D.P.M.)
BURMEISTER	Wim	Biophysique (U.V.H.C.I)
DECOUT	Jean-Luc	Chimie Inorganique (D.P.M.)
DROUET	Christian	Immunologie Médicale (TIMC-IMAG)
DROUET	Emmanuel	Microbiologie (U.V.H.C.I) -
GODIN-RIBUOT	Diane	Physiologie-Pharmacologie (HP2)
LENORMAND	Jean Luc	Ingénierie Cellulaire, Biothérapies (THEREX, TIMC, IMAG)
MARTIN	Donald	Laboratoire TIMC-IMAG (UMR 5525 UJF-CNRS)
MOINARD	Christophe	LABFA (U Inserm 1055)
PEYRIN	Eric	Chimie Analytique (D.P.M.)
RIBUOT	Christophe	Physiologie – Pharmacologie (HP2)
WOUESSIDJEWÉ	Denis	Pharmacotechnie (D.P.M.)

PROFESSEURS DES UNIVERSITES-PRATICIENS HOSPITALIERS

ALLENET	Benoit	Pharmacie Clinique (THEMAS TIMC-IMAG/MCU-PH)
CORNET	Murielle	Parasitologie – Mycologie Médicale (LAPM, PU-PH)
DANEL	Vincent	Toxicologie (SMUR SAMU / PU-PH)
FAURE	Patrice	Biochimie (HP2/PU-PH)
MOSSUZ	Pascal	Hématologie (PU-PH-THEREX-TIMC)
SEVE	Michel	Biochimie – Biotechnologie (IAB, PU-PH)

PROFESSEURS EMERITES

CALOP	Jean
GRILLOT	Renée
ROUSSEL	Anne-Marie

Dernière mise à jour : NM 16/02/2016

DOMAINE DE LA MERCI – 38706 LA TRONCHE CEDEX – France - TEL : +33 (0)4 76 63 71 00 – FAX : +33 (0)4 76 63 71 70

MAITRES DE CONFERENCES DES UNIVERSITES

ALDEBERT	Delphine	Parasitologie-Mycologie (L.A.P.M)
BATANDIER	Cécile	Nutrition et Physiologie (L.B.F.A)
BELAIDI-CORSAT	Elise	Pharmacologie Physiologie –(HP2)
BOURGOIN	Sandrine	Biochimie – Biotechnologie (IAB)
BRETON	Jean	Biologie Moléculaire / Biochimie (L.C.I.B – LAN)
BRIANCON-MARJOLLET	Anne	Physiologie Pharmacologie (HP2)
BUDAYOVA SPANO	Monika	Biophysique (I.B.S)
CAVAILLES	Pierre	Biologie Cellulaire et génétique (L.A.P.M)
CHOISNARD	Luc	Pharmacotechnie (D.P.M)
DELETRAZ-DELPORTE	Martine	Droit Pharmaceutique (Equipe SIS « Santé, Individu, Société »-EAM 4128)
DEMEILLIERS	Christine	Biochimie (L.B.F.A)
DURMORT-MEUNIER	Claire	Biotechnologies (I.B.S)
GEZE	Annabelle	Pharmacotechnie (D.P.M)
GILLY	Catherine	Chimie Thérapeutique (D.P.M)
GROSSET	Catherine	Chimie Analytique (D.P.M)
GUIEU	Valérie	Chimie Analytique (D.P.M)
HININGER-FAVIER	Isabelle	Biochimie (L.B.F.A)
JOYEUX-FAURE	Marie	Physiologie - Pharmacologie (HP2)
KHALEF	Nawel	Pharmacie Galénique (TIMC-IMAG)
KRIVOBOK	Serge	Biologie Végétale et Botanique (L.C.B.M)
MELO DE LIMA	Christelle	Biostatistiques (L.E.C.A)
MOUHAMADOU	Bello	Cryptogamie, Mycologie Générale (L.E.C.A)
NICOLLE	Edwige	Chimie Thérapeutique (D.P.M)
OUKACINE	Farid	Chimie Thérapeutique (D.P.M)
PERES	Basile	Pharmacognosie (D.P.M)
PEUCHMAUR	Marine	Chimie Organique (D.P.M.)
RACHIDI	Walid	Biochimie (L.C.I.B)
RAVELET	Corinne	Chimie Analytique (D.P.M)
SOUARD	Florence	Pharmacognosie (D.P.M)
TARBOURIECH	Nicolas	Biophysique (U.V.H.C.I.)
VANHAVERBEKE	Cécile	Chimie (D.P.M)

MAITRES DE CONFERENCE DES UNIVERSITES-PRATICIENS HOSPITALIERS

BEDOUC	Pierrick	Pharmacie Clinique (THEMAS TIMC-IMAG/MCU-PH)
BUSSER	Benoit	Pharmacie (IAB-INSERM)
GERMI	Raphaëlle	Microbiologie (U.V.H.C.I)

PROFESSEURS CERTIFIES

FITE	Andrée
GOUBIER	Laurence

PROFESSEURS ET MAITRES DE CONFERENCE ASSOCIES (PAST/MAST)

BELLET	Béatrice	Pharmacie Clinique
RIEU	Isabelle	Qualitologie (Praticien Attaché – CHU)
TROUILLER	Patrice	Santé Publique (Praticien Hospitalier – CHU)

PROFESSEURS AGREGES (PRAG)

GAUCHARD	Pierre-Alexis	(D.P.M)
-----------------	---------------	---------

CHU : Centre Hospitalier Universitaire
CIB : Centre d'Innovation en Biologie
DPM : Département de Pharmacochimie Moléculaire
HP2 : Hypoxie Physiopathologie Respiratoire et Cardiovasculaire
IAB : Institut Albert Bonniot, Centre de Recherche « Oncogenèse et Ontogenèse »
IBS : Institut de Biologie Structurale
LAPM : Laboratoire Adaptation et Pathogenèse des Microorganismes
LBFA : Laboratoire Bioénergétique Fondamentale et Appliquée
LCBM : Laboratoire Chimie et Biologie des Métaux
LCIB : Laboratoire de Chimie Inorganique et Biologie
LECA : Laboratoire d'Ecologie Alpine
LR : Laboratoire des Radio pharmaceutiques
TIMC-IMAG : Laboratoire Technique de l'Imagerie, de la Modélisation et de Cognition
UVHCI : Unit of Virus Host Cell Interactions

Remerciements

A Monsieur le Professeur Patrice Faure, Président du jury

Je vous remercie de m'avoir fait confiance au cours de toutes mes années d'internat, ainsi que de m'avoir donné l'opportunité de travailler sur le métabolisme du tryptophane. Merci également de me faire l'honneur de présider ce jury de thèse.

A Madame le Docteur Christelle Corne, ma directrice de thèse

Merci de m'avoir fait plonger et aimer ce monde passionnant qu'est celui des maladies métaboliques héréditaires. Je tiens également à te remercier d'avoir accepté de m'encadrer lors de ce travail. Ton grand professionnalisme, ta rigueur, ton écoute, ton soutien ainsi que ta disponibilité sont autant de qualités que j'apprécie et qui font de toi une chef hors pair.

A Madame le Docteur Véronique Ducros

Je vous remercie sincèrement d'avoir accepté de m'encadrer sur tout ce travail de longue haleine qu'a été la mise au point de ce dosage. Votre disponibilité, votre avis d'experte et votre bienveillance ont permis à ce travail d'aboutir.

A Monsieur le Docteur Gérard Besson

Je vous remercie d'avoir accepté sans hésiter de prendre part à ce travail, qui n'aurait pas pu voir le jour sans votre recrutement actif de patients. Merci également pour votre disponibilité ainsi que vos précieux conseils en statistiques qui ont été fort appréciés.

A Monsieur le Professeur François Maillot

Je vous remercie d'avoir accepté de juger ce travail. Je suis honorée du temps que vous m'accordez en faisant partie de ce jury.

A Monsieur le Professeur Bertrand Toussaint

Je vous remercie de n'avoir jamais douté de mes capacités à mener à bien ce projet. Merci également de la confiance que vous me réitérez au cours du temps.

Je tiens également à remercier toutes les personnes sans qui ce projet n'aurait pas pu devenir ce qu'il est :

Un grand merci à toute l'équipe de Spectrométrie de Masse : votre bonne humeur quotidienne et votre disponibilité ont rendu ce travail agréable, même dans les moments difficiles. Je tiens à remercier particulièrement Julien : merci pour tout le temps que tu as passé sur ce projet, pour tes bonnes idées, ainsi que pour avoir compris et réalisé mes idées parfois farfelues. A Cécile également, merci pour ton investissement dans ce travail : ta supervision et tes conseils quotidiens nous ont permis d'être efficaces tout au long de ce projet.

Merci au Docteur Amandine Rubio, d'avoir accepté de participer à cette étude et nous avoir permis le recrutement de patients pédiatriques.

Merci à la société Sciex, en particulier à M Paccou, pour son aide financière sur ce projet.

Au Docteur Laetitia Van Noolen : merci pour ton écoute et tes conseils. Travailler au quotidien avec toi est un vrai plaisir. Merci également pour ton amitié.

A toutes les équipes que j'ai eu la chance de côtoyer au cours de mon internat, en particulier les laboratoires MHM et BEP. Merci pour tout ce que vous m'avez appris, toujours dans la bonne humeur.

A mes co-internes, présents ou passés, en particulier à Elodie et Cécile, pour tous les bons moments passés ensemble.

A mes parents, merci pour votre soutien au quotidien, pour n'avoir jamais cessé de croire en moi et pour l'éducation que vous m'avez donnée et qui fait ce que je suis aujourd'hui.

A ma famille et belle –famille qui me soutiennent tous les jours, de près ou de loin. A tous ceux qui ont subi mes études à rallonges et mes indisponibilités, en particulier Mathieu.

A mes amis, merci pour tous ces excellent moments passés ensemble. Que ceux-ci soient encore plus nombreux à l'avenir.

A Cédric, ton soutien et ton amour sans failles ont permis à tout cela de voir le jour.

Table des matières

Liste des Figures	9
Liste des Tableaux	11
Liste des abréviations	13
Introduction	17
Partie 1 : Revue générale de la littérature	18
Chapitre 1 : Le tryptophane	19
1. Métabolisme du Trp	19
2. Métabolisme du Trp et clinique : état de l'art	21
1. Voie des kynurénines	21
2. Voie de la sérotonine.....	23
3. Maladies héréditaires du métabolisme.....	24
3. Principes analytiques pour le dosage du Trp et de ses métabolites : état de l'art	27
1. Dosage du Trp et du 5HT	27
2. Dosage simultané de plusieurs molécules de la voie du Trp.....	28
Chapitre 2 : La phénylcétonurie	31
1. Introduction.....	31
2. Biochimie	33
3. Clinique.....	36
4. Diagnostic	38
5. Prise en charge	40
Chapitre 3 : Tryptophane et PCU : état de l'art	44
Chapitre 4 : Spectrométrie de masse : principe.....	47
Partie 2 : Matériel et Méthodes	50
Chapitre 1 : But de l'étude	51
Chapitre 2 : Matériel	53
1. Standards.....	53
2. Autres consommables et petit matériel.....	53
3. Equipement HPLC-MS/MS et conditions chromatographiques	54

4. Echantillons plasmatiques	54
Chapitre 3 : Méthodes	56
1. Préparation de la gamme et des échantillons.....	56
2. Contrôles internes de qualité	57
3. Paramètres HPLC et MS/MS.....	58
4. Paramètres de validation de méthode.....	62
1. Reproductibilité de la gamme	63
2. Répétabilité	63
3. Fidélité intermédiaire	63
4. Limites de détection (LOD) et de quantification (LOQ).....	64
5. Limite de linéarité haute	64
6. Contamination.....	64
7. Stabilités : standards, CIQ, sang total, résidu sec, résidu sec solubilisé, plasma lors de congélations successives	65
8. Exactitude.....	68
9. Effet matrice et efficacité d'extraction.....	68
10. Valeurs de référence	69
11. Comparaison du type de tube de prélèvement	70
12. Variabilité intra-individuelle.....	70
13. Variabilité inter-opérateur	70
5. Autres méthodes de dosages utilisées.....	71
6. Analyses statistiques	71
Partie 3 : Résultats	72
Chapitre 1 : Validation de méthode	73
1. Reproductibilité de la gamme	73
2. Répétabilité	76
3. Fidélité intermédiaire	77
4. Limites de détection (LOD) et de quantification (LOQ).....	78
5. Limite de linéarité haute	79
6. Contamination inter-échantillon.....	80
7. Stabilités : standards, CIQ, sang total, résidu sec, résidu sec solubilisé, plasma lors de congélations successives	80
1. Stabilité des standards	80

2.	Stabilité des CIQ	81
3.	Stabilité du sang total.....	82
4.	Stabilité du résidu sec.....	85
5.	Stabilité du résidu sec solubilisé.....	87
6.	Stabilité du plasma lors de cycles de congélation/décongélation successifs.....	89
8.	Exactitude	89
9.	Effet matrice et efficacité d'extraction	90
10.	Interférence.....	91
11.	Valeurs de référence	91
1.	Sujets à jeun prélevés sur tube EDTA.....	91
2.	Sujets non à jeun prélevés sur tube EDTA.....	92
12.	Comparaison du type de tube de prélèvement	93
13.	Variabilité intra-individuelle	96
14.	Variabilité inter-opérateur	97
	Chapitre 2 : Modifications du métabolisme du Trp dans une population phénylcétonurique.....	99
	Partie 4 : Discussion	102
	Chapitre 1 : Méthode analytique	103
1.	Maitrise des risques	103
2.	Paramètres de validation de méthode.....	106
	Chapitre 2 : Modifications du métabolisme du Trp dans une population phénylcétonurique.....	111
	Conclusion.....	114
	Bibliographie.....	116
	Annexes.....	130
	Serment de Galien.....	137

Liste des Figures

Figure 1 : Métabolisme du Trp chez l'homme.....	20
Figure 2 : Voies métaboliques des amines biogènes.....	25
Figure 3 : Métabolisme de la phénylalanine.	32
Figure 4 : Métabolisme de la voie des ptérines et enzymes ptérines-dépendantes.	33
Figure 5 : A : Répartition des phénotypes de PCU à travers le monde. B : Répartition des déficits mondiaux de la voie du BH ₄ répertoriés dans la base de données BLODEF.	34
Figure 6 : Cartographie des principales mutations connues dans la phénylcétonurie..	35
Figure 7 : Algorithme pour le diagnostic différentiel des hyperphénylalaninémies.	39
Figure 8 : Répartition des aliments naturels lors des régimes des patients PCU.....	41
Figure 9 : Source d'ionisation à pression atmosphérique par électro-nébulisation en mode positif... ..	48
Figure 10 : Schéma d'un spectromètre de masse en tandem.....	49
Figure 11 : Le métabolisme du tryptophane via les voies des kynurénines et de la sérotonine.	52
Figure 12 : Préparation pré-analytique des échantillons	56
Figure 13 : Exemple de chromatogramme obtenu, représentant la somme de toutes les transitions recherchées pour chaque période (A), et exemple de pics obtenu pour AA (haut) et son SI (bas) lors de l'extraction de leurs transitions (B)	59
Figure 14 : Schémas représentant le montage effectué lors du run : flux de la phase mobile et de l'échantillon lors des périodes 1 et 3 (A), et lors de la période 2 pour le Trp (B).....	60
Figure 15 : Descriptif des pourcentages des phases mobiles et du débit lors de la séquence.	61
Figure 16 : Protocole utilisé pour tester la stabilité des résidus secs.	67
Figure 17 : Reproductibilité de la gamme	76
Figure 18 : Exemple de biais retrouvés lors de l'essai de limite de linéarité haute pour la sérotonine (5HT).....	79

Figure 19 : Stabilité des molécules d'intérêt dans le sang total conservé à l'abri de la lumière à température ambiante (A) ou à 5°C +/- 3°C (B).	84
Figure 20 : Stabilité du résidu sec conservé à l'abri de la lumière à température ambiante (A) ou à -23°C +/- 5°C (B).....	86
Figure 21 : Stabilité du résidu sec solubilisé conservé à l'abri de la lumière et entre 2 et 8 °C en plaque (A) ou en flacon (B).....	88
Figure 22 : Diagrammes des différences obtenus pour chaque molécule.....	96
Figure 23 : Différence de concentrations dans notre population de patients PCU adultes (n=6) par rapport à notre population de référence (n=30) pour 8 de nos molécules.....	100
Figure 24 : Concentrations plasmatiques en phénylalanine (Phe) et en tyrosine (Tyr) retrouvées dans notre population PCU lors du prélèvement pour l'analyse de la voie du Trp.....	101

Liste des Tableaux

Tableau I : Avantages et inconvénients des différentes méthodes de dosage des acides aminés.....	28
Tableau II : Exemple des seuils tolérés de phénylalanine au-delà desquels un traitement doit être mis en place selon les pays.	37
Tableau III : Déficits en BH ₄ et biomarqueurs.....	38
Tableau IV : Modalités de suivi lors des visites des patients PCU.	43
Tableau V : Paramètres MS/MS de chaque molécule d'intérêt.....	62
Tableau VI : Reproductibilité de la gamme	74
Tableau VII : Répétabilité du dosage des différentes molécules	77
Tableau VIII : Fidélité intermédiaire du dosage des différentes molécules.....	78
Tableau IX : Limites de détection (LOD), de quantification (LOQ) et de linéarité haute.	79
Tableau X : Contamination calculée (%) pour chaque molécule selon le test de contamination recommandé par le COFRAC.	80
Tableau XI : Coefficient de variation (%) calculé pour la pente de la droite de calibration de chaque molécule au cours des 4,5 mois	81
Tableau XII : Coefficients de variation (%) obtenus pour les niveaux 1 et 2 de chaque molécule sur 4,5 mois.	82
Tableau XIII : Différences moyennes obtenues lors de 3 cycles de congélation/décongélation.	89
Tableau XIV : Résultats obtenus lors du test d'exactitude.....	90
Tableau XV : Effet matrice et efficacité d'extraction de nos 9 molécules (% de ratios) pour les niveaux 1 et 2.....	90
Tableau XVI : Valeurs de référence obtenues dans la population de sujets-sains prélevés à jeun.	92
Tableau XVII : Valeurs de référence obtenues dans la population de sujets-sains prélevés non à jeun.	93
Tableau XVIII : Résultats obtenus lors de l'essai de variabilité intra-individuelle sur 3 jours	97

Tableau XIX : Variabilité inter-opérateur	98
Tableau XX : Risques potentiels inhérents au dosage des métabolites du Trp et pratiques mises en place pour les maîtriser.....	104

Liste des abréviations

^{13}C -3HA : Acide [$^{13}\text{C}_6$]-3-Hydroxyanthranilique hydrochloride

^{13}C -3HK : U-Ring- $^{13}\text{C}_6$]-3-hydroxykynurénine

^{13}C -AA : Acide [U-Ring- $^{13}\text{C}_6$]-anthranilique hydrochloride

^{13}C -KYN : [$^{13}\text{C}_6$]-L-Kynurénine

^{13}C -XA : Acide [$^{13}\text{C}_6$]-xanthurénique

3HK : 3-hydroxykynurénine

5HIAA : acide 5-hydroxyindoleacétique

5HT : Sérotonine

5HTP : 5-hydroxytryptophane

AA : Acide anthranilique

AADC : Décarboxylase des L-acides aminés aromatiques

ACN : Acétonitrile

AF : Acide formique

AK : Acide kynurénique

AMM : Autorisation de mise sur le marché

ANC : Apports nutritionnels conseillés

APCI : ionisation chimique à pression atmosphérique

ASC : Acide ascorbique

AUC : Aire sous la courbe

BH4 : Tétrahydrobioptérine

BHE : Barrière hématoencéphalique

CE : Energie de collision

CEI : Chromatographie par échange d'ions

CEQ : Contrôle externe de la qualité

CIQ : Contrôle interne de qualité

CPG : Chromatographie en phase gazeuse

CV : Coefficient de variation

CXP : Potentiel de sortie

D4-5HT : [2H4]-5-hydroxytryptamine

D5-AK : Acide [2H5]-kynurénique

D5-Trp : D5-tryptophane 2',4',5',6',7'

DHPR : Dihydroptéridine réductase

DP : Potentiel de déclusterisation

Dt : Dwell time

EFS : Etablissement Français du Sang

ELISA : Enzyme linked immunosorbent assay

EP : Potentiel d'entrée

ESI : Electro-nébulisation ou électrospray

GMP : glycomacropéptides

GTPCH : Guanosine triphosphate cyclohydrolase

HPA : Hyperphénylalaninémie

HPLC : Chromatographie liquide haute performance

HRMS/MS : UPLC-MS/MS haute résolution

IDO : Indoléamine-2,3-dioxygénase

IMC : Indice de masse corporelle

IRM : Imagerie à résonance magnétique

KAT : Kynurénine aminotransférase-1

KMO : Kynurénine-3-monooxygénase

KYN : Kynurénine

KYNU : Kynuréninase

LAT1 : transporteur des L-acides aminés de type 1

LCR : Liquide céphalorachidien

LL : Limite de linéarité haute

LNAA : Acides aminés neutres

LOD : Limite de détection

LOQ : Limite de quantification

m/z : rapport masse sur charge

MAO : Monoamine oxydase

MeOH : Méthanol

MHM : Maladies héréditaires du métabolisme

MRM : Multiple reaction monitoring

MS/MS : Spectrométrie de masse en tandem

NAD : Nicotinamide

PA : Acide picolinique

PAH : Phénylalanine hydroxylase

PAL : Phénylalanine-ammonia lyase

PCD : Ptérine-4a-carbinolamine déhydratase

PCU : Phénylcétonurie

Phe : Phénylalanine

PNDS : Protocole national de diagnostic et de soins

QA : Acide quinolinique

R² : Coefficient de détermination de la droite

S/N : Signal sur bruit

SI : Standards internes

SPE : Extraction en phase solide

SR : Sepiaptérine réductase

SRM : Selected reaction monitoring

TA : Température ambiante

TCA : Acide trichloroacétique

TDO : Tryptophane-2,3-dioxygénase

TFA : Acide trifluoroacétique

TOF : spectrométrie de masse à temps de vol

TpH : Tryptophane hydroxylase

Trp : Tryptophane

Tyr : Tyrosine

TyrH : Tyrosine hydroxylase

UV : ultraviolet

XA : Acide xanthurénique

Introduction

La phénylcétonurie (PCU ; OMIM 261600) est une amino-acidopathie dont la prévalence est d'environ 1/16 000 bébés en France. Son évolution clinique s'est fortement améliorée depuis 1972, date à laquelle le dépistage systématique a été instauré en France. Cette pathologie est traitable, mais la physiopathologie neurologique n'est pas encore parfaitement comprise.

Le tryptophane (Trp), acide aminé essentiel, possède une dégradation selon deux voies métaboliques principales : celle des kynurénines et celle de la sérotonine. La recherche sur le métabolisme du Trp a vu un grand essor au cours des dernières années, et certains éléments nous ont permis d'émettre l'hypothèse d'une relation entre la PCU et le métabolisme du Trp.

Notre objectif était de quantifier dans le plasma de patients 9 molécules de la voie métabolique du Trp, grâce à la spectrométrie de masse en tandem, outil diagnostique puissant.

Après une revue bibliographique concernant la voie métabolique du Trp et la PCU, nous aborderons la mise au point technique du dosage en HPLC-MS/MS du Trp et de 8 de ses métabolites. Nous détaillerons ensuite la validation de méthode selon la norme NF EN ISO 15189. Puis, nous analyserons les résultats obtenus dans la population phénylcétonurique recrutée au sein du CHU de Grenoble. Enfin, la discussion nous permettra de faire le point sur cette méthode de dosage, ainsi que sur les modifications de la voie métabolique du Trp observées chez les patients atteints de PCU.

Partie 1 : Revue générale de la littérature

Chapitre 1 : Le tryptophane

1. Métabolisme du Trp

Le tryptophane (Trp) est un des 10 acides aminés essentiels, c'est-à-dire apportés uniquement par l'alimentation. Les apports nutritionnels du Trp sont capitaux, car il est le précurseur de plusieurs métabolites de grande importance, tels que la sérotonine (5HT) ou la mélatonine. Les apports nutritionnels conseillés (ANC) en Trp varient selon le sexe et l'âge, allant de 4 mg/kg/j chez l'adulte à 20 mg/kg/j chez le nourrisson selon les recommandations françaises (1). Le Trp peut être catabolisé selon 3 voies métaboliques : la voie des kynurénines, celle du 5HT et celle des indoles (Figure 1).

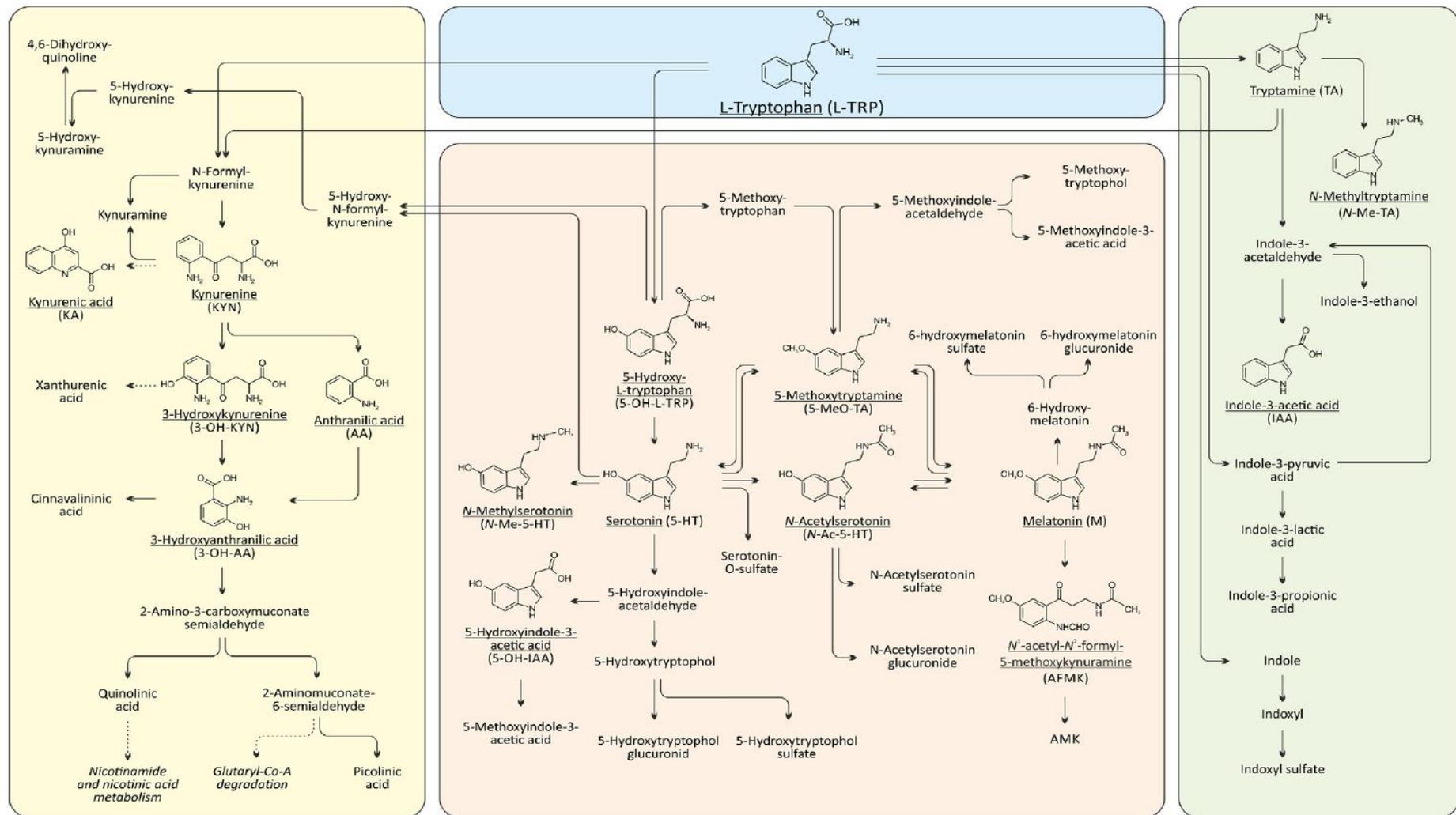


Figure 1 : Métabolisme du Trp chez l'homme. La partie jaune représente la voie des kynurénines, la partie rose celle de la sérotonine, et la partie verte celle des indoles (métabolisme bactérien). D'après (2).

La voie des kynurénines représente la majorité du catabolisme du Trp (environ 98% de sa dégradation) et conduit à la synthèse intracellulaire de nicotinamide (NAD). Le Trp est d'abord métabolisé en kynurénine (KYN), via l'action de deux enzymes hème-dépendantes : l'indoléamine-2,3-dioxygénase (IDO), ubiquitaire et dépendante du statut inflammatoire (3), et la tryptophane-2,3-dioxygénase (TDO), essentiellement hépatique. Plus récemment, des chercheurs ont mis en évidence une seconde isoenzyme de l'IDO, l'IDO2, dont l'expression semble restreinte aux cellules présentatrices de l'antigène, au foie, au rein, au cerveau et au placenta (4). La KYN, métabolite pivot de la voie des kynurénines, permet ensuite la synthèse de différentes molécules, telles que les acides kynurénique (AK) et anthranilique (AA) ou la 3-hydroxykynurénine (3HK).

La voie de la sérotonine (5HT) est quantitativement moins importante (environ 2% du catabolisme du Trp), mais son métabolisme, en particulier cérébral, ainsi que son implication dans la dépression et le sommeil en font une voie primordiale. Le 5HT est en effet impliqué dans la contraction du muscle lisse, la régulation de la pression artérielle ainsi que la neurotransmission périphérique et centrale (5). La mélatonine, métabolite issu du 5HT, est connue pour son importance dans la modulation du rythme circadien et en particulier pour son rôle dans l'induction du sommeil (6).

Enfin, une dernière voie, mineure, existe : la voie des indoles, ou voie des bactéries intestinales. Au niveau intestinal, 4 à 6% du Trp ingéré est immédiatement dégradé en différents produits, dont l'indole (7). Cette voie, presque anecdotique, ne sera pas développée dans la suite de ce travail.

2. Métabolisme du Trp et clinique : état de l'art

1. Voie des kynurénines

Depuis la dernière décennie, la recherche concernant la voie des kynurénines est en plein essor.

En effet, de nombreux auteurs ont impliqué cette voie dans la pathologie cardiovasculaire, que ce soit en tant que facteur de risque (8), modulateur du stress oxydant (9) ou en tant que prédisposition génétique à l'hypertension artérielle (10). Différentes données nous ont permis de formuler l'hypothèse que cette voie métabolique pourrait être un des facteurs de comorbidité cardiovasculaire présente dans le syndrome d'apnée du sommeil (11). En effet, le ratio KYN/Trp se trouve augmenté dans l'obésité (12), ainsi que chez les patients souffrant d'une maladie coronaire établie (13), tandis que d'autres auteurs le présentent comme prédicteur d'un nouvel évènement coronaire (14). Le lien avec l'athérosclérose a été clairement démontré, que ce soit via la corrélation entre épaisseur intima/média et activité de l'IDO (15), ou par l'augmentation des concentrations de KYN, 3HK et d'acide quinolinique (QA) présentes dans la plaque d'athérome (16). Des études chez le rat hypertendu ont montré une surexpression du gène de la kynuréninase (KYNU, permettant la synthèse d'AA à partir de la KYN et de 3HA à partir du 3HK) (17) ainsi qu'une diminution de l'activité de la kynurénine aminotransférase-1 (KAT, métabolisant la KYN en AK et le 3HK en acide xanthurénique (XA)) (18). Un lien entre les concentrations des métabolites de la voie des kynurénines et la survie après un arrêt cardiaque a également été démontré (19). A noter que quasiment tous les métabolites de la voie des kynurénines possèdent des propriétés pro- (QA, 3HK et 3HA) ou anti-oxydantes (AK et l'IDO) (9).

D'autres chercheurs ont clairement montré le lien entre l'IDO et la tolérance immunitaire (20), favorisant l'échappement tumoral (21), tandis que le 3HA et QA semblent posséder une toxicité vis-à-vis des cellules T *in vitro* (22). Cette relation entre la voie des kynurénines et la cancérogénèse se matérialise également par l'activation du récepteur aux arylcarbonés par certaines kynurénines (KYN et AK surtout), ce récepteur étant connu pour son activité pro-tumorigène (23).

Enfin, un pan de la recherche concernant le métabolisme du Trp se focalise sur la dépression et les maladies neurologiques. En effet, alors que le rôle du 5HT dans la dépression est largement connu (24), la voie des kynurénines est maintenant également impliquée dans cette pathologie (25),

ainsi que dans plusieurs pathologies neurodégénératives, telle que la maladie d'Alzheimer (26). Cette voie est depuis peu également décrite comme modifiée dans la schizophrénie, où une diminution cérébrale de AK associée à une augmentation de QA sont présentes (27), tandis qu'une accumulation de QA seule a été retrouvée dans l'autisme (28). Dans l'accident vasculaire cérébral, une diminution de la concentration de 3HA est fortement corrélée avec la taille de l'infarctus (29), tandis qu'une augmentation de la concentration de AK ou d'un de ses analogues semble apporter une neuroprotection *in-vivo* (30), tout comme dans l'épilepsie (31). La toxicité de QA dans la sclérose multiple, la sclérose latérale amyotrophique ou la maladie de Huntington a également été avancée (32).

Les tenants et aboutissants de cette voie sont certes de mieux en mieux cernés, mais il existe encore de grandes parts d'ombre à élucider.

2. Voie de la sérotonine

La voie de la sérotonine est impliquée dans de nombreuses pathologies psychiatriques, telles l'anorexie (33), l'anxiété (34) ou encore la dépression (35). Un dysfonctionnement de cette voie est impliqué dans l'hypertension, la migraine, les arythmies cardiaques, la maladie de Raynaud, les syndromes fibrotiques et certains syndromes carcinoïdes (2,36). Depuis peu, cette voie est également impliquée dans les troubles du spectre autistique (37) ou encore dans la dépendance alcoolique (38) ou la douleur chronique (39). Le ratio 5HT/Trp a même été proposé comme marqueur d'agressivité (40). Les inhibiteurs de recapture de la sérotonine, tel que la fluoxétine, sont largement utilisés dans les pathologies précitées, en particulier en tant qu'antidépresseurs (41).

Parmi les métabolites du 5HT, 2 sont de grande importance : la mélatonine et l'acide 5-hydroxyindoleacétique (5HIAA). Un déficit en mélatonine, communément appelée hormone du sommeil, est impliqué dans plusieurs pathologies, comme le cancer, la douleur, le syndrome métabolique, le diabète de type 2, la polyarthrite rhumatoïde ou certains troubles de l'humeur (42).

Le 5HIAA est quant à lui essentiellement connu pour son rôle de biomarqueur des tumeurs endocrines (43).

Alors que le déficit en décarboxylase des L-acides aminés aromatiques (AADC, permettant la métabolisation du 5-hydroxytryptophane (5HTP) en 5HT) commence à être bien connu (cf ci-après), le déficit en tryptophane hydroxylase (TpH, permettant la synthèse du 5HTP à partir du Trp) fait partie des sujets en cours d'étude. Depuis 2003, 2 TpH ont été découvertes : la TpH1, périphérique, et la TpH2, centrale (44). Les modèles animaux de déficience en TpH2 se sont multipliés, permettant une avancée dans la compréhension de la physiopathologie de cette voie, mais, aucun déficit humain n'est à ce jour répertorié à notre connaissance.

La voie de la sérotonine est également fortement intriquée avec d'autres voies d'importances majeures pour la neuromédiation. Une interconnexion avec la voie du GABA est connue, dont les effets dépendent du stade de développement, du circuit neuronal et de la localisation cérébrale (45). La voie de la dopamine possède une enzyme commune avec la voie du 5HT, l'AADC, qui permet la synthèse de dopamine et de 5HT. De plus, certains récepteurs d'une voie sont localisés sur les neurones de l'autre voie, et les transporteurs de l'une possèdent également une affinité pour l'autre voie (45). Il est donc important de garder à l'esprit qu'une modification de la concentration en 5HT cérébrale peut avoir un effet sur la voie du GABA (et donc du glutamate) d'une part, mais également sur celle de la dopamine d'autre part.

3. Maladies héréditaires du métabolisme

La PCU, objet de la présente étude, n'est pas la seule maladie héréditaire du métabolisme (MHM) dans laquelle l'étude de la voie du Trp présente un intérêt.

La maladie de Harntup (OMIM 234500), est une pathologie du transporteur rénal des acides aminés neutres B⁰AT1. Le plus souvent asymptomatique, la clinique peut également être celle d'une dermatite photosensible, d'une ataxie cérébelleuse intermittente ou de symptômes psychotiques.

Ces symptômes provenant probablement du déficit en Trp, le traitement actuellement donné est la niacine, métabolite final de la voie du Trp (46).

Une autre pathologie importante est le déficit en décarboxylase des L-acides aminés aromatiques (OMIM 608643). En effet, l'AADC, permet la transformation du 5HTP en 5HT, mais également la synthèse de dopamine (Figure 2). Cette pathologie touche une centaine de patients à travers le monde, avec comme symptômes au moment du diagnostic une hypotonie, des crises oculogyres, un retard de développement ou d'autres anomalies du mouvement (47). Le traitement (supplémentation en vitamine B6 (cofacteur), acide folinique, agonistes dopaminergiques et inhibiteur de la monoamine oxydase B) semble peu efficace, avec seulement 19% de réponse satisfaisante (48). Une accumulation de 5HTP ayant été relatée dans cette pathologie (49), une modification de la voie des kynurénines est probable, dont la physiopathologie reste à explorer.

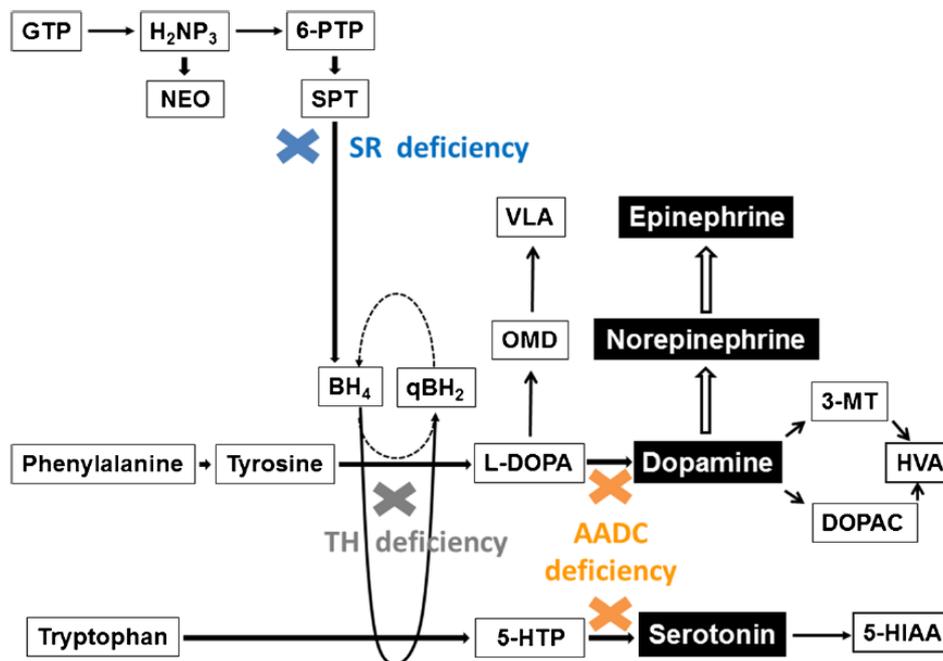


Figure 2: Voies métaboliques des amines biogènes. Abréviations : AADC : décarboxylase des L-acides aminés aromatiques ; BH₂ : 7,8-dihydrobioptérine ; BH₄ : tétrahydrobioptérine ; DOPAC : acide 3,4-dihydroxyphénylacétique ; GTP : guanosine triphosphate cyclohydrolase I ; HVA : acide homovanillique ; H₂NP₃ : dihydronéoptérine triphosphate ; NEO : néoptérine ; OMD : 3-O-méthyl-dopa ; SPT : sépiaptérine ; SR : sépiaptérine reductase ; TH : tyrosine hydroxylase ; VLA : acide vanillacétique ; 5-HTP : 5-hydroxytryptophane ; 6-PTP : 6-pyruvoyl-tétrahydroptérine. D'après (47).

Lors du déficit en monoamine oxydase (MAO) (OMIM 300615), enzyme permettant la dégradation de 5HT en 5HIAA, les patients peuvent présenter un comportement agressif, un retard mental modéré,

des mouvements stéréotypés des mains, ainsi qu'un flush carcinoïde (50). Les inhibiteurs de la MAO, permettant de réduire la dégradation des amines biogènes, sont largement utilisés en thérapeutique, que ce soit en tant qu'antidépresseur (inhibiteur de la MAO-A) ou comme antiparkinsonien (inhibiteur de la MAO-B).

L'acidurie xanthurénique, ou encéphalopathie par hydroxykynuréninurie, (OMIM 236800) est une pathologie dont la prévalence est inférieure à 1/ 1 000 000. Cette pathologie est caractérisée par une excrétion massive de XA, de KYN et de 3HK dans les urines, ces excrétions ne diminuant pas malgré un apport de vitamine B6. Les symptômes, une pellagre (association d'une dermatite, d'une diarrhée et de démence), sont ceux communs à tous les déficits en niacine (51).

D'autres déficits présumés de la voie des kynurénines ont été décrits ; un déficit de conversion du Trp en KYN entraînerait un retard mental avec mouvement d'humeur et hypersexualité (52,53), tandis que le déficit en kynurénine-3-monooxygénase (KMO) (54) ainsi que l'hyperactivation de la picolinate synthase (qui permet la synthèse d'acide picolinique (PA) à partir du 2-aminomuconate 6-semialdéhyde) (55) donneraient une pellagre.

La voie métabolique du Trp peut également avoir une importance dans d'autres MHM de manière plus indirecte.

Dans l'acidurie glutarique de type I (OMIM 231670), la glutaryl-CoA déshydrogénase (l'enzyme déficitaire), est également impliquée dans la voie de dégradation du Trp. Il existe une absence de corrélation entre la concentration cérébrale d'acide glutarique et le phénotype clinique (56), ce qui pourrait être expliqué par une accumulation de kynurénines neurotoxiques (57). Enfin, une diététique pauvre en Trp étant préconisée chez ces patients, un suivi de cette voie métabolique pourrait se révéler intéressant.

Le métabolisme du Trp peut également avoir un grand intérêt dans les pathologies de la neurotransmission avec ou sans hyperphénylalaninémie. Nous expliciterons ci-après les liens entre la

voie du Trp et le BH₄, permettant de s'interroger sur l'implication de cette voie dans toute pathologie de synthèse ou de régénération du BH₄.

Enfin, le régime cétogène constitue un dernier pan reliant la voie du Trp et les MHM. En effet, ce régime, utilisé comme antiépileptique, augmente la concentration en Trp dans le système nerveux central, ainsi que la concentration du neuroprotecteur AK (58). Une modulation de la voie du Trp pourrait donc constituer un traitement efficace de certaines épilepsies métaboliques.

3. Principes analytiques du dosage du Trp et de ses métabolites : état de l'art

1. Dosage du Trp et du 5HT

Le Trp est un zwitterion, dont les pK sont de 2,38 et 9,39 (59). Son dosage est possible lors de la réalisation d'un profil des acides aminés plasmatiques. Les méthodes les plus utilisées sont la chromatographie par échange d'ions (CEI) couplée à une détection colorimétrique grâce à l'utilisation de ninhydrine, et la spectrométrie de masse en tandem, couplée ou non à de la chromatographie liquide haute performance (HPLC). Les méthodes de chromatographie en phase gazeuse (CPG) ou d'HPLC couplée à une détection fluorimétrique sont plus anecdotiques. Les avantages et inconvénients des différentes méthodes utilisées sont regroupés dans le Tableau I.

	<u>CPG</u>	<u>HPLC</u>	<u>CEI</u>	<u>MS/MS</u>
<u>Dérivation préalable éch.</u>	Oui	Oui	Post colonne	Oui
<u>Mode de détection</u>	Ionisation de flamme (FID)	Fluorimétrie	Colorimétrie	Ions +masse
<u>Sensibilité de détection</u>	< 1pmole	< 1pmole	10 pmoles	< 1pmole
<u>1 analyse pour tous les AA</u>	Non	Non	Oui	presque
<u>Durée analyse complète</u>	60 min	90 min	80 à 150 min	3 min (FIA) 20-30 min (HPLC)
<u>Identification d'interférences</u>	Non	Non	Oui	Oui
<u>Préparation échantillons</u>	Complexe (> 30 min)	Complexe (> 30 min)	Simple (<15 min)	Complexe (> 30 min)

Tableau I : Avantages et inconvénients des différentes méthodes de dosage des acides aminés. Abréviation : éch : échantillon. D'après (60).

Le dosage de la sérotonine seule s'effectue classiquement sur sang total ou dans le LCR. Les méthodes utilisées sont la chromatographie couplée à une détection électrochimique (ampérométrique ou coulométrique), fluorimétrie ou par spectrométrie de masse. Une technique immunologique ELISA (Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay) existe également. Les analyses à l'aide de composés radioactifs sont également possibles, mais de moins en moins utilisées. La grande majorité des laboratoires utilisent l'HPLC couplée à un détecteur électrochimique (70% des laboratoires selon le programme de contrôle externe de la qualité Instand).

2. Dosage simultané de plusieurs molécules de la voie du Trp

Le dosage en mutliplexage de la voie métabolique du Trp a connu un grand essor depuis les années 2000.

Des publications rapportent le dosage de certains métabolites de la voie de la KYN uniquement, par HPLC couplée à un spectromètre de masse en tandem (MS/MS), dans le plasma

(2,61–67), l'urine ou le surnageant de culture cellulaire (68), dans le sérum en HPLC-MS (69), ou encore au niveau du striatum à l'aide de la CPG couplée à un MS/MS (70). D'autres auteurs ont mis au point une méthode de quantification en HPLC avec détection UV (71–73), ou à l'aide de chromatographie capillaire couplée à de la spectrométrie de masse (74,75).

D'autres publications se focalisent sur la voie du 5HT uniquement. Parmi celles-ci, une relate le dosage simultané de 5HT et du 5HTP en HPLC couplée à une détection fluorimétrique (76), une autre permet le dosage du 5HTP, du 5HT et du 5HIAA grâce à l'utilisation de l'extraction en phase solide (SPE) en ligne (77). Une troisième, utilisant l'HPLC couplée à une détection coulométrique, permet le dosage des dérivés indoles, de 4 catécholamines, du Trp et de la KYN (78).

Le dosage des 2 voies du Trp en simultané est plus rare. Certains auteurs quantifient le Trp associé à quelques rares métabolites des deux voies en HPLC couplée à une détection dans l'ultraviolet (UV) ou en fluorescence dans le sérum (79), l'urine (80) ou encore dans les tissus (81). Un autre auteur a mis au point une méthode en UPLC-MS/MS haute résolution (HRMS/MS) pour la quantification de quelques molécules dans l'urine (82). Une seule publication relate une méthode contenant également le 5HTP (2), mais celle-ci ne permet pas le dosage de XA. D'autres publications relatent une quantification de Trp, KYN, AK et du 5HIAA (80), ou de Trp, KYN, 5HT et QA (83).

La très grande majorité des méthodes permettant un dosage simultané des 2 voies dans le sang utilise des tubes EDTA, avec un mode opératoire pré-analytique variable. Parmi les plus populaires se trouvent la déprotéinisation par du méthanol (MeOH) (2), de l'acide trichloroacétique (TCA) (64,84), de l'acétonitrile (ACN) (75,85), de l'acide perchlorique (74,86) ou de l'acide trifluoroacétique (TFA) (62) parfois accompagnée d'une évaporation. D'autres utilisent la SPE (61,63).

D'autres méthodes, telles la métabolomique à l'aide d'UPLC-TOF par exemple, ont également permis de mettre en évidence l'importance de ces molécules (87). Une autre approche consiste à quantifier les acides aminés neutres (Trp, Tyr, Phe), en UPLC couplée à une détection UV (88). Un

autre auteur rapporte la quantification des acides aminés neutres (LNAA) ainsi que les métabolites de la voie du Trp et le 5HT grâce à de l'UPLC-MS/MS (mais sans réussir à quantifier XA et 3HA dans le plasma humain) (85).

Malgré cette diversité de méthode, aucune publication à notre connaissance ne relate un dosage permettant la quantification de toutes nos molécules dans le plasma humain. En effet, 5HTP et XA en particulier sont rarement quantifiés.

Chapitre 2 : La phénylcétonurie

1. Introduction

La phénylcétonurie (PCU ; OMIM 261600) est une maladie génétique liée à un déficit dans la voie du métabolisme de la phénylalanine (Phe). La première étape de cette voie consiste en une hydroxylation de la Phe en tyrosine (Tyr), par la phénylalanine hydroxylase hépatique (PAH ; EC 1.14.16.1), étape irréversible de ce catabolisme et dont le déficit est à l'origine de la PCU (Figure 3). Cette maladie causant un profond retard mental a d'abord été découverte par le Dr Folling (89), avant d'être plus amplement explorée par le Dr Bickel qui proposa un traitement diététique par régime restreint en Phe (90). La PCU étant une maladie récessive autosomique répondant aux critères de Wilson et Jungner (91), un dépistage systématique de la population générale a été instauré. Pour cela, le Dr Guthrie a mis au point un test à partir de sang séché déposé sur papier buvard dans les années 1960, nommé plus tard papier Guthrie (92). Le dépistage néonatal de la PCU sera progressivement généralisé, et accessible en France dès 1972. Le dépistage de masse a permis de déterminer la prévalence de la maladie, qui varie en fonction des ethnies de 8 (Japon) à 385 (Turquie) cas par million d'habitants (93). En France, la prévalence de la PCU est d'environ 1/16 000 bébés, avec 1867 malades dépistés (PCU classiques et atypiques) entre 1972 et 2012 (94).

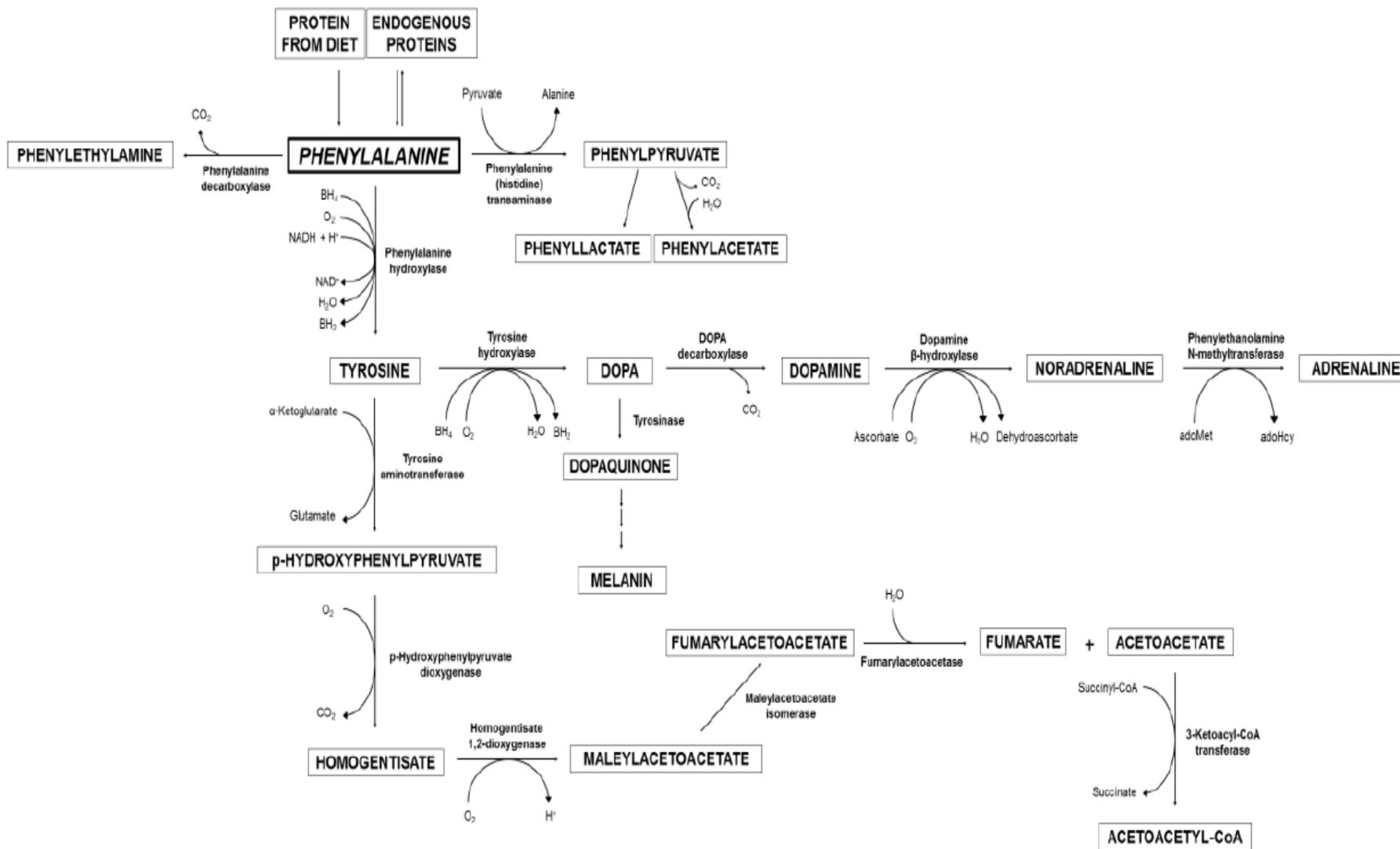


Figure 3 : Métabolisme de la phénylalanine. D'après (95).

2. Biochimie

Sur le plan biochimique, la PAH nécessite un coenzyme ptérine obligatoire, la tétrahydrobioptérine (BH₄), pour synthétiser la Tyr. Le BH₄ est formé à partir du guanosine triphosphate et régénéré par deux enzymes, la dihydroptéridine réductase (DHPR) et la ptérine-4a-carbinolamine déshydratase (PCD). Ainsi, une hyperphénylalaninémie peut être causée par un déficit de la PAH, de la production de BH₄ ou de son recyclage. Un schéma de cette voie métabolique est représenté en Figure 4.

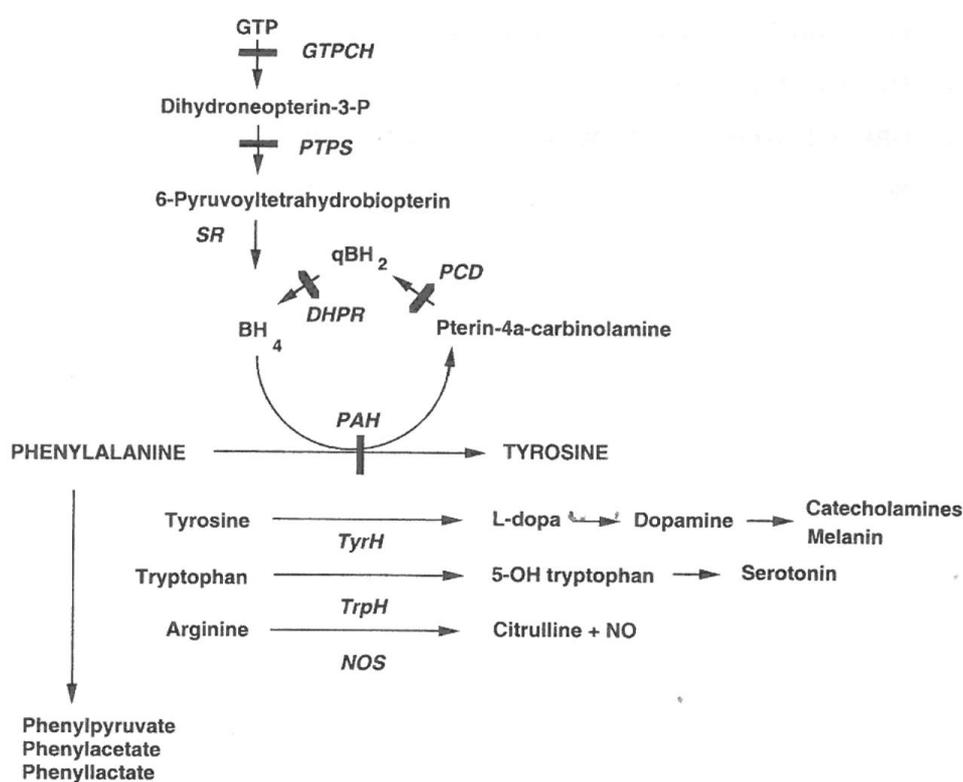


Figure 4 : Métabolisme de la voie des ptérides et enzymes ptérides-dépendantes. Abréviations: BH₂: dihydrobioptérine ; DHPR : dihydroptéridine réductase ; GTP : guanosine triphosphate ; GTPCH : guanosine triphosphate cyclohydrolase ; NO : oxyde nitrique ; NOS : oxyde nitrique synthase ; P : phosphate ; PAH : phénylalanine hydroxylase ; PCD : ptérine-4a-carbinolamine déshydratase ; PTPS : pyruvoyl-tétrahydrobioptérine synthase ; SR : sepiaptérine réductase ; TrpH : tryptophane hydroxylase ; TyrH : tyrosine hydroxylase. D'après (96).

Sous apports protéiques conformes aux ANC, nous pouvons distinguer la PCU classique (concentration sanguine de Phe supérieure à 1200 µM), l'hyperphénylalaninémie (HPA) ou PCU atypique (concentration sanguine de Phe comprise entre 600 et 1200 µM), l'HPA modérée

(concentration sanguine de Phe comprise entre 120 et 600 μM), tandis que les déficits du métabolisme des biotéridines, initialement appelés PCU (ou HPA) maligne, sont maintenant nommés selon l'enzyme déficiente (96). La répartition mondiale des différentes formes de PCU retrouvées est représentée en Figure 5. Parmi les différentes formes de déficit en BH_4 , la maladie de Segawa (déficit en guanosine triphosphate cyclohydrolase (GTPCH)) et le déficit en sépiaptérine réductase (SR) sont les seuls ne donnant pas d'HPA.

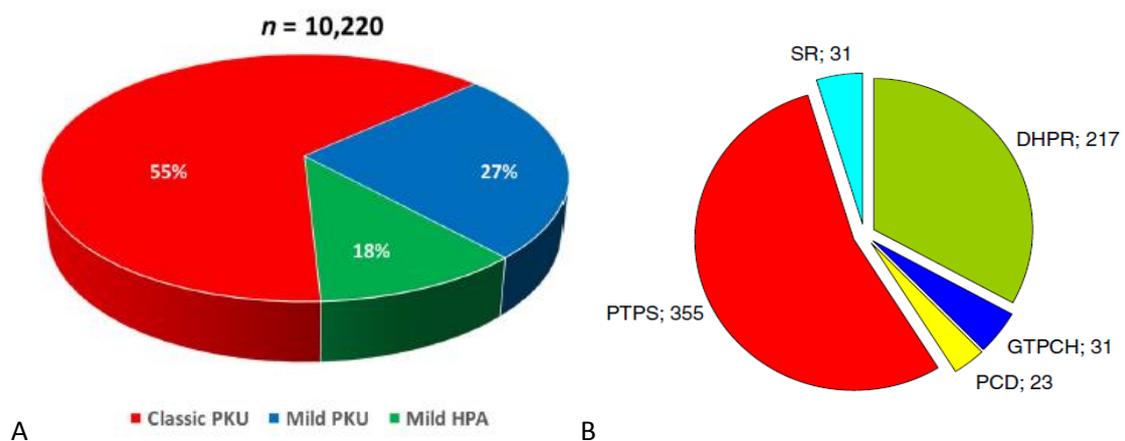


Figure 5 : A : Répartition des phénotypes de PCU à travers le monde référencés dans la base de données BIOPKU, 2016. D'après (97) B : Répartition des déficits mondiaux de la voie du BH_4 répertoriés dans la base de données BIODEF, 2012 (n=657). D'après (98). Abréviations : PKU : phénylcétonurie ; HPA : hyperphénylalaninémie ; DHPR : dihydroptéridine réductase ; GTPCH : guanosine triphosphate cyclohydrolase ; PCD : ptérine-4a-carbinolamine déhydratase ; PTPS : pyruvoyl-tétrahydropterine synthase ; SR : sépiaptérine réductase.

La PAH est une enzyme essentiellement hépatique, bien qu'une activité résiduelle ait été retrouvée au niveau rénal (99). Chez l'homme, la PAH est un mélange de tétramères et de dimères, dont le monomère comprend 452 acides aminés (100). Son activité est régulée par différents facteurs, parmi lesquels la concentration sanguine de Phe (101). Le gène de la PAH se situe sur le chromosome 12 et contient 13 exons, pour un cDNA d'environ 2,4 kb (102). Plus de 500 mutations de la PAH ont été répertoriées, dont la majorité se trouve être des mutations faux-sens (62%). Un aperçu des mutations les plus fréquentes est représenté en Figure 6.

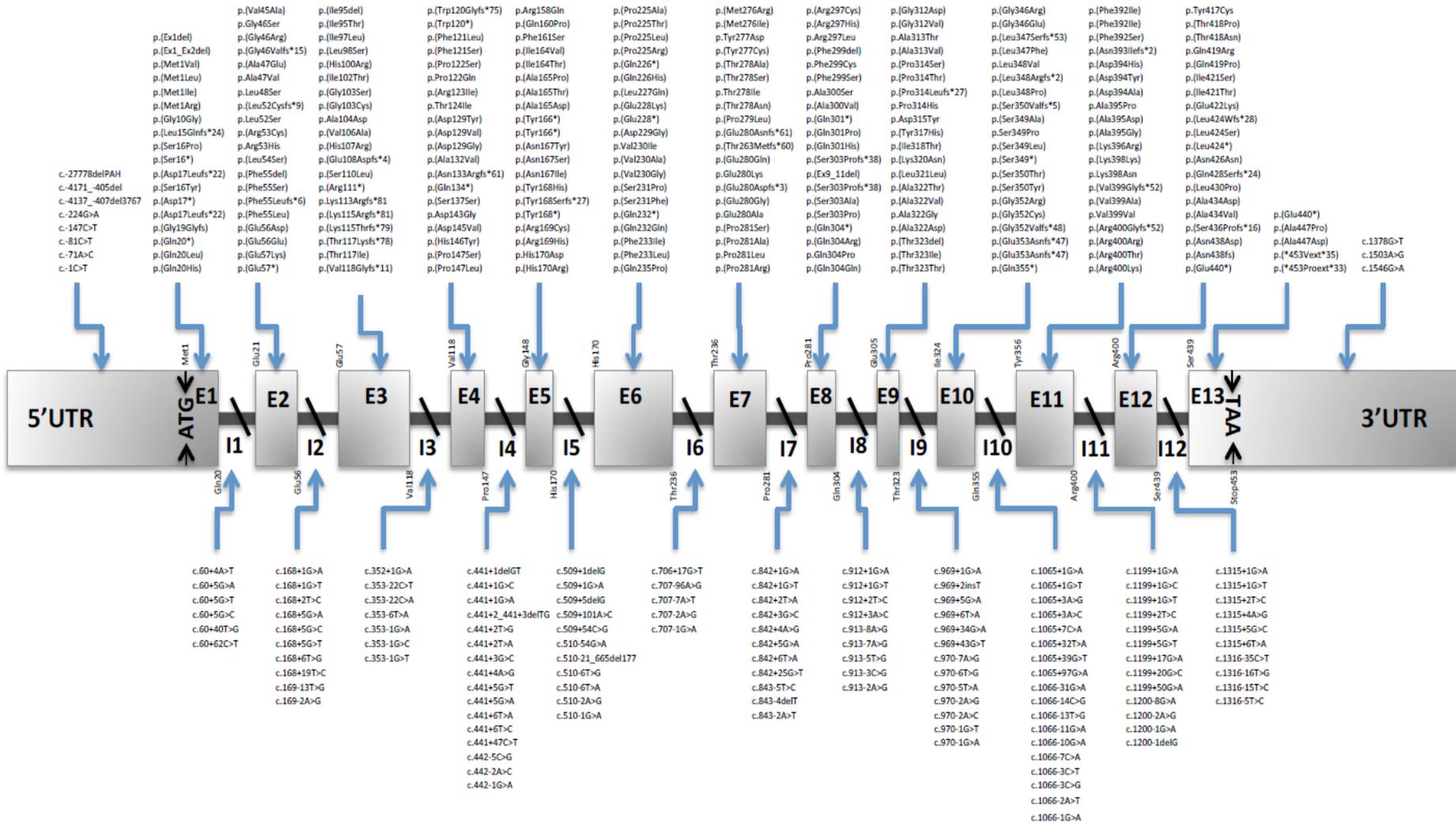


Figure 6 : Cartographie des principales mutations connues dans la phénylcétonurie. D'après (103).

La Phe, acide aminé essentiel, a une importance cruciale, que ce soit pour la synthèse protéique, ou en tant que précurseur de la tyrosine et de ses dérivés, comme la dopamine, la noradrénaline ou encore la mélanine (101). Une forte concentration en Phe entraîne cependant des dommages protéiques, lipidiques et de l'ADN, ainsi qu'une diminution des défenses anti-oxydantes (95). Certains métabolites toxiques de la Phe s'accumulent dans la PCU, tels que les acides phénylpyruvique, phényllactique et phénylacétique, perturbent l'homéostasie redox en modifiant les activités des enzymes antioxydantes (104). Pour ce qui est des neurotransmetteurs, l'action néfaste de la Phe n'est plus à prouver, que ce soit par la saturation du transporteur des acides aminés neutres à travers la barrière hématoencéphalique (BHE) (voir ci-après), ou par l'action de la Phe ou de ses métabolites sur les enzymes permettant la synthèse de neurotransmetteurs (105). De plus, une exposition soutenue à une forte concentration de Phe est corrélée à une diminution de l'intégrité de la microstructure de la substance blanche (106). Le métabolisme cérébral est également affecté, avec entre autre une diminution de l'activité des complexes mitochondriaux dans cette pathologie (107). Enfin, l'homéostasie calcique est également dérégulée dans cette pathologie (95). Le cerveau des patients PCU non traités possède par ailleurs une diminution de l'arborisation des dendrites, une synaptogénèse incomplète et une myélinisation perturbée.

3. Clinique

L'évolution naturelle de la PCU consiste en l'installation de troubles neurologiques graves et irréversibles durant l'enfance. Les signes cliniques les plus fréquents chez les patients non traités sont un retard mental sévère (QI <50), une microcéphalie, des troubles neurologiques (épilepsie, tremblements, électroencéphalogramme anormal, hypertonie et pseudo-parkinsonisme), des troubles cutanées (eczéma, absence de pigmentation) et une alopecie. Cette évolution se voit de plus en plus rarement dans les pays où le dépistage néonatal a été mis en place. Les patients adultes dont le traitement a été interrompu peuvent également montrer un changement comportemental avec hyperactivité, mouvements involontaires, agressivité, anxiété et repli social (96).

Le devenir à long terme des patients traités dès la naissance commence à être connu grâce au recul des dernières décennies. Il est à noter que ces adultes ont une intelligence normale, mais un raisonnement abstrait, une capacité d'attention et une fonction exécutive inférieures à la population générale tandis que le temps de réaction est significativement augmenté (108). De plus, une diminution de la sociabilité est observable chez les adultes PCU, corrélée à leur taux de Phe avant 12 ans (109). A l'heure actuelle, aucune détérioration neurologique n'a été relatée chez les adultes PCU traités dès la naissance, mais il est à noter que nous ne pouvons exclure totalement la possibilité que cela apparaisse lors du vieillissement de cette population (110). Les patients PCU présentent de plus un risque accru de carence en vitamine B12 (111), en vitamine B6, en acide folique ou encore en fer de par leur régime alimentaire, ainsi qu'un risque accru d'ostéoporose (112).

Nous pouvons également noter qu'un élargissement de la diététique chez les patients PCU traités engendre des anomalies de la substance blanche à l'imagerie à résonance magnétique (IRM), régressant lors de la réintroduction d'un régime strict (113) (ces anomalies étant considérées par certains comme un indicateur de perte de myéline) (114). De plus, des problèmes comportementaux ont été rapportés lors de discontinuité du régime, à titre de dépression, anxiété, comportement déplacé, agoraphobie, diminution de l'estime de soi ou névrose (115–119). Ces données soulèvent le problème du traitement des patients adultes pour lequel aucun consensus international n'existe à l'heure actuelle (120). La différence à travers le monde des seuils au-delà desquels un patient doit être traité est illustrée par le Tableau II.

Age	Target blood phenylalanine ($\mu\text{mol/L}$)				
	UK	Germany	USA	France	Netherlands
0 months–6 years	120–360	40–240	120–360	120–300	120–360
7–9 years	120–480	40–240	120–360	120–300	120–480
10–12 years	120–480	40–900	120–360	<900	120–480
13–15 years	120–700	40–900	120–600	<900	120–480
16–18 years	120–700	40–1200	120–900	<900	120–600
18+ years	120–700	40–1200	120–900	<1500	120–600

Tableau II : Exemple des seuils tolérés de phénylalanine au-delà desquels un traitement doit être mis en place selon les pays. D'après (121).

Chez la femme enceinte, l'hyperphénylalaninémie maternelle possède de lourdes conséquences sur le fœtus : pouvoir tératogène, mais également retard mental, dysmorphie faciale, microcéphalie, retard de croissance intra-utérin, retard de développement et cardiopathie congénitale (122). L'effet de la concentration de Phe sur le fœtus étant documentée (123), un suivi strict du taux de Phe sanguin de la femme enceinte ou souhaitant concevoir un enfant est primordial, accompagné obligatoirement d'un régime diététique.

En ce qui concerne les déficits en BH₄ avec HPA, les symptômes prédominants sont une hypotonie musculaire, un retard mental et des troubles du mouvement (98). Dans les déficits en BH₄ sans HPA, la maladie de Segawa est caractérisée par une dystonie des membres inférieurs, qui se généralisera rapidement, tandis que le déficit en SR possède une clinique d'encéphalopathie sévère (96). Le Tableau III reprend les différents types de déficits en BH₄ ainsi que les biomarqueurs utilisés.

Disease	OMIM number	Blood	Urine			Cerebrospinal fluid					
		Phe	Neo	Bio	Pri	Neo	Bio	Sep	5HIAA	HVA	Folates
GTPCH deficiency (autosomal recessive)	233910	↑	↓	↓	n	↓	↓	n	↓	↓	n
PTPS deficiency	261640	↑	↑	↓	n	↑	↓	n	↓	↓	n
PCD deficiency	264070	↑	↑	n-↓	↑	n	n	n	n	n	n
DHPR deficiency	261630	↑	n	n-↑	n	n	↑*	n	↓	↓	↓
GTPCH deficiency (autosomal dominant; DRD)	128230	n	n	n	n	↓	↓	n	n-↓	↓	n
SR deficiency	612716	n	n	n	n	n	↑*	↑	↓	↓	n

*7,8-dihydrobiopterin

Tableau III : Déficiences en BH₄ et biomarqueurs. Abréviations : 5HIAA : acide 5-hydroxyindoleacétique ; Bio : biophtéine ; HVA : acide homovanillique ; Neo : néoptéine ; Phe : phénylalanine ; Pri : primaptéine ; sep : sepiaptéine. D'après (124).

4. Diagnostic

En France, comme dans la plupart des pays occidentaux, le diagnostic de la PCU a généralement lieu suite à un dépistage néonatal positif au 3^{ème} jour de vie, sur sang total recueilli sur papier Guthrie (il existe cependant des variations selon les pays concernant le jour du dépistage (de J1 à J10), la technique utilisée (principalement fluorimétrie et spectrométrie de masse) et le seuil de la concentration sanguine de Phe nécessitant une investigation (96)). En France, le dépistage sera considéré comme positif si la concentration sanguine de Phe est supérieure à 180 µM (3 mg/dL). Si

l'anomalie est confirmée (possibilité de faux positifs notamment en cas de prématurité ou de perfusion d'acides aminés), l'enfant sera pris en charge médicalement, avec test au BH₄ lors d'un taux de Phe de contrôle supérieur à 480 µM (93). L'analyse des bioptérines (dosage urinaire de la néoptérine, bioptérine et primapterine, associé à la détermination de l'activité de la DHPR sanguine) permettra le diagnostic différentiel des déficits du métabolisme du BH₄, tandis qu'une chromatographie des acides aminés plasmatiques (chromatographie liquide par échange d'ion ou spectrométrie de masse) permettra un suivi nutritionnel. L'analyse moléculaire est recommandée lors d'une confirmation de PCU car il existe une corrélation génotype-phénotype, avec des activités résiduelles différentes (97) permettant une prédiction de sensibilité au BH₄ (125). Chez les patients présentant une analyse des bioptérines anormale, l'analyse des amines biogènes, des ptérines et des folates dans le liquide céphalorachidien (LCR) permettra de distinguer les différentes étiologies de déficit en BH₄ (98). La Figure 7 reprend les différentes étapes du diagnostic différentiel d'une HPA.

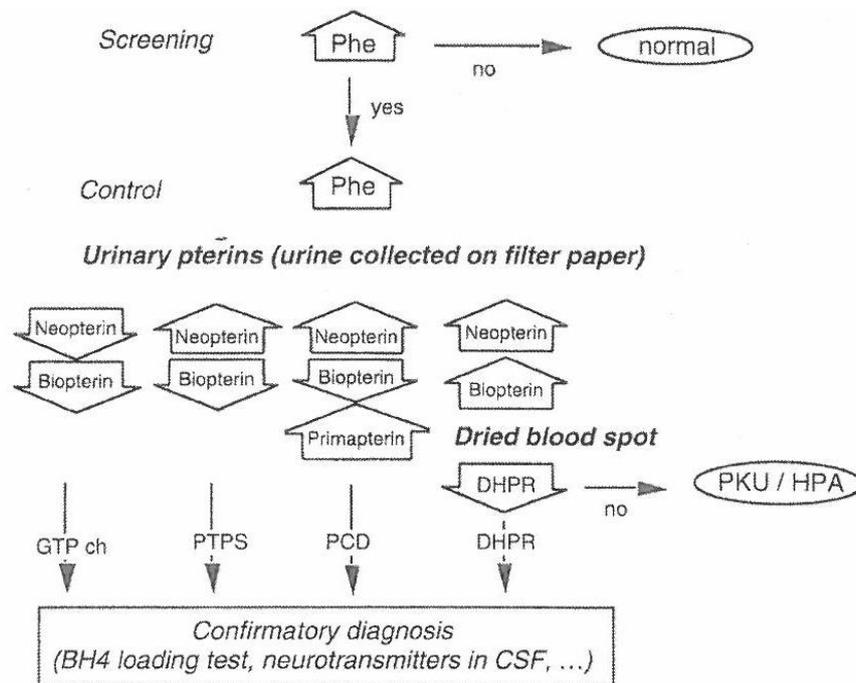


Figure 7 : Algorithme pour le diagnostic différentiel des hyperphénylalaninémies. Abréviations : DHPR : déficit en dihydroptéridine réductase ; GTPch : déficit en GTP-cyclohydrolase I ; PCD : déficit en ptérine-4a-carbinolamine ; Phe : phénylalanine ; PKU/HPA : phénylcétonurie/hyperphénylalaninémie ; PTPS : déficit en 6-pyruvoyl-tetrahydroptérine synthase. D'après (126).

5. Prise en charge

L'harmonisation de la prise en charge des patients PCU constitue un des enjeux de ces dernières années. En effet, les pratiques de prise en charge des patients PCU, notamment à travers l'Europe, sont diverses (127), et ce dû en particulier à l'absence de recommandations européennes (128,129). Il existe cependant quelques recommandations, notamment françaises (93,130) ou américaines (131,132).

Le traitement repose sur plusieurs possibilités, la plus largement utilisée à travers les différents pays étant la prise en charge diététique.

Chaque patient possède un besoin minimum en Phe au-dessous duquel il risque une dénutrition protéique, et une tolérance en Phe, qui correspond à la quantité maximale de Phe que le patient peut consommer tout en maintenant son taux de Phe sanguin dans les limites préconisées (93). La prise en charge diététique est donc à adapter à chaque patient et peut évoluer dans le temps. Le but consiste à diminuer les apports en Phe, en excluant de l'alimentation les produits riches en protéines (schématiquement viande, poissons, œufs, produits laitiers, légumineuses et oléagineux) (Figure 8), avec mise en place d'un système de parts (1 part correspondant à 20 mg de Phe). La restriction protéique est telle qu'il est nécessaire d'apporter une diététique semi-synthétique pour assurer les apports nutritionnels adéquats (96), associée à un mélange d'acides aminés, de vitamines et de sels minéraux. La tyrosine, qui fait partie des mixtures d'acides aminés, fera l'objet d'un suivi particulier car cet acide aminé devient essentiel dans les PCU sévères.



Figure 8 : Répartition des aliments naturels lors des régimes des patients PCU. De haut en bas : aliments autorisés en quantité limitée selon la tolérance en Phe (légumes et fruits), les aliments interdits (viande, poisson, œuf, charcuterie, fromage, laitage, pain, gâteaux, semoule, pâtes...) et les aliments autorisés à volonté (sucre, miel, confiture, jus de fruit, huile, beurre...). D'après (133).

Le régime strict chez l'adulte (134) ou l'adolescent (127) possédant une compliance médiocre, il est parfois proposé un élargissement du régime. Les recommandations diététiques sont variables à travers le monde, avec un taux maximal de Phe sanguine préconisé chez l'adulte oscillant de 240 à 1300 μM (135). Certains auteurs ont proposé un seuil de 500 μM de Phe dans le sang en se basant sur le stress oxydant, le métabolisme du monoxyde d'azote (NO), celui des oxystérols, sur les statuts en vitamines B, l'état osseux et l'IRM, seuil au-delà duquel ils ont décelé une toxicité cérébrale (136). Ce seuil devrait être repris dans les recommandations européennes en cours d'écriture (137). Le

manque de données sur le devenir à long terme de ces patients devrait être en partie comblé grâce à l'étude ECOPHEN, étude observationnelle française s'intéressant entre autre à la physiopathologie de la maladie chez les adultes (138).

D'un point de vue thérapeutique médicamenteuse, le traitement par BH₄ (dichlorhydrate de saproptérine, Kuvan®) a reçu l'autorisation de mise sur le marché (AMM) en France dans le cadre des HPA de l'adulte et de l'enfant de plus de 4 ans atteints de PCU et répondeurs au BH₄, ainsi que dans les déficits en BH₄ (139,140). Il vient récemment d'obtenir l'AMM européenne pour les enfants de tous âges. Ce médicament, disponible uniquement en administration orale, possède une posologie allant généralement de 5 à 20 mg/j/kg en une administration journalière (139). Il ne possède pas d'effet indésirable notable (141). Le Kuvan®, pour lequel 30 à 50% des patients sont répondeurs (142), permet une augmentation de la tolérance en Phe, augmentant ainsi la qualité de vie et l'adhésion du patient au régime diététique (132). Afin de vérifier la sécurité et l'efficacité de ce relativement nouveau médicament, un registre observationnel multicentrique (KAMPER) a été mis en place, répertoriant pour l'instant 325 patients (143).

Parmi les thérapies alternatives se trouvent la supplémentation en acides aminés neutres (LNAA : Tyr, Trp, méthionine, isoleucine, thréonine, valine, leucine, histidine, lysine et arginine) (144), les glycomacropéptides (GMP) (120) et la transplantation hépatique. Les LNAA ne sont pas recommandés à l'heure actuelle en France, mais sont proposés aux Etats-Unis pour les patients qui ne sont pas stables sur le plan métabolique ou qui n'adhèrent pas aux autres thérapeutiques (145). Cette supplémentation permet de diminuer l'absorption de Phe au niveau intestinal et méningé (146) en saturant un transporteur commun (147), mais nécessite cependant des investigations, en particulier sur l'efficacité à long terme (148). L'utilisation de GMP (apports protéiques pauvres en Phe, Tyr, histidine, leucine, Trp et arginine) semble efficace en complément des substituts d'acides aminés, mais ne peut les remplacer (149).

L'enzymothérapie par phenylalanine-ammonia lyase (PAL, catalysant la Phe en acide transcinnamique, sans nécessité de cofacteur) (150), la thérapie génique (151) et l'utilisation de probiotiques (152) sont encore à l'état de recherche (120).

Dans le cas d'un déficit en BH₄ avec HPA, une thérapie substitutive par BH₄ (sauf pour le déficit en DHPR) ou un régime pauvre en Phe (déficit en DHPR) est souvent mis en place, associé à des précurseurs des neurotransmetteurs (L-dopa et 5HTP), avec ajout d'acide folinique dans le cas du déficit en DHPR (98). Parfois, l'utilisation d'inhibiteurs enzymatiques ou d'agonistes est également bénéfique (97).

Le planning de suivi des patients PCU est variable selon l'état et l'âge du patient. Les rendez-vous cliniques sont mensuels la première année, puis trimestriels jusqu'à l'âge adulte et enfin annuels, et permettent la surveillance de la croissance staturo-pondérale, du périmètre crânien et l'évaluation du développement psychomoteur, ainsi qu'une évaluation nutritionnelle. Le suivi biologique consiste en des dosages de Phe sanguine de façon plus rapprochée (mais dont le prélèvement peut être réalisé à domicile) et un bilan nutritionnel annuel complet (93). Le Tableau IV reprend les différentes modalités de ce suivi.

Suivi	Modalités
Clinique	Surveillance croissance staturo-pondérale et du périmètre crânien Evaluation du développement psychomoteur et développement neurocognitif
Biologique	Concentration de phénylalanine sur papier Guthrie
Nutritionnel	Hémogramme Ionogramme étendu Bilans lipidique, martial, phosphocalcique Chromatographie des acides aminés plasmatiques Statuts vitaminiques (B12, folates, vitamines A et E) et en oligoéléments (cuivre, zinc, sélénium) Calciurie
Ostéodensitométrie	Recommandé régulièrement mais non remboursé
De la qualité de vie	Index de qualité de vie

Tableau IV : Modalités de suivi lors des visites des patients PCU.

Chapitre 3 : Tryptophane et PCU : état de l'art

Plusieurs points rapprochent le métabolisme du Trp à celui de la Phe.

Tout d'abord, le Trp nécessite le transporteur des L-acides aminés de type 1 (LAT1) pour franchir la BHE (153). Or ce transporteur est quasiment saturé à l'état physiologique (154) et possède une affinité bien plus élevée pour la Phe que pour le Trp. Une augmentation des concentrations sanguines de Phe entraîne ainsi une diminution du passage des autres acides aminés au niveau de la BHE (155). Chez les patients PCU, une diminution de la concentration cérébrale de Trp a d'ailleurs été retrouvée lors d'autopsie (156). De plus, une diminution de 5HTP (157) et des métabolites du 5HT dans le LCR ont été rapportées, cette dernière étant réversible sous traitement diététique pauvre en Phe (158). Il est donc envisageable que les problèmes d'humeur présents en cas d'augmentation de la Phe sanguine soient provoqués par une diminution de synthèse de 5HT au niveau méningé (117). Ceci est corroboré par le fait que chez des adultes, une supplémentation en Trp et Tyr entraîne une amélioration de la concentration, de l'humeur, et de réponse aux stimuli extérieurs (159).

En ce qui concerne l'origine de ce déficit en 5HT dans le LCR des patients PCU, plusieurs hypothèses existent (160). Celle que nous venons de citer engendre une diminution de la concentration cérébrale en Trp par saturation de LAT1 par la Phe (155), et est corroborée par le fait que l'administration de LNAA chez la souris PCU entraîne une augmentation de 5HT au niveau cérébral (146). Une autre hypothèse consiste en une inhibition de la TpH lors d'une forte concentration de Phe, ce qui a été montré *in vitro* (161) mais également chez la souris (157,162). A noter que dans le modèle murin, l'activité de la TpH a été restaurée par une restriction en Phe. Une autre publication évoque une inhibition de la 5HTP décarboxylase par les métabolites de la Phe (105).

Ces hypothèses, dont les effets peuvent s'ajouter, sont basées sur des propriétés connues du 5HT. Elles permettraient d'expliquer le fait que certains adultes atteints de PCU présentent des dysfonctions neuropsychologiques inexplicables par leur taux de Phe sanguin (163).

L'autre point rapprochant le métabolisme du Trp à celui de la Phe est le BH_4 , cofacteur indispensable de la PAH, et également indispensable à une autre enzyme de la voie du Trp : la TpH, qui synthétise le 5HTP à partir du Trp (Figure 4) et qui est l'enzyme limitante de la synthèse de 5HT. Chez la souris PCU, l'administration de BH_4 entraîne une augmentation de 5HIAA cérébral, métabolite issu du 5HT (164), montrant une activation du métabolisme du 5HT par le BH_4 . La voie du Trp pourrait également agir sur la synthèse de BH_4 . En effet, une étude récente prête à la molécule AX la capacité d'inhiber la sépiaptérine réductase (SR), une des enzymes nécessaires à la synthèse du BH_4 (165).

En ce qui concerne l'implication de la voie des kynurénines dans la PCU, très peu de données sont connues. Quelques travaux ont été effectués dans les années 1960 par un groupe allemand, mais dont la traduction n'a pas été réalisée (166,167), ainsi que par une équipe française (168). Le seul élément à notre disposition est le fait que sous régime pauvre en Phe, les patients PCU excrètent une quantité anormalement élevée d'AK dans les urines (169), tandis que le profil urinaire des métabolites du Trp semble modifié chez certains patients PCU non traités (167). Plus tard, une autre équipe a montré une diminution de la concentration sanguine de Trp chez 3 patients atteints de PCU cliniquement atypiques (170).

Nous avons vu ci-dessus que dans la PCU, la concentration cérébrale en 5HT semble diminuée. Or la principale régulation de la synthèse de 5HTP (et donc de 5HT) réside dans la disponibilité de son substrat, le Trp (171). Comme nous l'avons vu précédemment, celui-ci est métabolisé majoritairement en KYN et l'IDO, enzyme limitante de la voie, peut être positivement régulée par certains facteurs, notamment l'inflammation (3). L'activité de l'IDO modifie la biodisponibilité du Trp et donc potentiellement l'activité de la TpH. Ces relations entre la voie de la KYN et celle du 5HT sont la raison de l'approche métabolomique de cette étude. Une étude récente montre d'ailleurs ces relations étroites entre Phe, 5HT et kynurénines, une surproduction de la voie des kynurénines et de la Phe étant observée chez la souris déficiente en TpH2 (172).

Enfin, certains mécanismes physiopathologiques entraînant l'atteinte cérébrale de cette pathologie restent à ce jour insuffisamment compris. Une des voies à explorer davantage est l'accumulation cérébrale de métabolites neurotoxiques. Or, plusieurs kynurénines possèdent des propriétés neuroactives, que ce soit par l'action neurotoxique du 3HK et du 3HA, ou par l'action neuroprotectrice de AK (173).

Ces différentes données nous ont donc conduits à nous interroger sur les modifications du métabolisme du Trp (voie des kynurénines et voie du 5HT) dans la PCU.

Chapitre 4 : Spectrométrie de masse : principe

La spectrométrie de masse est une méthode d'analyse permettant la détermination de la structure et des masses moléculaires des composés analysés ainsi que leur quantification. Le principe réside en la formation d'ions dans une source d'ionisation, ces ions provenant de la molécule à analyser. Ils sont ensuite séparés et détectés. Actuellement, la spectrométrie de masse est facilement couplée à des méthodes séparatives telles que la chromatographie en phase gazeuse ou liquide.

Le spectromètre de masse comprend différents modules placés en série, qui permettent successivement l'évaporation du solvant et l'ionisation des molécules de l'échantillon (source), l'accélération des ions formés ainsi que leur séparation en fonction des rapports masse sur charge (m/z) (analyseur) et enfin leur détection (174).

Concernant la source, plusieurs méthodes d'ionisation sont disponibles, le choix dépendant des propriétés physico-chimiques des molécules à étudier et des renseignements désirés. L'ionisation par impact électronique et l'ionisation chimique à pression réduite sont réservées aux composés facilement volatilisables et de faible masse moléculaire, et sont souvent couplées à la chromatographie en phase gazeuse. La désorption et l'ionisation par impulsion laser assistées par une matrice (source MALDI) sont utilisées pour les molécules à masse moléculaire élevée (> 500 Da) et sont fréquemment couplées à un spectromètre de masse à temps de vol (TOF). Les méthodes d'ionisation à pression atmosphérique, à savoir l'électro-nébulisation ou électrospray (ESI) et l'ionisation chimique à pression atmosphérique (APCI), sont idéalement utilisées en couplage avec la chromatographie en phase liquide pour les molécules ionisables et polaires, en particulier de faible masse moléculaire.

L'ionisation par électro-nébulisation, représentée en Figure 9, consiste en la pulvérisation d'une solution à faible débit et en l'ionisation des espèces qu'elle contient grâce à l'utilisation d'un champ

électrique en sortie du capillaire (nébuliseur). L'échantillon est pulvérisé sous forme de gouttelettes qui vont se charger et diminuer de taille car le solvant est progressivement évaporé à l'aide d'un gaz neutre à contre-courant (azote chauffé). Les ions formés entrent ensuite dans le spectromètre de masse. Le choix du solvant, le débit de phase mobile et la différence de potentiel sont donc primordiaux, car ils influent sur la qualité du nébulisât.

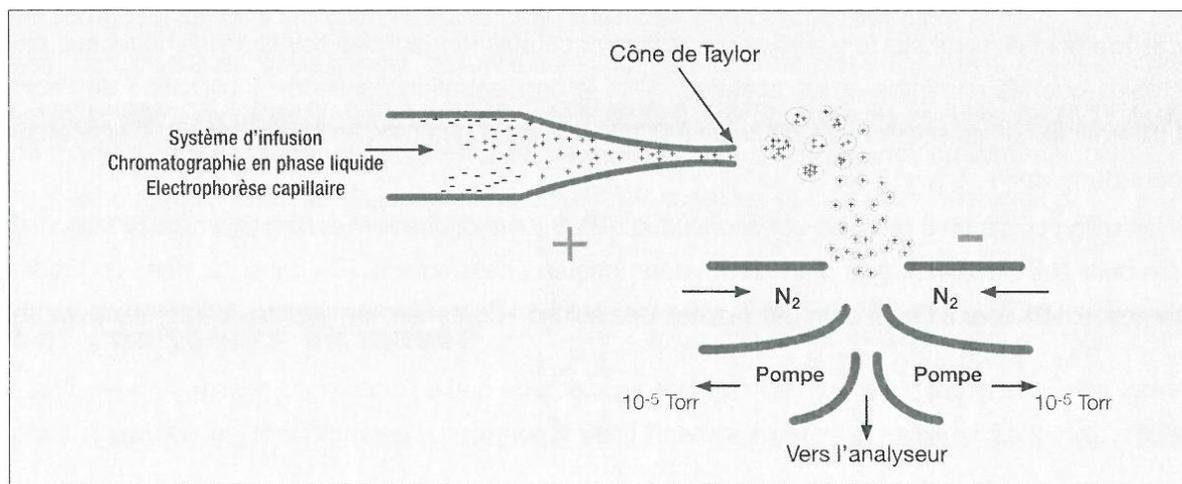


Figure 9 : Source d'ionisation à pression atmosphérique par électro-nébulisation en mode positif. D'après (174).

L'analyseur de masse permet la séparation des ions formés dans la source en fonction de leur rapport m/z . Plusieurs types sont disponibles, mais nous nous focaliserons ici uniquement sur le filtre quadripolaire, dont le fonctionnement repose sur le mouvement d'ions dans un champ électrique oscillant. Cet analyseur est constitué successivement d'un préfiltre, série de lentilles électroniques permettant la convergence et l'accélération des ions sortant de la source, puis d'un quadripôle (le plus souvent 4 barres entre lesquelles sont établies des différences de potentiel), le tout débouchant sur un détecteur. Les changements de potentiels appliqués à ces barres permettent l'oscillation des ions de différentes masses jusqu'au détecteur.

Plusieurs quadripôles peuvent être couplés entre eux en série, constituant ainsi un spectromètre de masse en « tandem » (MS/MS) (Figure 10). Le premier quadripôle (Q1) permet de sélectionner un ion, le deuxième (Q2) de le fragmenter, et le troisième (Q3) d'analyser les ions fils issus de la

fragmentation. Q1 et Q3 sont des quadripôles permettant la séparation des ions. Q2, appelé cellule de collision, n'a pour rôle que de focaliser les ions au centre des barres, lieu de formation des ions fragments par collision, grâce à l'introduction d'un gaz de collision. Plusieurs configurations peuvent être mises en œuvre en fonction du réglage de Q1 et Q3, suivant que l'on utilise le mode statique (potentiel fixe, ne permettant de détecter qu'un ion à un rapport m/z donné), ou le mode balayage (détection de tous les ions dans une gamme de rapport m/z prédéfinie). La procédure « Multiple Reaction Monitoring » (MRM) ou « Selected Reaction Monitoring » (SRM) utilise Q1 et Q3 en mode statique. Q1 sélectionne exclusivement l'ion parent, tandis que Q3 se focalise sur l'ion fils choisi. Cette double sélection, permettant de diminuer le bruit de fond, est particulièrement utilisée lorsqu'une quantification est souhaitée.

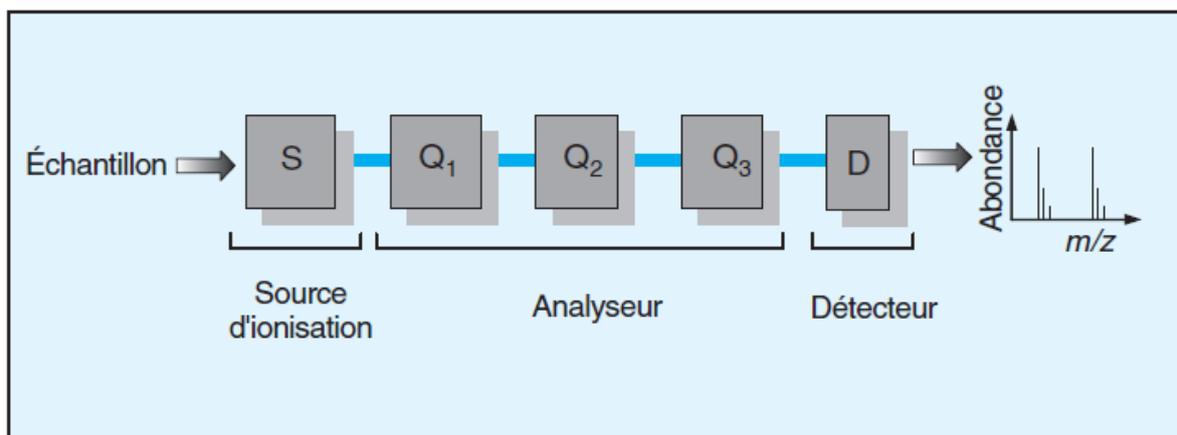


Figure 10 : Schéma d'un spectromètre de masse en tandem. D'après (175).

Les 9 molécules que nous souhaitons quantifier dans cette étude sont toutes polaires et ionisables, rendant l'utilisation de l'ionisation à pression atmosphérique possible. Nos molécules sont également hydrosolubles, la chromatographie liquide est donc la méthode séparative de choix. Le mode MRM utilisé permet la quantification de chacune. L'utilisation de l'HPLC-MS/MS avec ionisation par électro-nébulisation est donc la technique utilisée dans notre étude.

Partie 2 : Matériel et Méthodes

Chapitre 1 : But de l'étude

L'objectif principal de cette étude est la mise au point du dosage des 9 métabolites présentés en Figure 11 en HPLC-MS/MS, ainsi que la validation de cette méthode selon la norme NF EN ISO 15189. Le deuxième objectif consiste en l'exploration de cette voie métabolique dans une population phénylcétonurique, afin de démontrer une éventuelle modification de ce métabolisme dans cette pathologie.

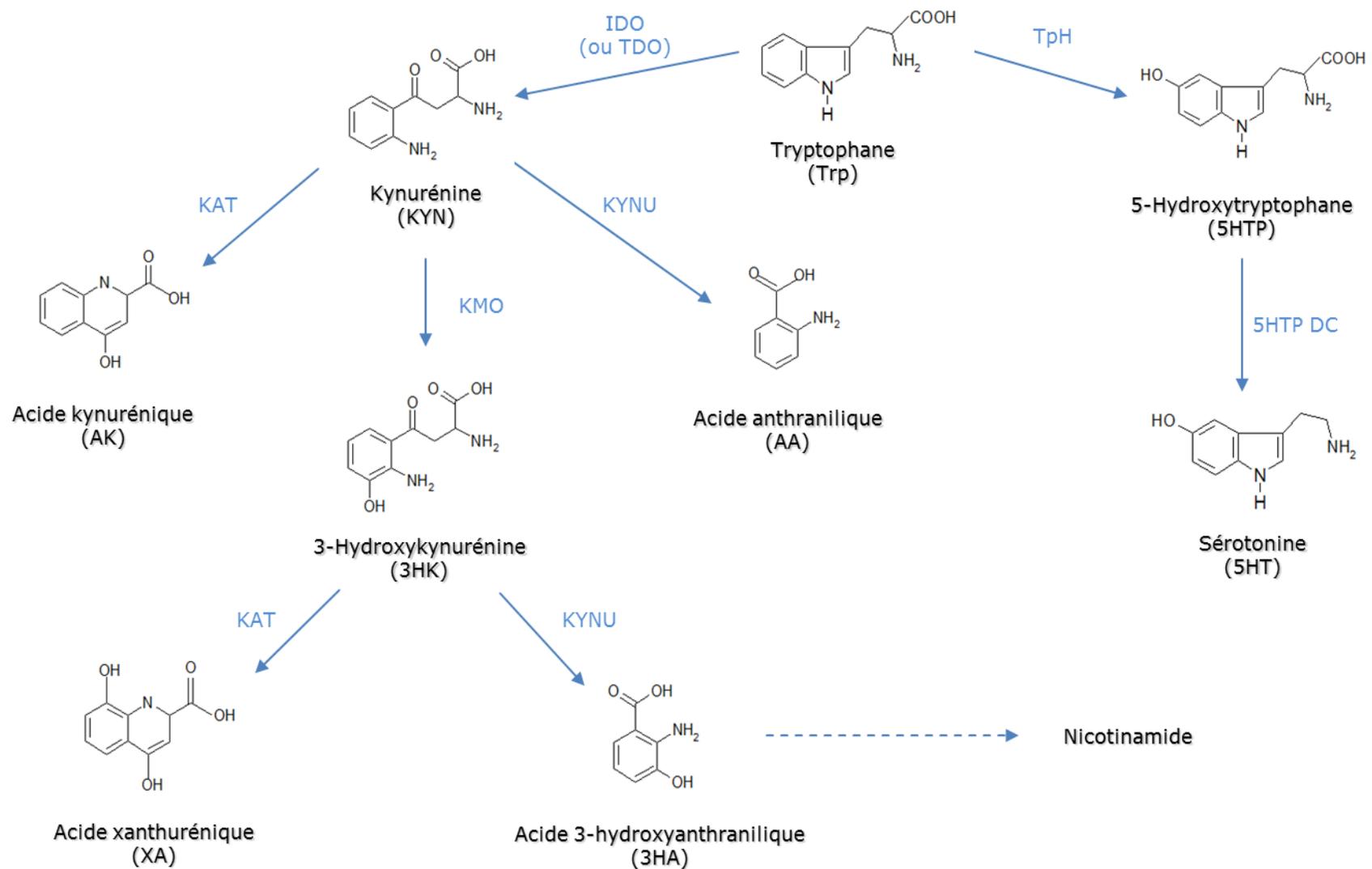


Figure 11: Le métabolisme du tryptophane via les voies des kynurénines et de la sérotonine. Abréviations des enzymes : IDO : indoleamine 2,3-dioxygénase ; KAT : kynurénine aminotransférase ; KMO : kynurénine monooxygénase ; KYNU : kynuréninase ; TDO : tryptophane 2,3-dioxygénase ; TpH : tryptophane hydroxylase ; 5HTP DC : 5-hydroxytryptophane décarboxylase.

Chapitre 2 : Matériel

1. Standards

Les standards de Trp, KYN, AA, AK, 3HK, 3HA, XA, 5HT et 5HTP proviennent de Sigma-Aldrich Chimie (Lyon, France). Les références et puretés de chaque poudre sont disponibles en annexe 1. Pour chaque standard, une solution aqueuse a été réalisée à 10 mM, 1,7 mM, 225 µM, 50 µM, 100 µM, 65 µM, 48 µM, 5,6 mM et 100 µM respectivement, et conservées à -75°C +/- 15°C jusqu'à utilisation. Ces différentes solutions ont été diluées extemporanément pour réaliser les solutions de travail.

Le D5-Tryptophane 2', 4', 5', 6', 7' (D5-Trp) a été obtenu auprès de CDN Isotopes (Québec, Canada), tandis que la [¹³C₆]-L-Kynurénine (¹³C-KYN), l'acide [U-Ring-¹³C₆]-anthranilique hydrochloride (¹³C-AA), l'acide [²H₅]-kynurénique (D5-AK), la [U-Ring-¹³C₆]-3-hydroxykynurénine (¹³C-3HK), l'acide [¹³C₆]-3-Hydroxyanthranilique hydrochloride (¹³C-3HA), l'acide [¹³C₆]-xanthurénique (¹³C-XA) et la [²H₄]-5-hydroxytryptamine (D4-5HT) ont été commandés chez Alsachim (Illkirch, France). Chaque poudre a été reconstituée avec la phase organique recommandée par le fournisseur, puis a été conservée à -75°C +/- 15°C. Un mélange de standards internes (SI) a été réalisé dans de l'eau milliQ, contenant 1,8 mM de D5-Trp, 40 µM de ¹³C-KYN et entre 0,6 et 1 µM des autres SI. Ce mélange a ensuite été aliquoté et conservé à -75°C +/- 15°C jusqu'à utilisation.

2. Autres consommables et petit matériel

L'acide formique (AF), le méthanol (MeOH), l'acétonitrile (ACN) et l'acide trifluoroacétique (TFA) étaient de qualité analytique, selon l'appel d'offre en cours. L'acide ascorbique (ASC) et le sulfate de zinc ont été fournis par Sigma-Aldrich. Nous avons également eu recours à de l'eau milliQ, des tubes type eppendorf, des tubes à hémolyse en plastique, des pipettes et cônes de différents volumes, des filtres 0,22 µm (Merck Milipore), des flacons avec insert et des plaques 96 puits selon

les appels d'offre en cours, ainsi qu'un évaporateur à sec sous azote (Biotage, Suède) et un vortex de paillasse.

3. Equipement HPLC-MS/MS et conditions chromatographiques

Nous avons travaillé sur un système de chromatographie liquide à haute performance Dionex Ultimate 3000 (ThermoFischer, Waltham, USA) couplé à un spectromètre de masse en tandem API 4000 (SCIEX, Canada). Les données ont été acquises grâce à l'utilisation du logiciel Analyst (v.1.5.2).

La colonne HPLC utilisée était une Kinetex C18 100A (2,1 x 100 mm, diamètre interne de 5 µm) (Phenomenex, Torrance, USA). Deux phases mobiles ont été utilisées en gradient : AF 0,1% dans de l'eau (phase A) et AF 0,1% dans de l'ACN (phase B).

4. Echantillons plasmatiques

Les échantillons utilisés sont des plasmas prélevés sur EDTA. Le sang total prélevé sur tube EDTA doit être mis dans la glace immédiatement après le prélèvement, et transporté ainsi à l'abri de la lumière jusqu'au laboratoire. Une centrifugation est ensuite réalisée le plus rapidement possible (2500 g à environ +4°C pendant 15 min), permettant l'obtention d'un plasma pauvre en plaquettes. Celui-ci est ensuite aliquoté et congelé à -75°C +/- 15°C jusqu'à analyse.

Les patients PCU de cette étude ont été recrutés dans le cadre de leur visite annuelle au CHU, préconisée par le protocole national de diagnostic et de soins (PNDS). Cette étude a fait l'objet d'une déclaration de conservation et préparation à des fins scientifiques d'éléments du corps humain (accusé de réception en annexe 2). Les 30 sujets-sains, permettant l'établissement des valeurs de référence, ont été recrutés lors d'un prélèvement au centre de consultation et d'anesthésie du CHU. Dans les 2 cas, les sujets devaient être à jeun (> 12h pour les adultes) et le pré-analytique

correspondre aux exigences (tube EDTA mis dans la glace et à l'abri de la lumière dès le prélèvement et acheminement rapide au laboratoire pour prise en charge selon le protocole ci-dessus).

Chapitre 3 : Méthodes

1. Préparation de la gamme et des échantillons

La préparation pré-analytique de chaque plasma a constitué en une déprotéinisation. A 190 μL de plasma sont ajoutés 10 μL du mélange de SI et 700 μL d'une solution de méthanol / sulfate de zinc à 79 g/L dans de l'eau (80/20 v/v) + 0,05 % TFA. Les échantillons sont ensuite mélangés, puis mis à $+5^{\circ}\text{C}$ +/- 3°C pendant 15 min. Après centrifugation (15 min à 10 000g à environ $+4^{\circ}\text{C}$), 700 μL de surnageant sont repris et mis à évaporer sous azote. Le résidu sec est dissout dans 30 μL d'eau + 0,08% d'ASC. Cinq μL sont ensuite injectés en HPLC-MS/MS. Les différentes étapes sont représentées sur la Figure 12.

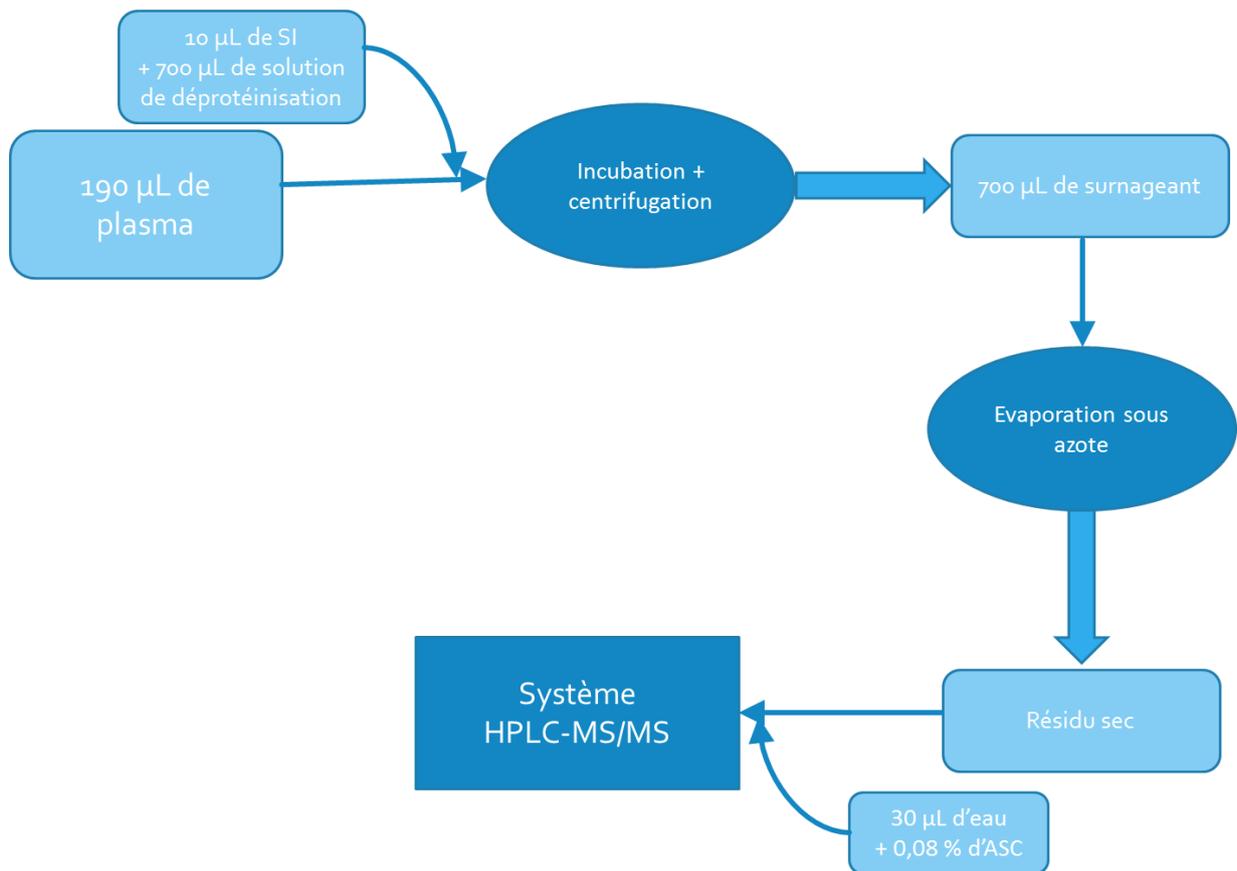


Figure 12 : Préparation pré-analytique des échantillons. Abréviations : SI : standard interne ; ASC : acide ascorbique.

La gamme est effectuée à partir d'une matrice plasmatique. Un pool de plasma humain a été traité avec du charbon activé (DARCO®) (Sigma-Aldrich), selon un protocole adapté de la

littérature (176), afin d'éliminer le Trp et ses métabolites endogènes. Cinq mL de plasma sont mis au contact de 280 mg de charbon sous agitation pendant 2h. Après centrifugation, le surnageant est alors filtré puis aliquoté et stocké à $-23^{\circ}\text{C} \pm 5^{\circ}\text{C}$ jusqu'à utilisation.

Les droites de calibrations sont réalisées en utilisant 180 μL de « plasma free » surchargé avec 10 μL d'un mélange contenant toutes les molécules d'intérêt à différentes concentrations et en ajoutant 10 μL du mélange de SI. La gamme de calibration s'étend de 0 à 160 μM pour le Trp, 0 à 4,2 μM pour la KYN et de 0 à maximum 70 nM pour les autres molécules d'intérêt. Les concentrations de SI ont été choisies pour correspondre approximativement aux concentrations physiologiques (c'est-à-dire environ 90 μM pour le D5-Trp, 2 μM pour la ^{13}C -KYN et entre 28 et 50 nM pour les autres). Les courbes de calibration sont réalisées en se basant sur le ratio de l'aire du pic de l'analyte rapportée à l'aire du pic du SI correspondant (analyte/SI) et en les comparant aux concentrations connues d'analyte. Le 5HTP n'ayant pas de SI propre (production à façon uniquement), nous avons utilisé la ^{13}C -KYN comme SI, ce choix étant justifié par une proximité chromatographique, et approuvé au vu des résultats obtenus.

2. Contrôles internes de qualité

Afin de garantir le bon déroulement pré-analytique et analytique de notre dosage, et également afin de vérifier la fidélité intermédiaire de celui-ci, nous avons mis en place des contrôles internes de qualité (CIQ). Ceux-ci ont été réalisés à partir d'un pool de « plasma free » auquel nous avons ajouté un mélange contenant toutes les molécules d'intérêt. Après avoir homogénéisé le tout, des aliquots de 300 μL ont été réalisés puis stockés à $-75^{\circ}\text{C} \pm 15^{\circ}\text{C}$. Deux niveaux ont été réalisés afin d'encadrer les valeurs de références décrites dans la littérature. Ces deux niveaux de CIQ sont ajoutés à chaque série, le pré-analytique étant réalisé en même temps que celui des échantillons et de la gamme.

3. Paramètres HPLC et MS/MS

Le gradient de phases mobiles, les débits et la température de la colonne ont été optimisés afin d'obtenir la meilleure séparation des pics possible tout en conservant des pics fins. Pour conserver une bonne sensibilité malgré le grand nombre de transitions utilisées, nous avons fractionné le chromatogramme en 3 périodes. La première période contient ainsi le 3HK, le 5HT, la KYN, le 5HTP et le 3HA, ainsi que les SI correspondants. La deuxième période est exclusivement dédiée au Trp et à son SI, tandis que la 3^{ème} période recherche les transitions de XA, AA, AK ainsi que celles de leurs SI. Un exemple de chromatogramme obtenu est présenté en Figure 13.

Figure 13A

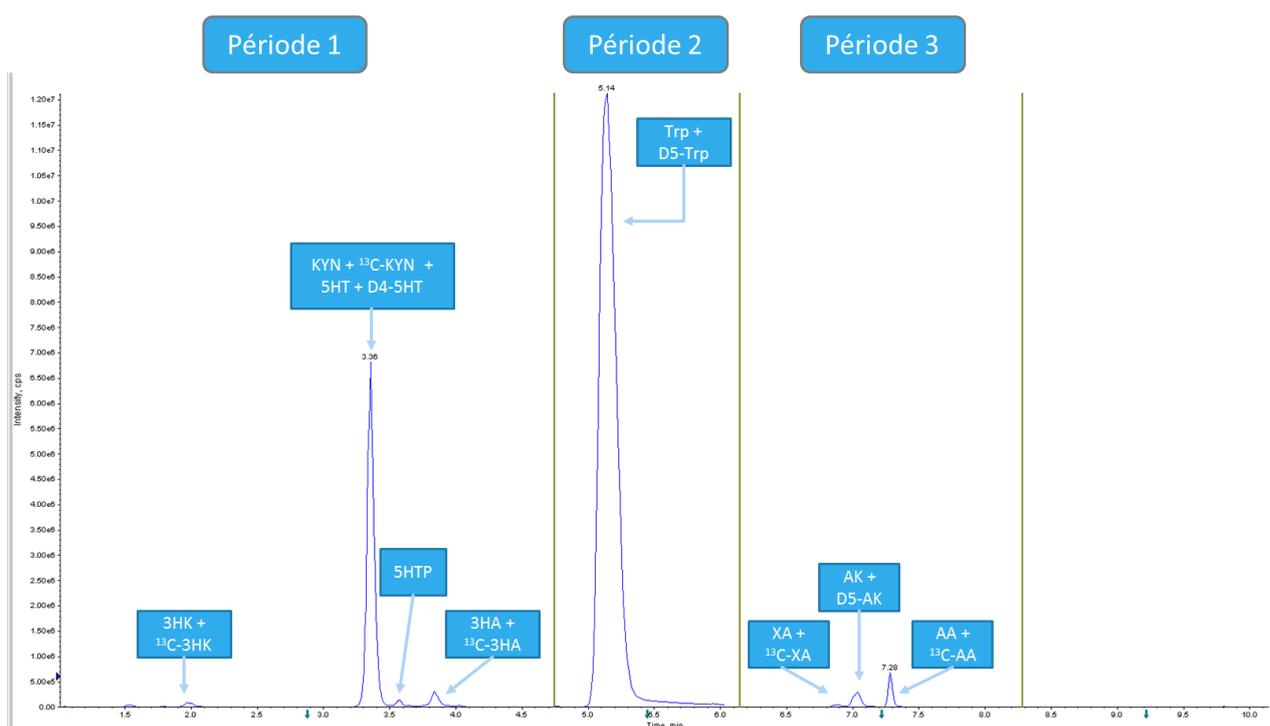


Figure 13B

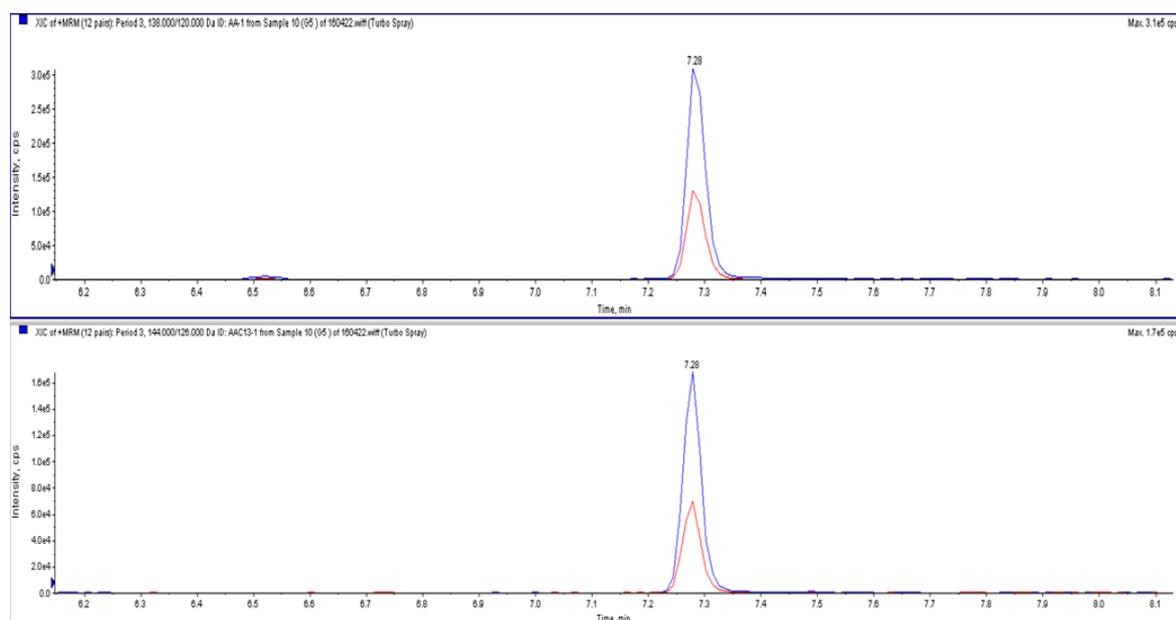


Figure 13 : Exemple de chromatogramme obtenu, représentant la somme de toutes les transitions recherchées pour chaque période (A), et exemple de pics obtenu pour AA (haut) et son SI (bas) lors de l'extraction de leurs transitions (B).

Le Trp étant présent à des concentrations sanguines bien supérieures à celles des autres molécules, il n'a pas été possible de le quantifier de la même façon que celles-ci. Afin de pallier ce problème, nous avons mis en place une division de l'échantillon en sortie d'HPLC par un split. Cela permet de diminuer considérablement la quantité de Trp arrivant à l'entrée du spectromètre de masse (4% de l'échantillon initial), et donc d'éviter la saturation du détecteur. Cependant, l'utilisation du split engendre une grande perte de pression, ayant pour effet de ralentir l'arrivée du Trp au spectromètre de masse, et donc d'élargir considérablement le pic ainsi obtenu. Pour éviter ce phénomène, nous avons augmenté le débit de phase et décidé de dévier le flux de phase mobile afin qu'il ne passe pas dans la colonne analytique à ce moment-là (i.e. le débit de phase mobile est dévié en amont de la colonne). Cela permet d'une part de préserver l'intégrité de celle-ci au cours du temps, et d'autre part de diminuer les contre-pressions appliquées au système. Le montage ainsi réalisé est représenté par la Figure 14.

Figure 14A

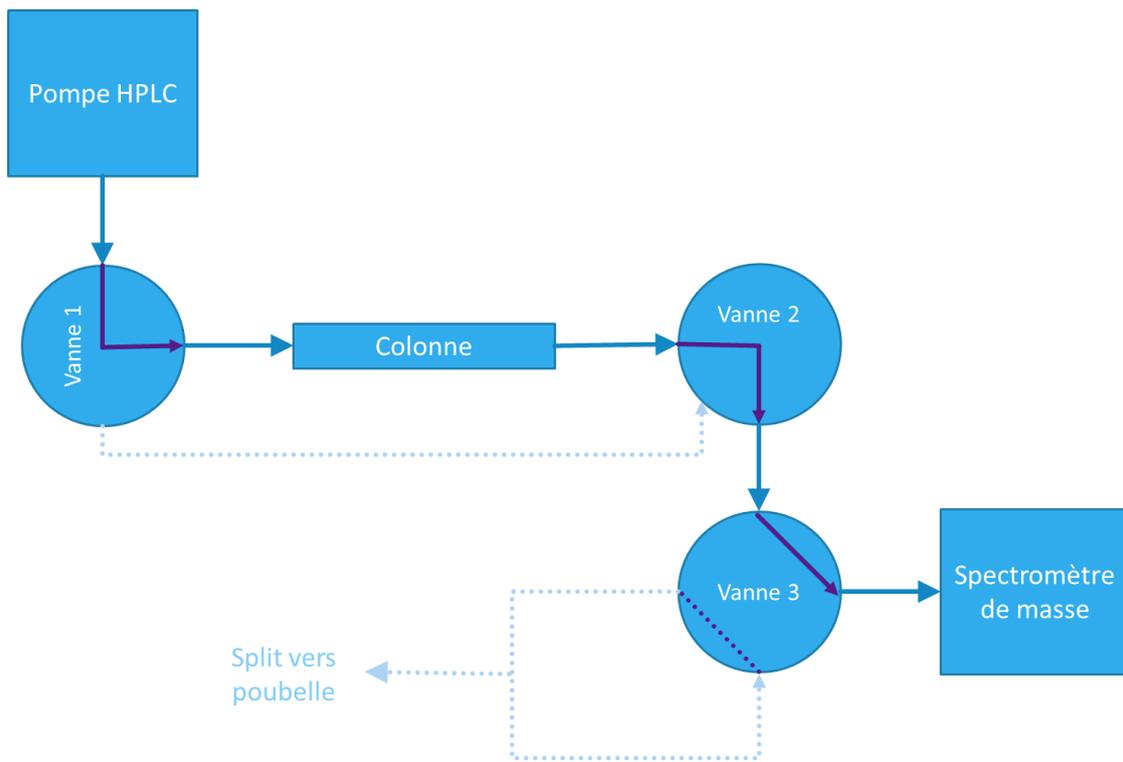


Figure 14B

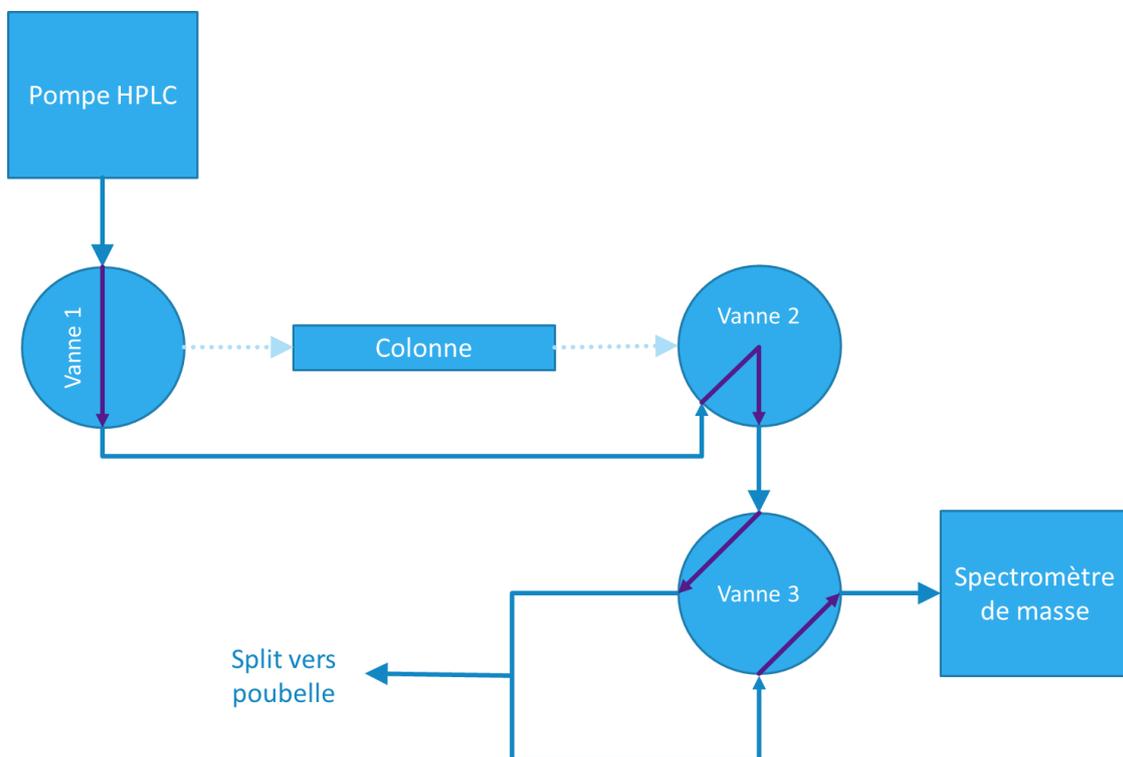


Figure 14 : Schémas représentant le montage effectué lors du run : flux de la phase mobile et de l'échantillon lors des périodes 1 et 3 (A), et lors de la période 2 pour le Trp (B).

La séquence ainsi mise au point comprend un gradient de phase allant de 0% à 100 % de phase ACN + 0,01% AF, et des débits de 0,35 à 2,5 mL/min. La température du four contenant la colonne a été fixée à 25°C, celle du passeur d'échantillon à 6°C. Le descriptif de la séquence ainsi mise au point est représenté par la Figure 15.

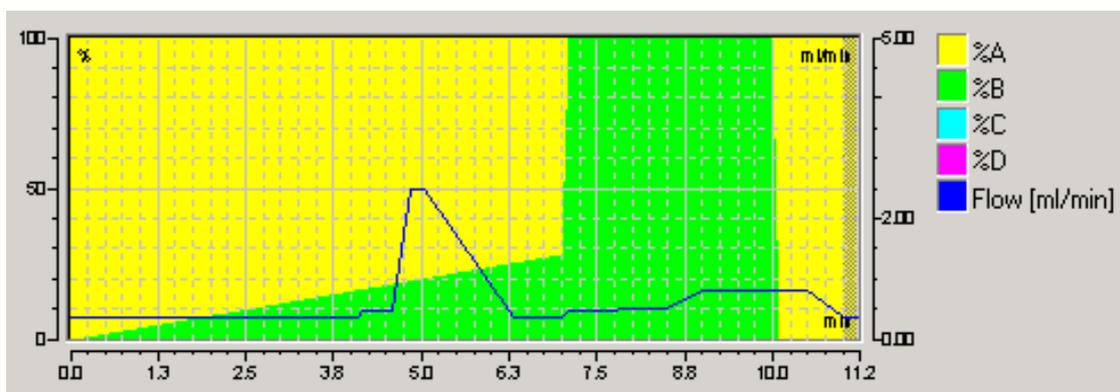


Figure 15 : Descriptif des pourcentages des phases mobiles et du débit lors de la séquence. Phase A : eau + 0,01% d'acide formique, phase B : acétonitrile + 0,01% d'acide formique. En ordonnées se trouve le pourcentage de chaque phase (axe de gauche) et le débit (axe de droite), en abscisses le temps de la séquence (en minutes).

Chaque molécule a été optimisée individuellement par spectrométrie de masse en tandem. Pour cela, une solution à 2 µg/mL dans de l'eau à 0,1% d'AF a été réalisée pour chacune, et infusée directement dans le spectromètre de masse en utilisant le mode d'ionisation par électrospray en mode positif avec une tension d'ionisation fixée à 4500 V. Deux transitions ont été sélectionnées pour chaque molécule. Ces transitions correspondent aux deux ions fils les plus intenses obtenus à partir de l'ion parent $[M+H]^+$, sauf pour le Trp pour lequel nous avons éliminé l'ion fils le plus intense au profit des 2^{ème} et 3^{ème} ions fils (afin de diminuer la saturation du détecteur), et la KYN pour laquelle nous avons choisi le 3^{ème} couple le plus intense comme couple quantifiant (afin d'améliorer notre linéarité autour des valeurs physiologiques). Les paramètres optimisés pour chaque molécule sont : le potentiel de déclusterisation (DP), le potentiel d'entrée (EP), l'énergie de collision (CE), le potentiel de sortie (CXP) et le dwell time (Dt = temps d'acquisition des ions). Ces paramètres sont rapportés dans le Tableau V. Les paramètres de la source ont été ajustés grâce à l'injection d'un mélange contenant toutes les molécules à 0,2 mg/mL dans de l'eau + 0,1% d'AF. Les différents

paramètres sources communs à toutes les molécules ont été choisis comme suit : gaz rideau à 25 psi, gaz nébulisateur à 45 psi, gaz de séchage à 50 psi et température de la source à 450 °C.

	Q1 (Da)	Q3 (Da)	DP (V)	EP (V)	Dt (msec)	CE (V)	CXP (V)
3HK	225	208	18	6	30	13	13
		162				23	9
KYN	209	94	21	7	25	20	15
		192				14	12
5HTP	221	204	19	5	20	15	13
		162				26	13
5HT	177	160	17	6	20	15	9
		132				30	10
3HA	154	136	19	6	30	17	8
		80				37	3
Trp	205	118	19	6	200	37	6
		146				25	8
AA	138	120	20	6	40	16	6
		92				30	7
AK	190	144	16	7	40	27	8
		116				44	6
XA	206,1	178,1	49,9	10	100	26	15
		132,1				41	8

Tableau V : Paramètres MS/MS de chaque molécule d'intérêt. Pour chaque molécule, la 1^{ère} ligne correspond à la transition quantifiante, la 2^{ème} à la qualifiante. Abréviations : Q1 : masse de l'ion parent ; Q3 : masse de l'ion fils ; DP : potentiel de déclusterisation, EP : potentiel d'entrée de la cellule de collision ; Dt : dwell time ; CE : énergie de collision ; CXP : potentiel de sortie de la cellule de collision.

4. Paramètres de validation de méthode

Cette méthode de dosage du Trp et de 8 de ses métabolites a été validée selon les recommandations du Cofrac (177) et de la norme NF EN ISO 15189 (178) pour les méthodes quantitatives, ainsi que selon une publication de Peters concernant la spectrométrie de masse (179).

1. Reproductibilité de la gamme

La reproductibilité de la gamme consiste à analyser les gammes obtenues dans des conditions différentes en faisant varier au moins un des facteurs de variabilité, ces facteurs pouvant être l'opérateur, le temps, les lots réactifs etc... Dans notre cas, nous avons analysé 3 gammes en faisant varier le facteur temps (période de 1 mois) et l'opérateur (2 opérateurs différents). Les résultats ont été exploités selon la moyenne et le coefficient de variation (CV), selon la formule suivante :

$$CV (\%) = \frac{\text{écart - type } (s)}{\text{moyenne } (m)} \times 100$$

2. Répétabilité

L'essai de répétabilité consiste à analyser le même échantillon dans les mêmes conditions (i.e. même opérateur, lot de réactif, instrument, étalonnage et délai d'analyse le plus court possible). Nous avons évalué la répétabilité sur 2 niveaux (20 échantillons pour chaque niveau), à l'aide d'un « plasma free » surchargé. Les niveaux choisis étaient 73 et 136 µM pour le Trp, 2 et 3,6 µM pour la KYN, et entre 15 et 32 nM et entre 30 et 59 nM pour les autres molécules. Dans notre cas, la répétabilité englobe la phase pré-analytique et analytique, une déprotéinisation ayant été effectuée pour chacun des échantillons. L'exploitation des résultats consiste à calculer le coefficient de variation (CV) des valeurs obtenues, selon la formule précitée.

3. Fidélité intermédiaire

L'essai de fidélité intermédiaire, ou reproductibilité intra-laboratoire, consiste à analyser un même échantillon dans des conditions différentes en faisant varier au moins un des facteurs précités. Pour ce paramètre, nous avons utilisé les résultats de nos CIQ. Nous avons ainsi évalué la fidélité intermédiaire grâce à 20 échantillons, en faisant varier les facteurs temps, opérateur, étalonnage

et/ou lot de réactif pour chaque CIQ. L'exploitation des résultats a été réalisée par le calcul du CV des valeurs obtenues.

4. Limites de détection (LOD) et de quantification (LOQ)

En spectrométrie de masse couplée à de la chromatographie, la limite de détection (LOD) est souvent définie comme la plus petite concentration d'analyte donnant un signal/bruit (S/N) de 3, tandis que la limite de quantification (LOQ) correspond à un S/N de 10. Les LOD et LOQ ont été définies techniquement par le passage de « plasma free » surchargé à différentes concentrations. Nous avons ensuite analysé les rapports S/N afin de déterminer les concentrations correspondant à un S/N de 3 et de 10 pour chaque analyte.

5. Limite de linéarité haute

La limite de linéarité haute (LL) correspond à la plus forte concentration qu'il est possible d'analyser avec une exactitude satisfaisante. Nous l'avons déterminée par l'analyse en duplicat d'échantillons de « plasma free » surchargés à différentes concentrations (dilution d'une solution de surcharge très concentrée). Selon les publications, plusieurs critères peuvent être utilisés pour définir la LL, celle recommandée par la Food and Drug Administration préconisant un biais < +/- 20% (180). Nous avons choisi de définir notre LL comme la concentration testée nous donnant un biais < +/-10% (moyenne des duplicats) par rapport à la concentration théorique estimée pour tous les analytes, et +/-15% pour ceux dont le CV de fidélité intermédiaire est > 10 % (i.e. KYN, 5HTP, 5HT, AK et XA).

6. Contamination

La contamination inter-échantillons a été analysée par le passage de 3 échantillons à concentration élevée (H) suivi de 3 échantillons à concentration basse (B), cet enchainement ayant été réalisé 4 fois de suite. Nous avons utilisé les 2 niveaux de CIQ pour réaliser cet essai. Les résultats ont ensuite été analysés selon la formule suivante :

$$\text{Contamination (\%)} = \frac{(mB1 - mB3)}{(mH - mB3)} \times 100$$

Où : m : moyenne

B1 : 1^{ers} échantillons bas de chaque enchainement

B3 : 3^{èmes} échantillons bas de chaque enchainement

H : échantillons hauts

7. Stabilités : standards, CIQ, sang total, résidu sec, résidu sec solubilisé, plasma lors de congélations successives

L'essai de stabilité consiste à vérifier l'intégrité de nos molécules d'intérêt dans le temps.

Plusieurs stabilités ont été vérifiées :

- Stabilité des standards : Afin de vérifier la stabilité de nos standards au cours du temps, nous avons regardé l'évolution de la pente de la droite de calibration. La stabilité a été considérée comme correcte si le CV obtenu était < 15 % pour KYN, 5HTP, 5HT, AK et XA, et < 10% pour les autres molécules.
- Stabilité des CIQ : Afin de vérifier la stabilité de nos CQI congelés, nous avons regardé l'évolution du CV au cours du temps. La stabilité a été considérée comme correcte si le CV obtenu était inférieur ou identique à celui de la fidélité intermédiaire.
- Stabilité du sang total : afin de déterminer nos exigences pré-analytiques, nous avons testé la stabilité de nos analytes dans le sang total. Pour cela, nous avons travaillé à partir de 2 prélèvements de sang total sur tube EDTA issus de 2 sujets-sains. Pour chacun, la centrifugation a été effectuée immédiatement après le prélèvement, après 15 minutes, 30 minutes, 1h, 2h et 4h. Le plasma ainsi obtenu a été immédiatement aliquoté et congelé à -5°C +/- 15°C jusqu'à analyse des échantillons. Nous avons testé deux modalités de conservation du sang total : à température ambiante et abri de la lumière, ou à 5°C +/- 3°C à l'abri de la lumière (correspondant à un acheminement au contact de la glace). La stabilité du

sang total a été considérée comme acceptable si la moyenne des concentrations obtenues pour chaque analyte était conforme à la valeur obtenue à T0 (écart de concentration < 15% pour KYN, 5HTP, 5HT, AK et XA et < 10% pour les autres).

- Stabilité du résidu sec : la phase pré-analytique constitue une étape critique, et l'évaporation du déprotéinisé est l'étape la plus longue et la plus contraignante. En effet, nous n'avons à notre disposition qu'un seul évaporateur, ce qui nous permet une évaporation concomitante de 50 échantillons maximum. De plus, le temps de l'évaporation dépend du débit d'azote, celui-ci étant réparti en fonction du nombre d'échantillons. Il est donc difficile d'estimer avec précision le temps de cette évaporation (dépendant du nombre d'échantillons et de l'ajustement du débit d'azote à chaque instant) qui peut varier de moins de 2h à plus de 5h. Nous avons donc voulu tester la stabilité du résidu sec, afin de permettre plus de souplesse technique. En effet, un résidu sec stable nous permettrait de préparer la partie de la manipulation la plus chronophage en amont de l'injection.

Pour cela, nous avons testé deux conditions de conservation du résidu sec différentes : la température ambiante à l'abri de la lumière (correspondant à des échantillons évaporés et laissés dans l'évaporateur) et une conservation dans des tubes eppendorf bouchés à -23°C +/- 5°C à l'abri de la lumière. Pour chaque condition, nous avons analysé les 2 niveaux de CIQ en triplicat. Le premier jour, nous avons réalisé 15 résidus secs pour chaque niveau, 3 étant solubilisés et analysés immédiatement, le reste étant stocké à température ambiante ou à -23°C +/- 5°C. La solubilisation et l'analyse de 3 échantillons de chaque niveau ont été réalisées à J1 et J4. Un schéma reprenant le protocole est présenté Figure 16.

Le résidu sec a été considéré comme stable si la moyenne des concentrations obtenues en triplicat pour chaque analyte était conforme à la valeur obtenue à J0 (écart de concentration < 15% pour KYN, 5HTP, 5HT, AK et XA et < 10% pour les autres).

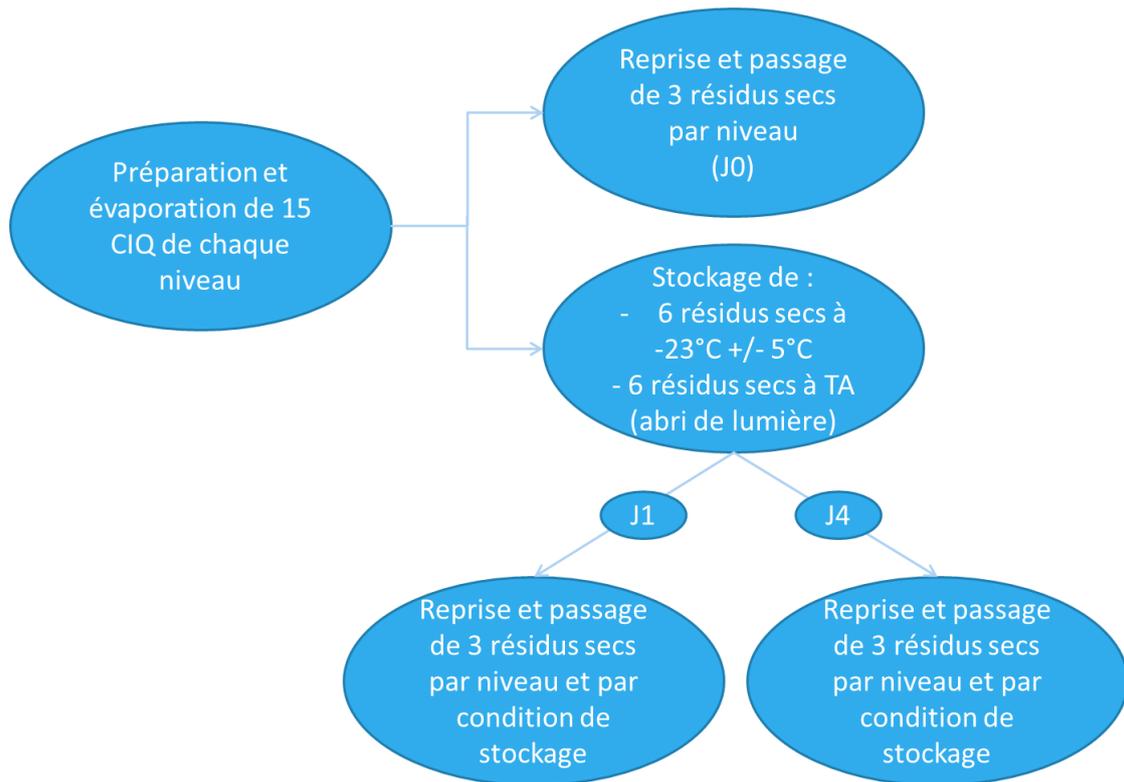


Figure 16 : Protocole utilisé pour tester la stabilité des résidus secs. Abréviation : TA : température ambiante

- Stabilité du résidu sec solubilisé** : selon la même idée que pour le résidu sec, mais également pour pallier à un problème ponctuel non prévisible de l'HPLC-MS/MS, nous avons souhaité connaître la stabilité du résidu sec une fois repris par les 30 μ L d'eau + 0,08% d'ASC. Un résidu sec solubilisé stable permet d'une part de réaliser entièrement la préparation pré-analytique en amont, mais également de pouvoir réinjecter un échantillon pour lequel la phase analytique aurait posé problème. Nous n'avons testé cette fois qu'une seule condition de température (entre 2 et 8°C à l'abri de la lumière), qui correspond non seulement à une conservation au réfrigérateur, mais également à des échantillons laissés sur le passeur de l'analyseur. Nous avons effectué cette démarche avec des échantillons mis en plaque, mais également en flacons. Les 2 niveaux de CIQ, à chaque fois manipulés en triplicats, ont été injectés à J0, J1, J4 et J14.

L'échantillon solubilisé a été considéré comme stable si la moyenne des concentrations obtenues en triplicat pour chaque analyte était conforme à la valeur obtenue à J0 (écart de concentration < 15% pour KYN, 5HTP, 5HT, AK et XA et <10% pour les autres).

- Stabilité du plasma lors de cycles de congélation/décongélation successifs : afin de vérifier la stabilité de nos molécules d'intérêt dans le plasma lors de congélations successives, nous avons réalisé 3 cycles de congélation/décongélation de 2 plasmas de sujets-sains. La stabilité du plasma à la congélation a été considérée comme acceptable si la concentration obtenue pour chaque analyte était conforme à la valeur obtenue avant les cycles de congélation/décongélation (écart de concentration < 15% pour KYN, 5HTP, 5HT, AK et XA et < 10% pour les autres).

8. Exactitude

L'exactitude de notre dosage n'a pu être évaluée que pour le Trp et le 5HT, ceci étant dû à l'absence de contrôles externes de la qualité (CEQ) ou de CIQ externalisés pour les autres molécules. Pour le Trp, l'exactitude a été vérifiée grâce à l'utilisation d'un CIQ externalisé (ClinChek Control, level 1 de RECIPE, Allemagne). Pour le 5HT, l'exactitude a été vérifiée à l'aide de 2 CEQ (Instand EQAS, Allemagne). L'exactitude a été considérée comme satisfaisante si le résultat obtenu se situait dans les limites préconisées par le fournisseur.

9. Effet matrice et efficacité d'extraction

L'effet matrice est un terme employé en spectrométrie de masse pour désigner toute augmentation ou baisse de l'ionisation de l'analyte d'intérêt due à un composé co-éluant. Cet effet peut affecter plusieurs paramètres de la méthode (LOD, LOQ, linéarité, biais), c'est pourquoi il est important de connaître l'effet matrice pour chacune de nos molécules.

L'efficacité d'extraction correspond au pourcentage d'analyte initialement présent dans l'échantillon que l'on arrive à extraire selon notre procédure pré-analytique. Ce paramètre permet de déterminer l'étendue des concentrations mesurables dans la matrice d'intérêt avec la procédure pré-analytique mise en place.

Plusieurs approches existent pour déterminer ces deux paramètres. Nous avons choisi une méthode publiée par Matuszewski (181), basée sur la comparaison de trois types d'échantillons différents. Le premier (A), est constitué d'une solution des molécules d'intérêt dans la phase de reprise (eau + 0,08% d'ASC), en triplicat ; le deuxième (B) est représenté par différents lots de « plasmas free », déprotéinisés, évaporés, et surchargés (i.e. avec ajout des molécules d'intérêt et des standards) après l'extraction ; enfin, le dernier type (C), est constitué des mêmes « plasmas free » mais dont la surcharge est réalisée dès le début de la phase pré-analytique, avant extraction. Nous avons réalisé cette manipulation sur 3 « plasmas free » et 1 pool de « plasmas free » différents, à deux concentrations différentes (une haute et une basse). Nous avons ensuite comparés les différents ratios surface de l'analyte/surface du SI obtenus selon les formules ci-dessous :

$$\text{Effet matrice (\%)} = \text{moyenne} \left(\frac{B}{A} \right) \times 100$$

$$\text{Efficacité d'extraction (\%)} = \text{moyenne} \left(\frac{C}{B} \right) \times 100$$

Où :
A : molécules d'intérêt dans la phase de reprise
B : « plasmas free » déprotéinisés, évaporés et surchargés après l'extraction
C : « plasmas free » surchargés puis déprotéinisés et évaporés

10. Valeurs de référence

Les valeurs de référence ont été obtenues à partir de 30 plasmas issus de patients non atteints de pathologies graves (personnes venant pour un bilan lipidique au centre de prélèvement) à

jeun, considérés comme sujets-sains. L'âge, le sexe, l'indice de masse corporelle (IMC) et les traitements en cours ont été relevés. La phase pré-analytique a été effectuée conformément au protocole (tubes EDTA). Les valeurs de référence ont été calculées comme étant la moyenne obtenue +/- deux écarts-types.

Nous avons également analysé 16 plasmas issus de donneurs de l'établissement français du sang (EFS) non à jeun, pour lesquels le pré-analytique était conforme au protocole décrit ci-dessus (tubes EDTA).

11. Comparaison du type de tube de prélèvement

Nous avons dosé les 9 molécules d'intérêt dans le plasma de 28 sujets-sains prélevés sur tubes héparinés et tubes EDTA. La comparaison entre ces 2 types d'anticoagulants a été réalisée selon les recommandations du COFRAC (177) : un graphique des différences a été créé (différence de chaque point (EDTA-hépariné) en fonction de la valeur obtenue pour l'analyte sur EDTA), avec comme limite de suivi +/- 4,24 écart-type de la fidélité intermédiaire obtenue à partir des CIQ.

12. Variabilité intra-individuelle

Afin d'étudier la variabilité intra-individuelle, un sujet-sain a été prélevé 3 jours consécutifs selon les recommandations pré-analytiques. La variabilité intra-individuelle a été objectivée en comparant le CV de chaque molécule à la valeur indiquée dans la littérature (tables de Ricos (182)).

13. Variabilité inter-opérateur

Afin d'étudier la variabilité inter-opérateur, nous avons analysé les résultats de fidélité intermédiaire obtenus pour chaque opérateur. Cette étude a été menée uniquement sur la partie pré-analytique, le post-analytique (intégration des données) ayant toujours été réalisé par le même opérateur. Nous avons ainsi analysé la moyenne et le CV obtenus pour l'opérateur 1 (n=11) et l'opérateur 2 (n=8). La variabilité inter-opérateur a été considérée comme acceptable en l'absence

de différence significative entre les deux opérateurs (différence < 15% pour KYN, 5HTP, 5HT, AK et XA et < 10% pour les autres).

5. Autres méthodes de dosages utilisées

Afin de pouvoir interpréter le plus judicieusement possible les résultats obtenus chez les patients PCU, nous avons mis en œuvre un certain nombre de dosages dans cette population. Le dosage de la Phe et de la Tyr ont été réalisés selon le protocole en vigueur au laboratoire, par chromatographie échangeuse d'ions à l'aide d'un Hitachi L8800 à partir d'un plasma hépariné. Les dosages des vitamines B1 et B6 ont été effectués sur sang total issu d'un tube EDTA grâce à l'utilisation d'un kit Chromsystems B1-B6 (chaîne HPLC Shimadzu Prominence), selon les protocoles en vigueur au laboratoire.

6. Analyses statistiques

Les analyses statistiques ont été effectuées à l'aide de StatView version 5.0 (tests non paramétriques de Mann et Whitney, seuil de significativité fixé à 5%).

Partie 3 : Résultats

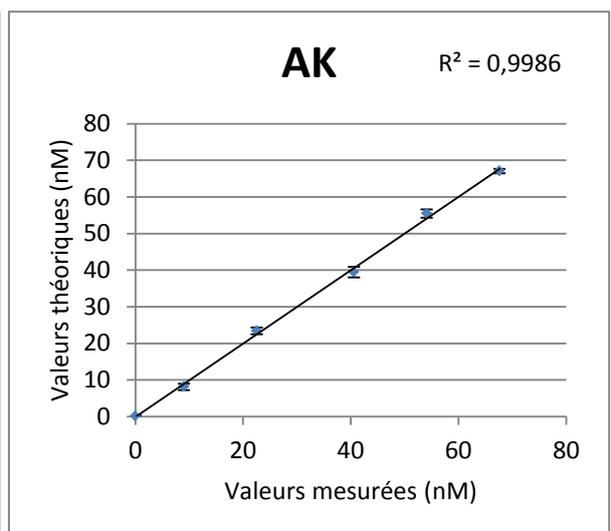
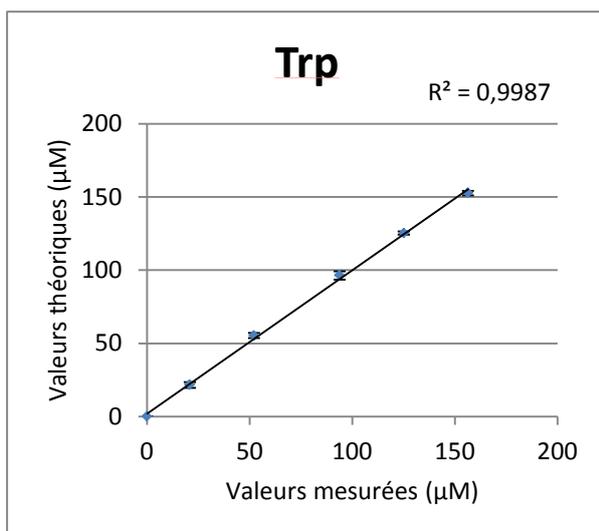
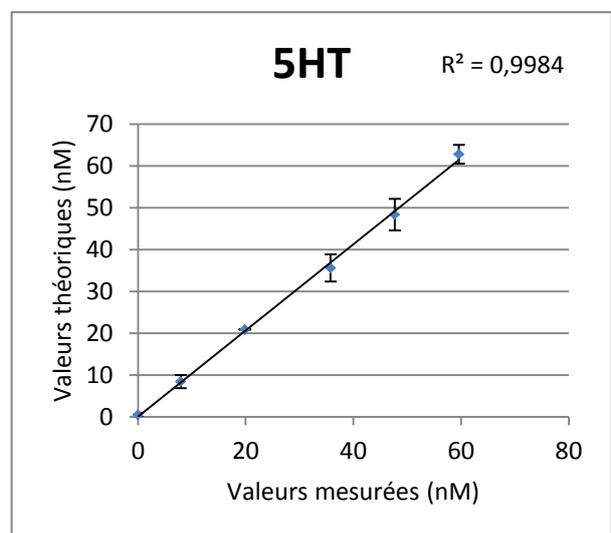
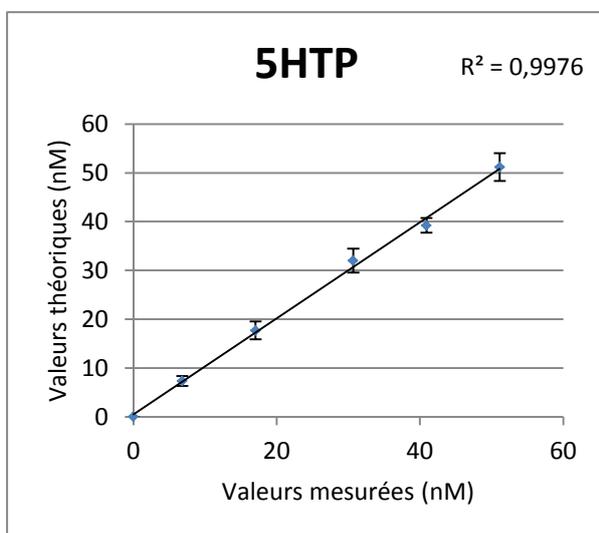
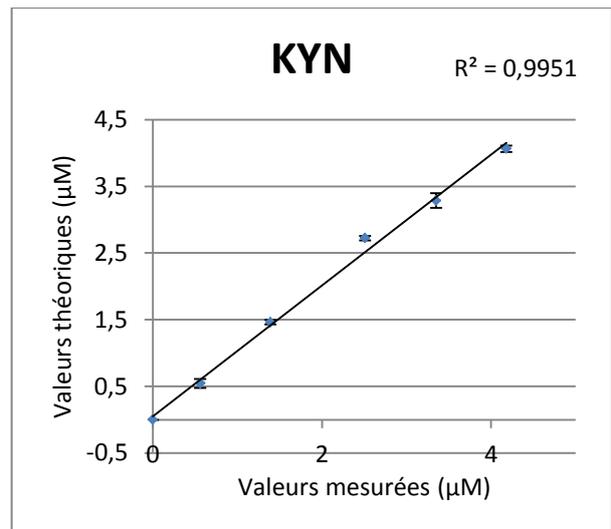
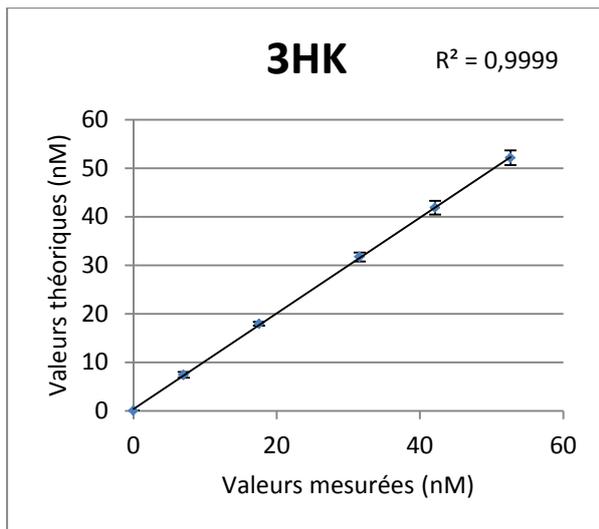
Chapitre 1 : Validation de méthode

1. Reproductibilité de la gamme

Le Tableau VI reprend les différentes concentrations et CV retrouvés pour chaque point de gamme tandis que la Figure 17 illustre ces résultats. Les CV du point de gamme 1, correspondant la plupart du temps à des concentrations proches de la limite de quantification (cf I.A.4 Limites de détection (LOD) et de quantification (LOQ)) sont plus élevés, mais ne dépassent jamais 20%. Les autres CV sont inférieurs à 10%, sauf le point 2 du 5HTP, et sont toujours inférieurs aux CV de fidélité intermédiaire. De plus, le coefficient de détermination de la droite (R^2) comparant les valeurs théoriques et mesurées est supérieur à 0,998 pour chaque paramètre, sauf pour la KYN (supérieur à 0,995) et le 5HTP (supérieur à 0,997). La reproductibilité de la gamme est donc tout à fait acceptable.

Points de la gamme		1	2	3	4	5
3HK	Valeur moyenne (nM)	7	18	32	42	52
	CV (%)	8,3	2,3	2,9	3,4	2,9
KYN	Valeur moyenne (μ M)	0,5	1,5	2,7	3,3	4,1
	CV (%)	12,1	2,4	1,2	3,3	1,2
5HTP	Valeur moyenne (nM)	6	16	31	40	53
	CV (%)	13,5	10,3	7,7	3,9	5,6
5HT	Valeur moyenne (nM)	8	21	36	48	63
	CV (%)	18,6	0,5	9,1	7,9	3,6
Trp	Valeur moyenne (μ M)	22	55	96	125	153
	CV (%)	9,5	3,1	3,0	0,9	1,0
AK	Valeur moyenne (nM)	8	23	39	56	67
	CV (%)	10,8	3,9	3,7	2,1	0,9
3HA	Valeur moyenne (nM)	7	18	32	41	51
	CV (%)	9,5	4,3	6,0	5,0	3,7
AA	Valeur moyenne (nM)	5	12	22	28	36
	CV (%)	6,6	3,6	2,8	1,6	3,4
XA	Valeur moyenne (nM)	5	13	23	30	39
	CV (%)	5,6	8,7	3,9	4,7	0,9

Tableau VI : Reproductibilité de la gamme (n=3). Abréviation : CV : coefficient de variation.



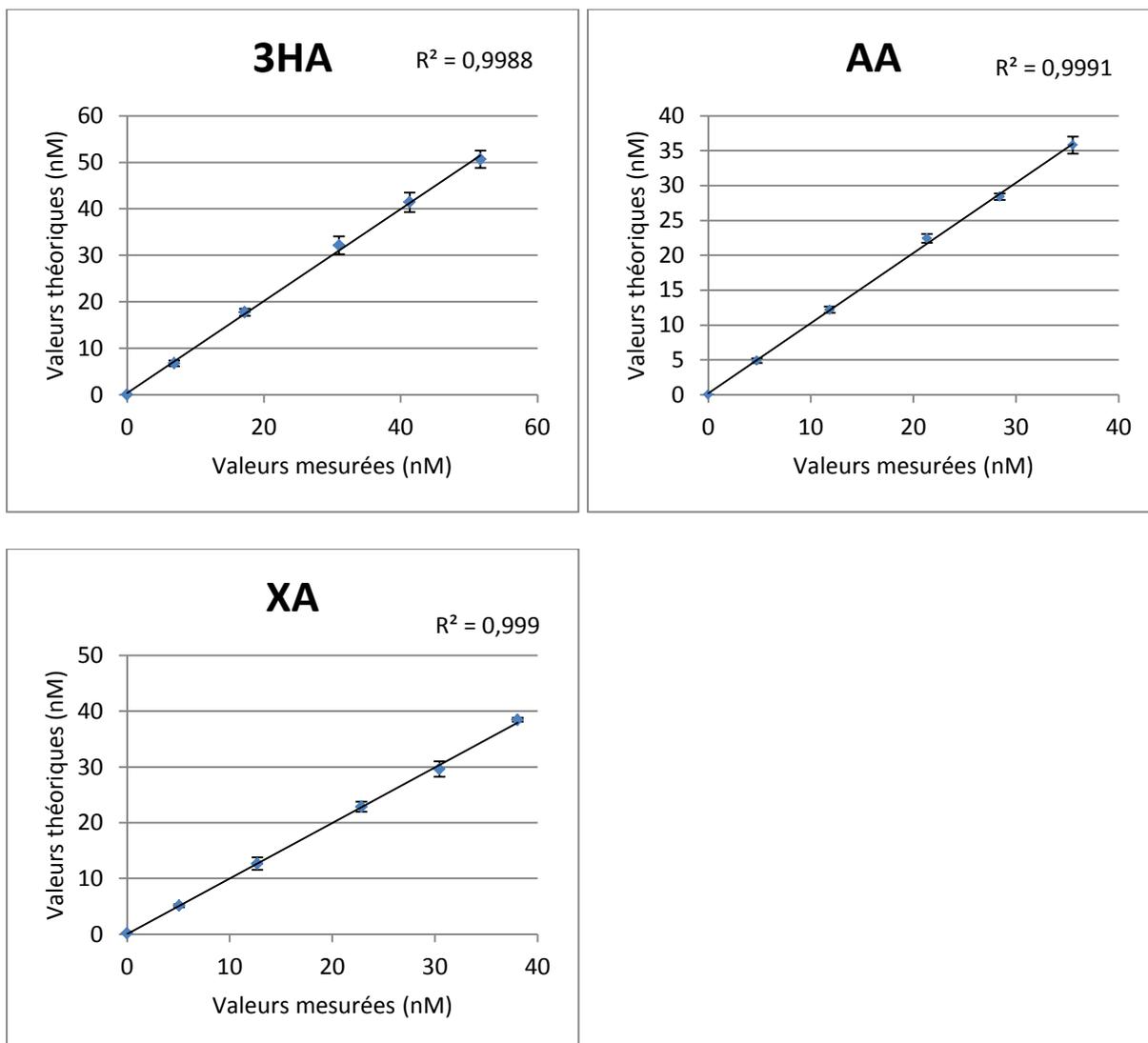


Figure 17 : Reproductibilité de la gamme (n=3). Les barres représentent le coefficient de variation obtenu pour chaque point. Abréviation : R^2 : coefficient de détermination de la droite

2. Répétabilité

La répétabilité a été évaluée sur 20 échantillons pour chaque niveau de CIQ, encadrants les valeurs de référence. Les résultats obtenus, synthétisés dans le Tableau VII, montrent un CV tout à fait acceptable. Il est inférieur à 9% pour chaque molécule, hormis le 5HTP (12%). Cette répétabilité un peu plus élevée du 5HTP peut s'expliquer par l'absence de SI dédié à cette molécule.

Molécule	Niveau du CIQ	Ecart-type	CV (%)
3HK	25 nM	2 nM	8,0
	49 nM	3 nM	7,0
KYN	1,9 µM	0,1 µM	7,0
	3,5 µM	0,2 µM	5,5
5HTP	26 nM	2 nM	9,1
	52 nM	6 nM	11,6
5HT	25 nM	2 nM	6,1
	49 nM	4 nM	8,8
Trp	70 µM	2 µM	3,0
	129 µM	3 µM	2,5
AK	32 nM	1 nM	3,7
	58 nM	4 nM	6,7
3HA	23 nM	1 nM	4,9
	45 nM	2 nM	5,6
AA	16 nM	0,5 nM	2,8
	30 nM	1 nM	3,8
XA	14 nM	1 nM	7,9
	26 nM	2 nM	5,9

Tableau VII : Répétabilité du dosage des différentes molécules (n=20 pour chaque niveau).

3. Fidélité intermédiaire

La fidélité intermédiaire, ou reproductibilité intra-laboratoire, a été évaluée sur 20 échantillons, techniqués par 3 opérateurs différents sur une période de 3,5 mois. Les résultats obtenus, synthétisés dans le Tableau VIII, montrent une fidélité intermédiaire tout à fait acceptable, car inférieure à 15 % pour toutes les molécules sauf le 5HT pour lequel un niveau est légèrement supérieur à 15%.

Molécule	Niveau du CIQ	Ecart-type	CV (%)
3HK	16 nM	2 nM	9,8
	30 nM	2 nM	8,0
KYN	1,3 µM	0,1 µM	7,7
	2,4 µM	0,3 µM	10,8
5HTP	13 nM	1 nM	11,1
	25 nM	3 nM	13,4
5HT	17 nM	2 nM	10,7
	32 nM	5 nM	15,9
Trp	46 µM	3 µM	6,0
	87 µM	5 µM	5,8
AK	20 nM	2 nM	11,7
	38 nM	4 nM	10,9
3HA	16 nM	2 nM	9,7
	30 nM	2 nM	8,4
AA	11 nM	0,7 nM	6,0
	20 nM	1 nM	6,3
XA	15 nM	2 nM	12,3
	21 nM	2 nM	8,6

Tableau VIII : Fidélité intermédiaire du dosage des différentes molécules (n=20 pour chaque niveau)

4. Limites de détection (LOD) et de quantification (LOQ)

Les limites de détection (LOD) et de quantification (LOQ), déterminées de manière expérimentale, sont synthétisées dans le Tableau IX. Les plus grandes dynamiques se retrouvent schématiquement pour les molécules à fortes concentrations (i.e. Trp et KYN), tandis que les molécules dont la concentration plasmatique est de l'ordre du nM ont une dynamique plus faible. Il est important de noter que les valeurs physiologiques de chaque molécule sont comprises dans notre étendue de mesure, sauf pour 5HT, 5HTP et AA pour lesquelles nos valeurs physiologiques s'étendent au-delà de notre LOQ (cf 11.1 Sujets à jeun prélevés sur tube EDTA).

Molécule	LOD	LOQ	Limite de linéarité haute
3HK	1,8 nM	3,5 nM	292 nM
KYN	2 nM	4 nM	13 µM
5HTP	1,4 nM	2,3 nM	132 nM
5HT	2,0 nM	4,0 nM	634 nM
Trp	83 nM	139 nM	444 µM
AK	1,3 nM	3,0 nM	687 nM
3HA	1,0 nM	2,3 nM	451 nM
AA	0,5 nM	1,0 nM	354 nM
XA	1,7 nM	5,1 nM	524 nM

Tableau IX : Limites de détection (LOD), de quantification (LOQ) et de linéarité haute.

5. Limite de linéarité haute

Les limites de linéarité haute sont présentées dans le Tableau IX. Un exemple des biais obtenus pour le 5HT est représenté en Figure 18, montrant la répartition des biais observés pour chaque concentration théorique testée.

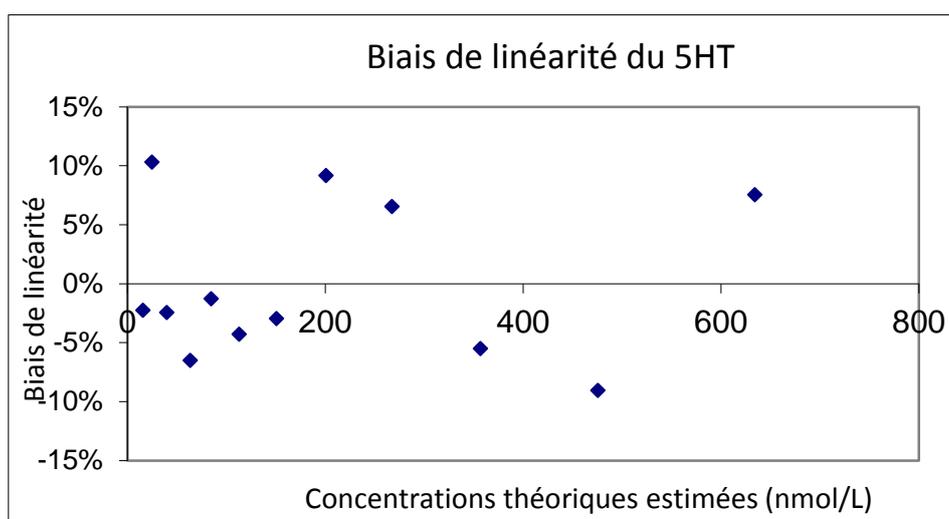


Figure 18 : Exemple de biais retrouvés lors de l'essai de limite de linéarité haute pour la sérotonine (5HT) (en duplicat pour chaque point).

6. Contamination inter-échantillon

La contamination a été calculée pour chaque molécule, et est synthétisée dans le Tableau X. Le CV calculé est inférieur à celui de la répétabilité pour chaque molécule, sauf pour le 3HA pour lequel le CV est comparable. Une contamination inter-échantillons peut donc être exclue.

Molécule	Contamination (%)	Interprétation
3HK	1 %	< CV de répétabilité
KYN	2 %	< CV de répétabilité
5HTP	- 5 %	< CV de répétabilité
5HT	- 8 %	< CV de répétabilité
Trp	1 %	< CV de répétabilité
AK	2 %	< CV de répétabilité
3HA	6 %	= CV de répétabilité
AA	2 %	< CV de répétabilité
XA	5 %	< CV de répétabilité

Tableau X : Contamination calculée (%) pour chaque molécule selon le test de contamination recommandé par le COFRAC (178) (n=24).

7. Stabilités : standards, CIQ, sang total, résidu sec, résidu sec solubilisé, plasma lors de congélations successives

1. Stabilité des standards

La stabilité des standards a été analysée sur 4,5 mois. Les coefficients de variation de la pente de la droite de calibration sont synthétisés dans le Tableau XI. Nos standards sont considérés comme stables selon notre protocole de conservation au cours de ces 4,5 mois. Une attention particulière devra être maintenue concernant ce paramètre, en particulier pour le 3HK pour lequel le CV de la pente est très légèrement supérieur à nos exigences.

Molécule	CV (%) de la pente
3HK	11
KYN	2
5HTP	10
5HT	10
Trp	5
AK	14
3HA	6
AA	3
XA	9

Tableau XI : Coefficient de variation (%) calculé pour la pente de la droite de calibration de chaque molécule au cours des 4,5 mois.

2. Stabilité des CIQ

La stabilité des CIQ a été évaluée grâce au coefficient de variation de la fidélité intermédiaire sur 4,5 mois. Ces résultats sont colligés dans le Tableau XII. Les CV étant tous inférieurs ou égaux à ceux obtenus lors de l'essai de fidélité intermédiaire (réalisé pendant 3,5 mois), la stabilité des CIQ pendant 4,5 mois dans les conditions de conservation de notre protocole est acceptable.

Molécule	CV (%) Niveau 1	CV (%) Niveau 2
3HK	9	8
KYN	6	11
5HTP	12	13
5HT	10	15
Trp	5	6
AK	11	9
3HA	8	7
AA	6	7
XA	14	12

Tableau XII : Coefficients de variation (%) obtenus pour les niveaux 1 et 2 de chaque molécule sur 4,5 mois.

3. Stabilité du sang total

La stabilité du sang total a été effectuée sur 2 sangs totaux issus de 2 sujets-sains. Concernant le 5HT, l'analyse n'a pas pu être menée à bien, les deux sangs totaux utilisés présentant des concentrations inférieures à la LOQ lors d'une centrifugation immédiatement après le prélèvement.

La stabilité du sang total conservé à température ambiante à l'abri de la lumière (Figure 19A) montre une augmentation significative des concentrations de AA et de 5HTP au cours du temps, et ce dès 30 minutes (AA) et 2 heures (5HTP) de délai entre le prélèvement et la centrifugation. La stabilité du sang total conservé à 5°C +/- 3°C (Figure 19B) arrive globalement à la même conclusion (instabilité de AA au bout de 1 heure au lieu de 30 minutes). Les délais d'acheminement et de prise en charge pré-analytique sont primordiaux pour AA et 5HTP, avec une prise en charge < 30 minutes pour garantir des résultats fiables. Pour ces 8 analytes, la température de transport ne semble pas être le paramètre primordial, aucun biais évident n'étant décelé si le prélèvement est centrifugé en moins

de 30 min. Une étude sur une plus grande cohorte serait nécessaire afin de déterminer l'impact de la température. Il est de plus primordial d'évaluer la stabilité du 5HT.

Nous recommandons donc actuellement une prise en charge technique maximum 30 minutes après le prélèvement si celui-ci a été transporté à $5^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$, tout en sachant qu'il est possible d'accepter un prélèvement acheminé à température ambiante si celui-ci a été prélevé moins de 15 minutes auparavant.

Figure 19A

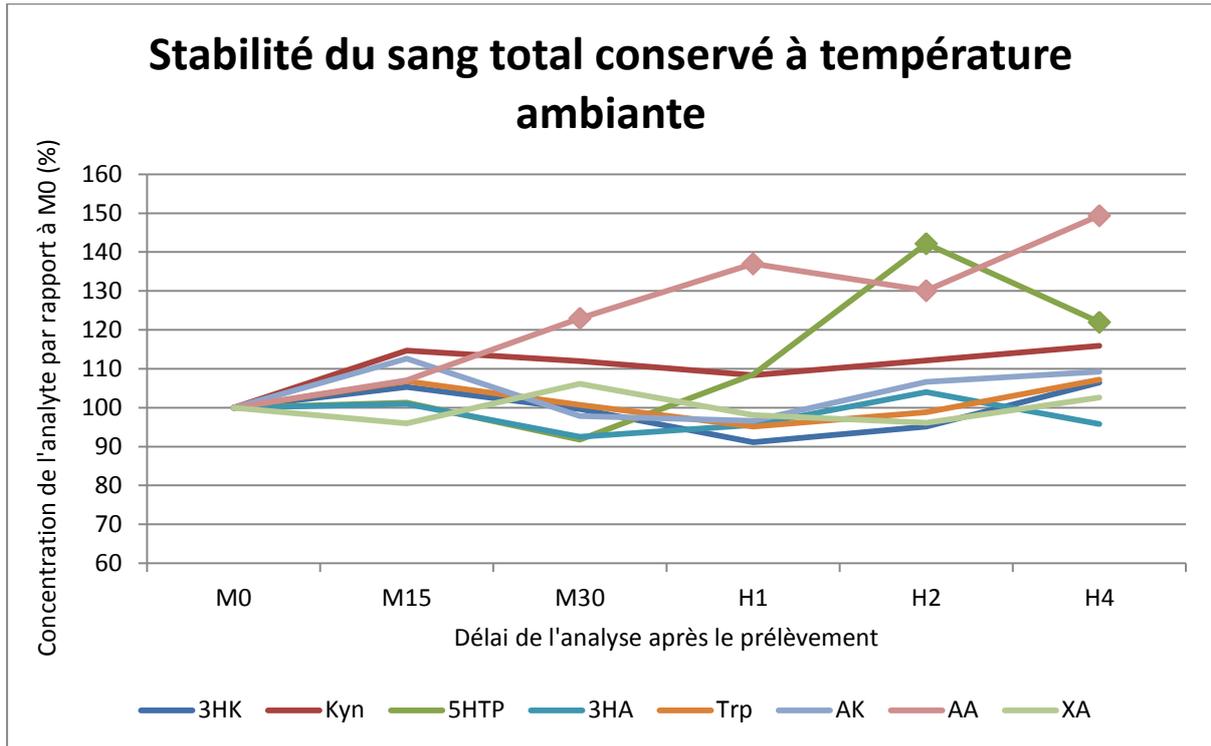


Figure 19B

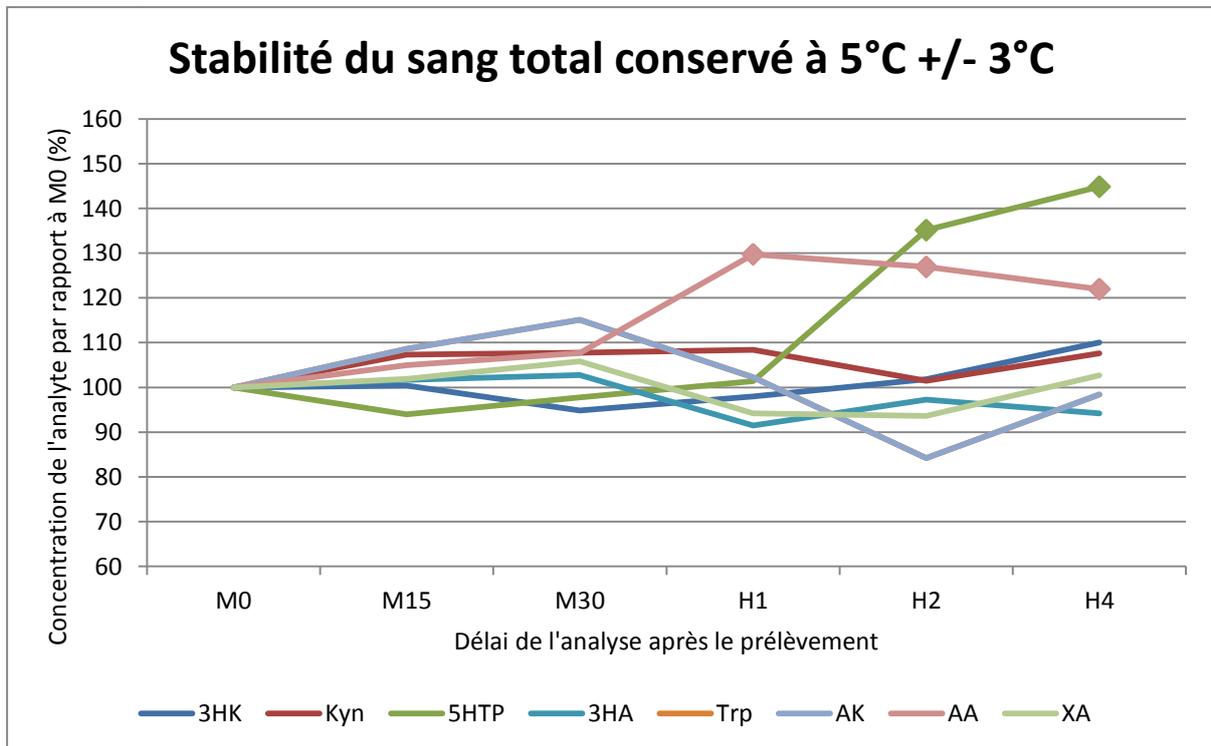


Figure 19 : Stabilité des molécules d'intérêt dans le sang total conservé à l'abri de la lumière à température ambiante (A) ou à 5°C +/- 3°C (B). Les points représentés par un losange sont les points pour lesquels le pourcentage de différence avec M0 est significatif. Abréviations : M : minutes ; H : heures

4. Stabilité du résidu sec

La stabilité du résidu sec a été analysée en triplicat sur 2 niveaux. La Figure 20 représente synthétiquement les pourcentages moyens des concentrations de chaque analyte par rapport à sa concentration à J0 (tous niveaux confondus).

Concernant la stabilité du résidu sec conservé à température ambiante (Figure 20A), nous remarquons un effondrement total des deux analytes de la voie du 5HT (i.e. 5HTP et 5HT) en 4 jours, une différence significative (i.e. un pourcentage par rapport à J0 > 15 %) se retrouvant dès J1. Une différence significative est observée pour le 3HK, le Trp et XA à J4. Les concentrations des autres molécules sont stables à J4 selon cette modalité de conservation. Les concentrations de l'ensemble des molécules d'intérêt du résidu sec conservé à température ambiante ne sont donc pas stables.

La conservation du résidu sec à $-23^{\circ}\text{C} \pm 5^{\circ}\text{C}$ (Figure 20B) ne montre pas de différence significative, hormis pour XA à J4. La stabilité du résidu sec à $-23^{\circ}\text{C} \pm 5^{\circ}\text{C}$ est donc acceptable sur 1 jour

Figure 20A

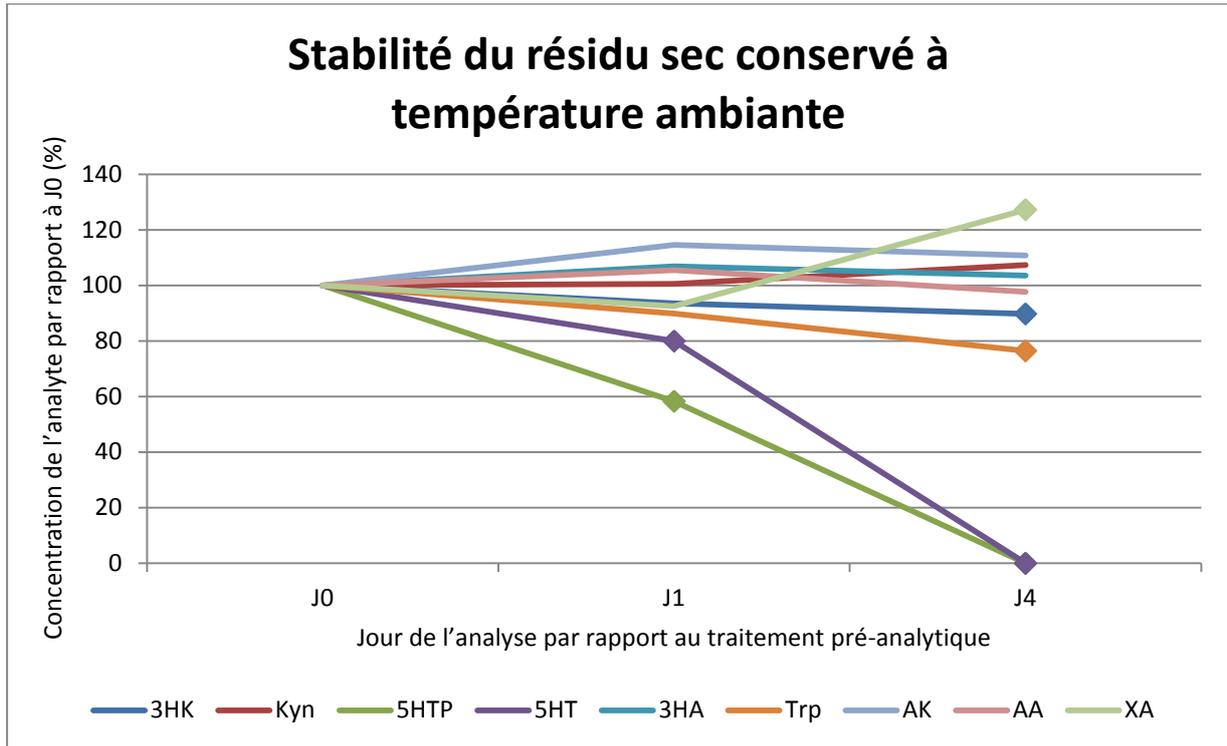


Figure 20B

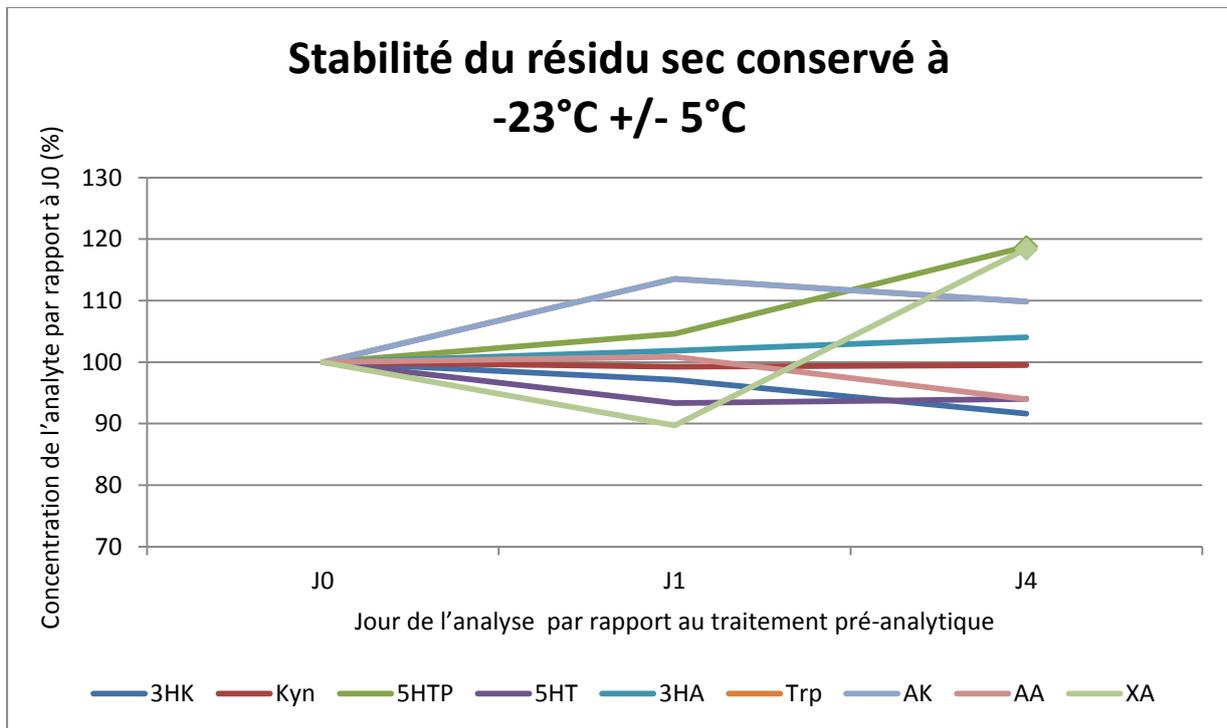


Figure 20 : Stabilité du résidu sec conservé à l'abri de la lumière à température ambiante (A) ou à -23°C +/- 5°C (B). Les points représentés par un losange sont les points pour lesquels le pourcentage de différence avec J0 est significatif.

5. Stabilité du résidu sec solubilisé

La stabilité du résidu sec solubilisé a été analysée en triplicat sur 2 niveaux. La Figure 21 représente synthétiquement les pourcentages moyens des concentrations de chaque analyte par rapport à sa concentration à J0 (tous niveaux confondus).

Concernant la stabilité du résidu sec solubilisé conservé en plaque (Figure 21A), aucune différence significative n'est observée à J1. A J4, nous observons une augmentation significative de XA et du 5HTP. A noter que l'analyse à J14 n'a pas pu être réalisée, l'échantillon s'étant évaporé.

Concernant la stabilité du résidu sec solubilisé conservé en flacon (Figure 21B), nous observons une augmentation significative du 5HTP à partir de J4, et une augmentation significative de XA à J14.

La stabilité du résidu sec solubilisé conservé entre 2 et 8°C à l'abri de la lumière est donc acceptable à J1, que l'échantillon se trouve en plaque ou en flacon.

Figure 21A

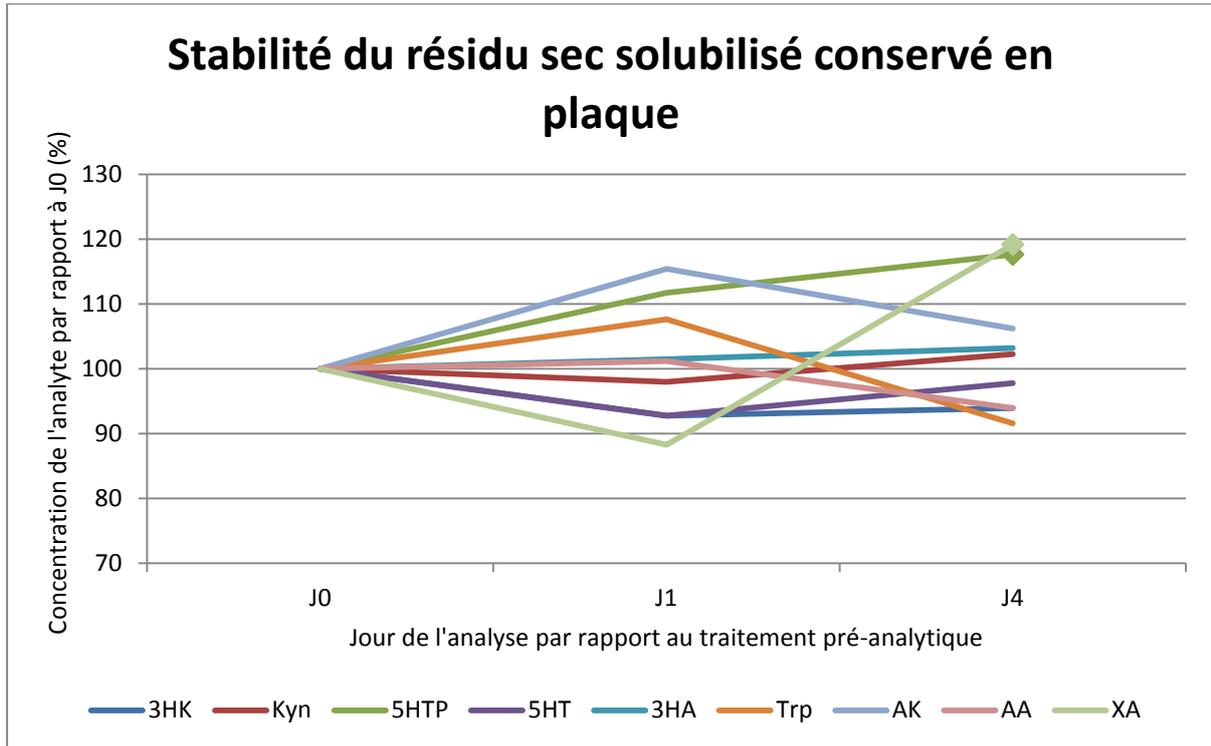


Figure 21B

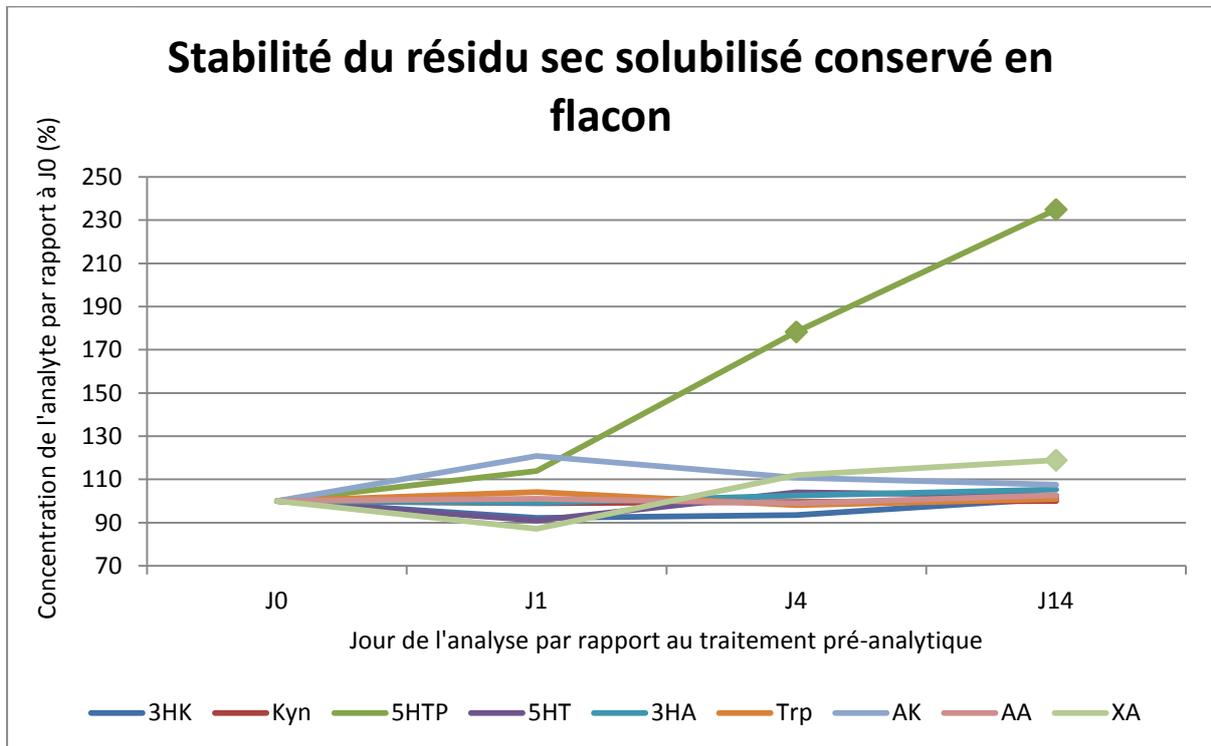


Figure 21 : Stabilité du résidu sec solubilisé conservé à l'abri de la lumière et entre 2 et 8 °C en plaque (A) ou en flacon (B). Les points représentés par un losange sont les points pour lesquels le pourcentage de différence avec J0 est significatif.

6. Stabilité du plasma lors de cycles de congélation/décongélation successifs

Les résultats obtenus lors de l'essai de stabilité du plasma lors de cycles de congélation/décongélation successifs sont synthétisés dans le Tableau XIII. Une augmentation significative du 5HTP et de AA étant visibles, il est impossible de congeler et décongeler plusieurs fois les échantillons.

Molécule	Différence après 3 cycles de congélation (%)	Interprétation
3HK	- 4 %	Absence de différence significative
KYN	0 %	Absence de différence significative
5HTP	38 %	Différence significative
5HT	1 %	Absence de différence significative
Trp	- 1 %	Absence de différence significative
AK	- 5 %	Absence de différence significative
3HA	- 6 %	Absence de différence significative
AA	105 %	Différence significative
XA	- 13 %	Absence de différence significative

Tableau XIII : Différences moyennes obtenues lors de 3 cycles de congélation/décongélation (n=2).

8. Exactitude

L'exactitude n'a pu être réalisée que pour le Trp et le 5HT, faute de CIQ externalisé ou CEQ pour les autres molécules. Les résultats obtenus concernant le test d'exactitude sont repris dans le Tableau XIV. Il faut noter que, pour le 5HT, une dilution des échantillons a dû être réalisée faute de volume suffisant (prise d'essai de 80 µL seulement au lieu des 190 µL habituellement prélevés). De plus, tous les échantillons ont été analysés une seule fois, et dans la même série. Les résultats obtenus montrent un biais inférieur à 30%, avec des résultats compris dans la fourchette des

préconisations fournisseurs. L'exactitude de ces 2 molécules est donc acceptable, mais il est impératif de confirmer ces résultats à l'aide d'autres échantillons.

Molécule	CIQ/CEQ	Résultat	Valeur cible	Biais (%)	Préconisation fournisseur
Trp	CIQ externalisé ClinCheck	54 µmol/L	43,6 µmol/L	24	30,5 – 56,7 µmol/L
5HT	CEQ Instand 21	2399 nmol/L	1859 nmol/L	29	1022 – 2696 nmol/L
5HT	CEQ Instand 22	753 nmol/L	645 nmol/L	17	355-935 nmol/L

Tableau XIV : Résultats obtenus lors du test d'exactitude

9. Effet matrice et efficacité d'extraction

L'effet matrice ainsi que l'efficacité d'extraction ont été évalués sur les 2 niveaux de CIQ. Les résultats sont colligés dans le Tableau XV. L'effet matrice est globalement nul pour tous les paramètres, sauf le 5HTP. En effet, cette molécule ne possédant pas son propre SI, aucune correction de l'effet de la matrice n'a lieu. La même conclusion s'applique également à l'efficacité d'extraction. Il n'est donc pas envisageable de quantifier nos molécules sur des gammes aqueuses ou sur des gammes ne suivant pas le même processus pré-analytique.

Molécule	Effet matrice (%)		Efficacité d'extraction (%)	
	Niveau 1	Niveau 2	Niveau 1	Niveau 2
3HK	103	108	92	95
KYN	102	104	97	95
5HTP	144	186	67	37
5HT	98	94	101	102
Trp	101	105	88	101
AK	102	99	95	95
3HA	86	103	104	94
AA	110	101	98	96
XA	103	107	98	96

Tableau XV : Effet matrice et efficacité d'extraction de nos 9 molécules (% de ratios) pour les niveaux 1 et 2. n=3 « plasmas free » et 1 pool de « plasmas free ».

10. Interférence

Nous avons pris le parti de ne pas réaliser de test d'interférence. En effet, il ne nous paraît pas constructif de vérifier l'interférence de l'hémolyse car l'ajout d'hémoglobine va apporter des protéines et donc forcément du Trp à notre échantillon. Le même raisonnement s'applique à un échantillon lipémique. Tout échantillon hémolysé ou lipémique sera donc considéré comme non conforme, et aucune analyse ne sera réalisée sur ce type de prélèvement. D'autres interférences sont également à prendre en compte, telles que les interférences médicamenteuses. Une étude bibliographique a été effectuée, ne montrant pas d'interférences connues concernant ces différentes molécules. Une vigilance particulière doit toutefois être maintenue concernant de possibles interférences.

11. Valeurs de référence

1. Sujets à jeun prélevés sur tube EDTA

Les résultats obtenus lors de l'établissement des valeurs de référence sur la population de sujets-sains sont présentés dans le Tableau XVI. Les résultats obtenus pour chaque sujet sont disponibles en annexe 3. Il est à noter que pour le 5HTP, les valeurs de référence ont été mesurées sur 29 sujets-sains, un sujet-sain ayant une concentration inférieure à la LOQ. Les résultats des 29 autres sujets se trouvant proches de cette LOQ, la suppression de cette valeur nous semble plus acceptable que de définir une valeur arbitraire. En ce qui concerne la sérotonine, les valeurs de référence n'ont pu être déterminées que pour 25 sujets-sains. De plus, 3 sujets-sains possèdent des concentrations inférieures à la LOQ, et 5 inférieures à la LOD. La suppression de 8 valeurs, alors que l'écart-type de cette molécule est élevé, induirait un biais non négligeable. Nous avons donc décidé de remplacer arbitrairement ces valeurs par celles de la LOD (i.e. 2 nmol/L) et de la LOQ (i.e. 4 nmol/L) pour les 5 et 3 sujets-sains respectivement.

Molécule	Moyenne	Ecart-type	Intervalle de référence
3HK	32 nM	11 nM	11 – 53 nM
KYN	1,9 µM	0,3 µM	1,4 – 2,5 µM
5HTP	5 nM	2 nM	<2,3 – 8,5 nM
5HT	16 nM	21 nM	< 4 – 57 nM
Trp	52 µM	7 µM	38 – 66 µM
AK	41 nM	11 nM	18 – 63 nM
3HA	21 nM	5 nM	11 – 31 nM
AA	8 nM	4 nM	<1 – 16 nM
XA	19 nM	7 nM	6 – 33 nM

Tableau XVI : Valeurs de référence obtenues dans la population de sujets-sains prélevés à jeun. n = 30, sauf pour le 5HTP où n=29 et le 5HT où n=25. Dans le cas du 5HT, il s'agit d'une valeur approximative, 5 sujets ayant des concentrations < limite de détection dont les valeurs ont été remplacées par 2 nM pour le calcul, et 3 sujet ayant des concentrations comprises entre la limite de détection et celle de quantification dont les valeurs ont été remplacées par 4 nM pour le calcul.

2. Sujets non à jeun prélevés sur tube EDTA

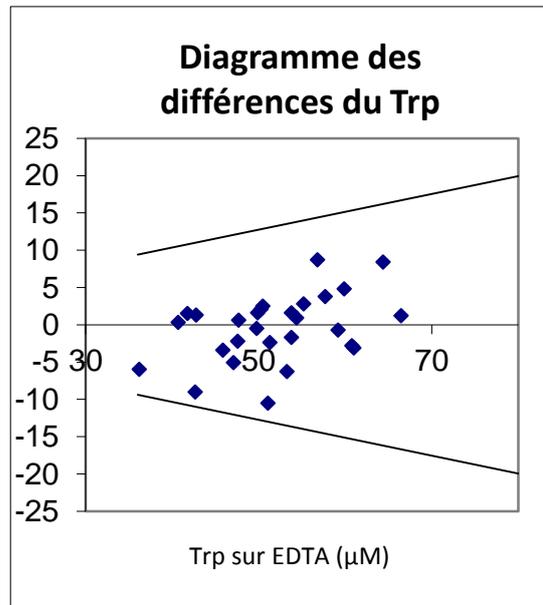
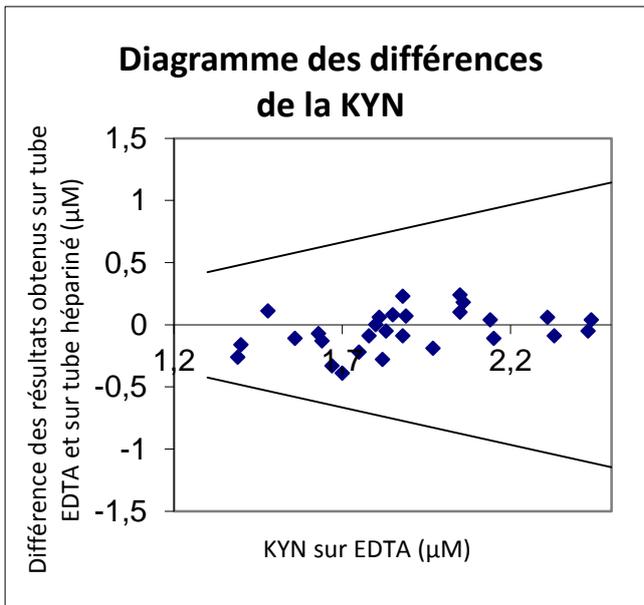
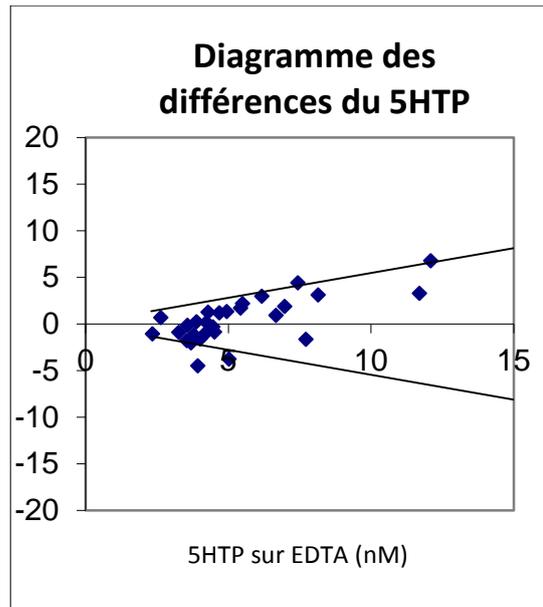
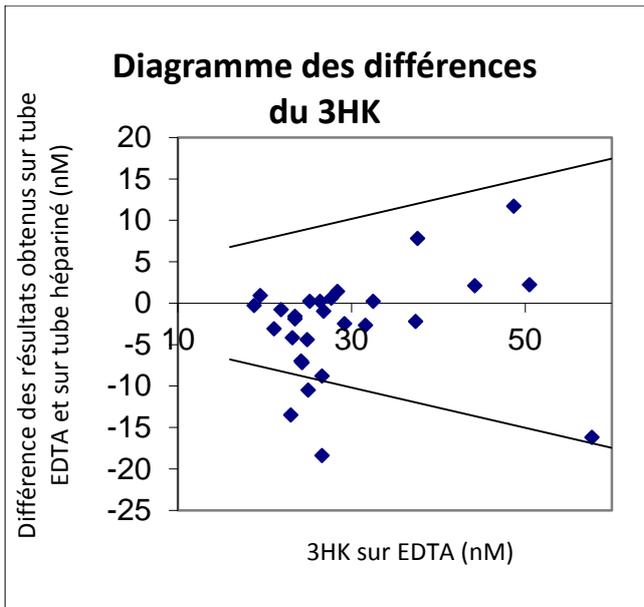
Les résultats obtenus lors des prélèvements des sujets-sains non à jeun sont disponibles en annexe 4. Les résultats des valeurs de référence ainsi calculées sont synthétisés dans le Tableau XVII. Les valeurs de référence correspondent à celles obtenues à jeun pour toutes les molécules sauf pour le Trp et 5HT. Ceci s'explique facilement par le fait que le Trp est un acide aminé essentiel, donc exclusivement apporté par l'alimentation. A noter que pour la KYN et le 3HA une différence dans la borne haute est notable, due à un écart-type plus important chez nos sujets-sains non à jeun. L'état de jeun influe donc sur les valeurs obtenues du Trp et du 5HT, et il n'est donc pas recommandé de rendre un résultat pour ces molécules si le patient n'est pas à jeun.

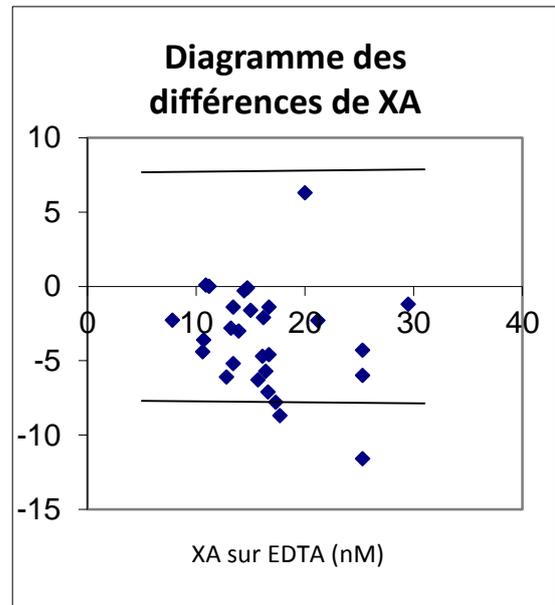
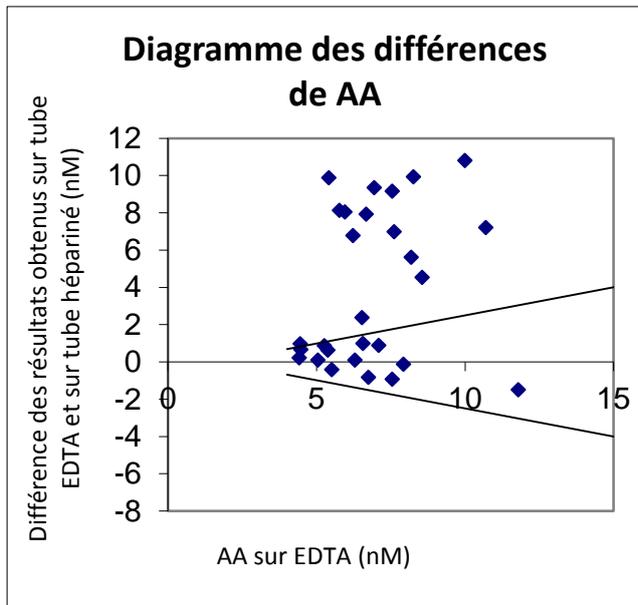
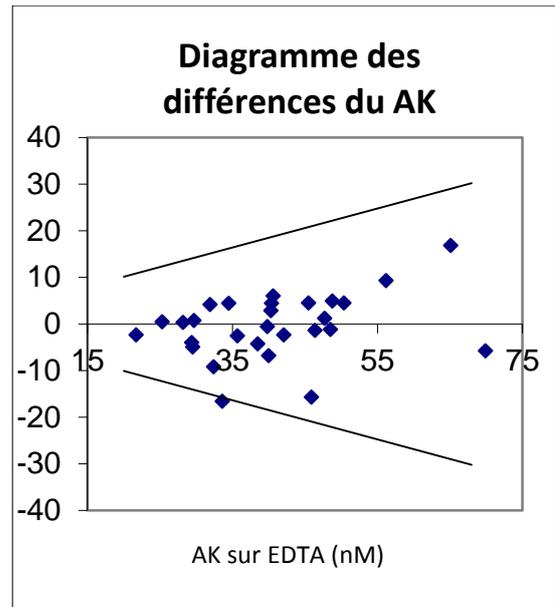
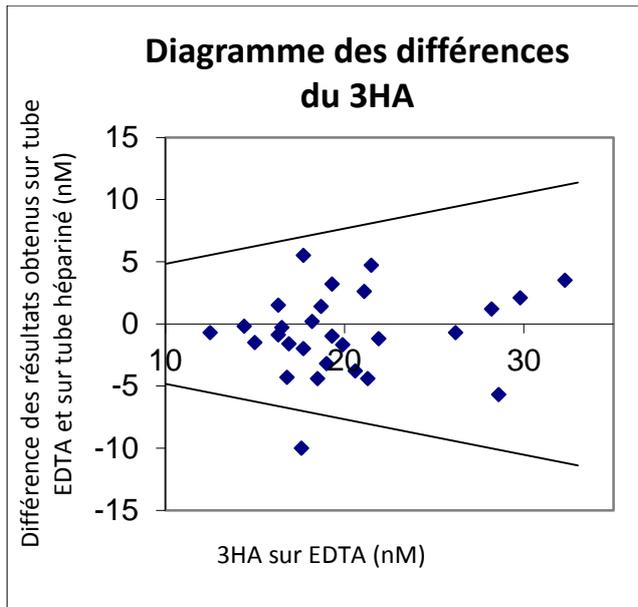
Molécule	Moyenne	Ecart-type	Intervalle de référence
3HK	34 nM	10 nM	14 – 54 nM
KYN	2,3 µM	0,6 µM	1,2 – 3,4 µM
5HTP	5 nM	1 nM	<2,3 – 8 nM
5HT	66 nM	57 nM	<4 - 180 nM
Trp	67 µM	11 µM	45 – 88 µM
AK	43 nM	11 nM	21 – 66 nM
3HA	28 nM	11 nM	5 – 51 nM
AA	7 nM	3 nM	2 – 12nM
XA	22 nM	5 nM	12 – 33 nM

Tableau XVII : Valeurs de référence obtenues dans la population de sujets-sains prélevés non à jeun. n = 14.

12. Comparaison du type de tube de prélèvement

Les résultats obtenus lors de la comparaison du type de tube de prélèvement sont repris dans la Figure 22. Les résultats bruts obtenus sur tubes héparinés sont disponibles en annexe 5. La différence entre ces 2 types de tubes est négligeable pour 7 molécules (quelques points discordants légèrement pour certaines molécules, mais concernant des faibles valeurs). Les résultats obtenus pour AA et 5HT sont par contre très discordants, avec une forte surestimation en tube hépariné. Il n'est donc pas possible d'accepter un tube hépariné à la place d'un tube EDTA. Une dérogation pourrait cependant être envisagée dans le cas d'un prélèvement précieux, mais sans rendu de résultat pour AA et 5HT.





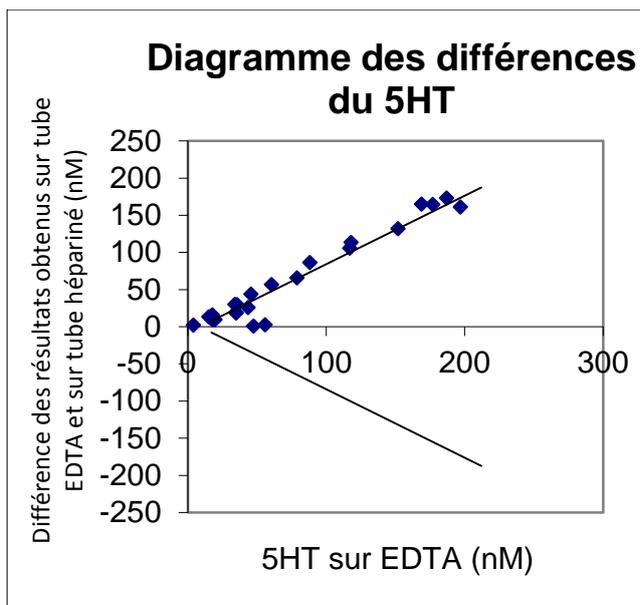


Figure 22 : Diagrammes de différences obtenus pour chaque molécule. Le cône représente l'écart limite toléré ($\pm 4,24$ écart-type du niveau considéré) avec utilisation de droites extrapolées. $n = 23$ pour le 5HT, $n=28$ pour les autres molécules. Lorsque les résultats obtenus étaient inférieurs à la limite de quantification (LOQ), la valeur obtenue a été remplacée par celle de la LOQ.

13. Variabilité intra-individuelle

Les résultats obtenus lors de l'essai de variabilité intra-individuelle sont synthétisés dans le Tableau XVIII. Les tables de Ricos (182) proposent une variabilité intra-individuelle de 22,7 % pour le Trp, 10,5% pour la Tyr et 6,6% pour la Phe. Notre variabilité intra-individuelle est donc acceptable pour ces 3 paramètres, et nous pouvons prendre comme référence la valeur proposée pour le Trp pour l'ensemble des molécules de sa voie métabolique. Une très forte variabilité est observée pour le 5HT, due à la possible activation des plaquettes lors des phases pré-analytique ou de prélèvement (le 5HT étant environ 100 fois plus concentré dans les plaquettes) (183). Nous notons également une différence significative pour AK, AA et XA, qui serait à documenter sur un plus grand nombre de sujets. La variabilité intra-individuelle est donc non acceptable pour le 5HT, à investiguer plus amplement pour AK, AA et XA, et en accord avec les tables de Ricos pour les autres molécules.

Molécule	Moyenne	CV (%)
3HK	26 nM	11 %
KYN	1,8 µM	5 %
5HTP	3,9 nM	19 %
5HT	10 nM	113 %
Trp	54 µM	7 %
AK	42 nM	25 %
3HA	15 nM	10 %
AA	32 nM	42 %
XA	13 nM	37 %
Phe	57 µM	10 %
Tyr	69 µM	12 %

Tableau XVIII : Résultats obtenus lors de l'essai de variabilité intra-individuelle sur 3 jours (n=1).

14. Variabilité inter-opérateur

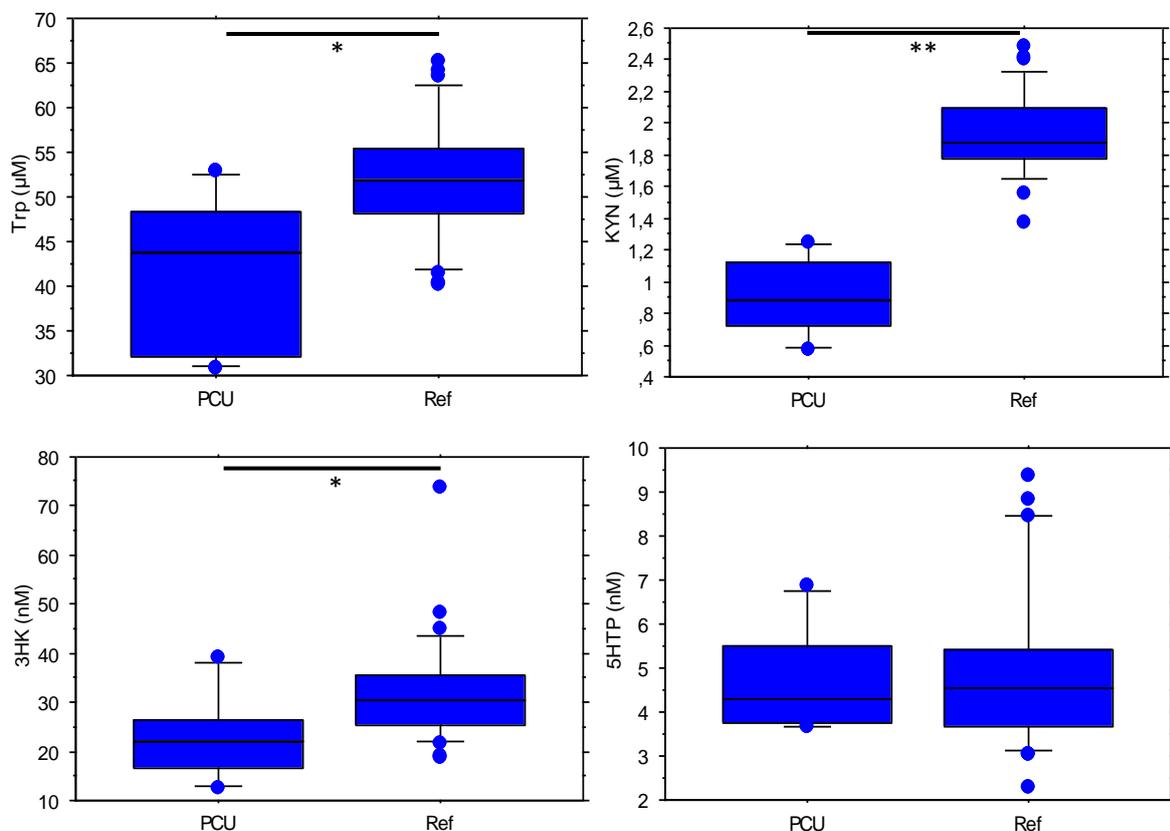
La variabilité inter-opérateur est rapportée dans le Tableau XIX. Aucune différence significative n'est observée concernant la cible attendue (écart maximum de 12%) ou le coefficient de variation (données non présentées, maximum 7% de différence entre les 2 opérateurs). A noter que l'intégration a toujours été réalisée par l'opérateur 2. La variabilité inter-opérateur est négligeable, mais il serait judicieux de confirmer ces résultats sur un plus grand nombre d'échantillons.

Molécule	Niveau 1			Niveau 2		
	Opérateur 1 (n=11)	Opérateur 2 (n=8)	Différence (%)	Opérateur 2 (n=8)	Opérateur 2 (n=8)	Différence (%)
3HK (moyenne en nM)	15	17	10	30	30	1
KYN (moyenne en μ M)	1,3	1,4	6	2,4	2,4	0
5HTP (moyenne en nM)	12	13	8	25	24	6
5HT (moyenne en nM)	17	17	3	31	33	7
Trp (moyenne en μ M)	46	47	3	86	88	2
AK (moyenne en nM)	20	20	1	37	38	1
3HA (moyenne en nM)	15	17	7	29	30	4
AA (moyenne en nM)	11	11	6	20	20	1
XA (moyenne en nM)	14	16	12	21	21	1

Tableau XIX : Variabilité inter-opérateur (n=19 CIQ pour chaque niveau).

Chapitre 2 : Modifications du métabolisme du Trp dans une population phénylcétonurique

Nos 9 molécules ont été mesurées dans notre population de patients phénylcétonuriques (n=8, dont 2 enfants). Les résultats bruts sont disponibles en annexe 6. Notre population d'étude étant en nombre réduit et possédant une hétérogénéité non négligeable, nous avons choisi d'étudier statistiquement uniquement les patients PCU adultes. La Figure 23 représente les concentrations obtenues pour ces 6 patients ainsi que pour notre population de référence. Plusieurs molécules possèdent des concentrations différentes dans ces 2 populations. Tout d'abord, le 5HT possède une concentration inférieure à notre limite de quantification dans notre population PCU (aucune statistique n'a donc pu être réalisée). Ensuite, le 3HK, la KYN et le Trp possèdent des concentrations significativement diminuées par rapport à notre population de référence (p-value < 0,05). Les autres molécules dosées ne présentent pas de différence significative entre nos 2 groupes.



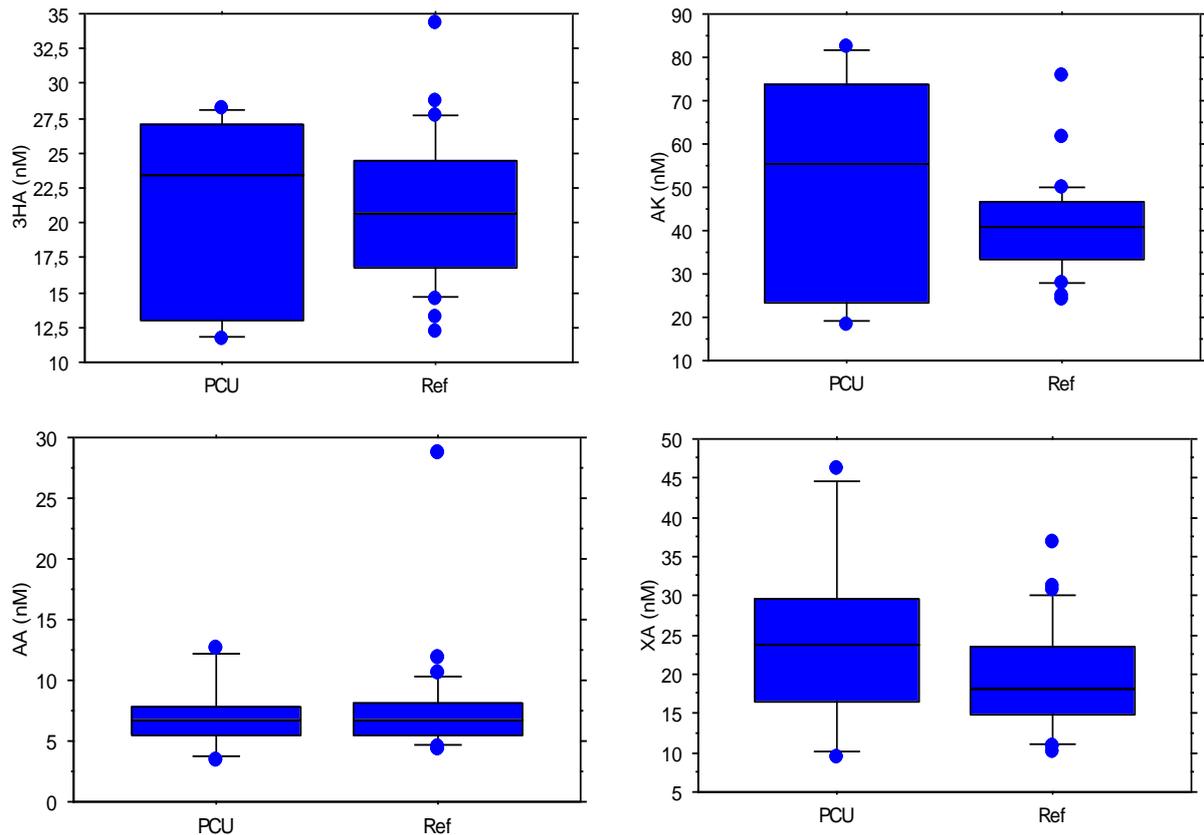


Figure 23 : Différence de concentrations dans notre population de patients PCU adultes (n=6) par rapport à notre population de référence (n=30) pour 8 de nos molécules. Dans le cas du 5HTP, il s'agit d'une différence approximative, 1 sujet ayant une concentration < limite de quantification dont la valeur a été remplacée par 2,3 nM pour le calcul. Les p-values sont indiquées lorsque significatives, avec un seuil < 0,05 (*) ou < 0,01 (**).

En ce qui concerne nos 2 patients PCU enfants, EY, le patient le plus jeune (3,5 ans), possède des concentrations élevées pour chaque molécule hormis la sérotonine. La patiente la plus âgée, DL, 17 ans, possède, elle, des concentrations globalement comparables à celles de nos patients PCU adultes.

Les résultats obtenus lors du dosage de la Phe et de la Tyr sont synthétisés en annexe 6. La Figure 24 en est une représentation graphique par rapport aux valeurs de référence du laboratoire. D'une manière globale, nous pouvons observer une hyperphénylalaninémie chez tous les patients. Les résultats obtenus pour la Tyr montrent une tendance à la carence en tyrosine, 2 patients seulement ayant des taux physiologiques. Nous reviendrons dans la discussion sur les résultats obtenus pour l'enfant EY.

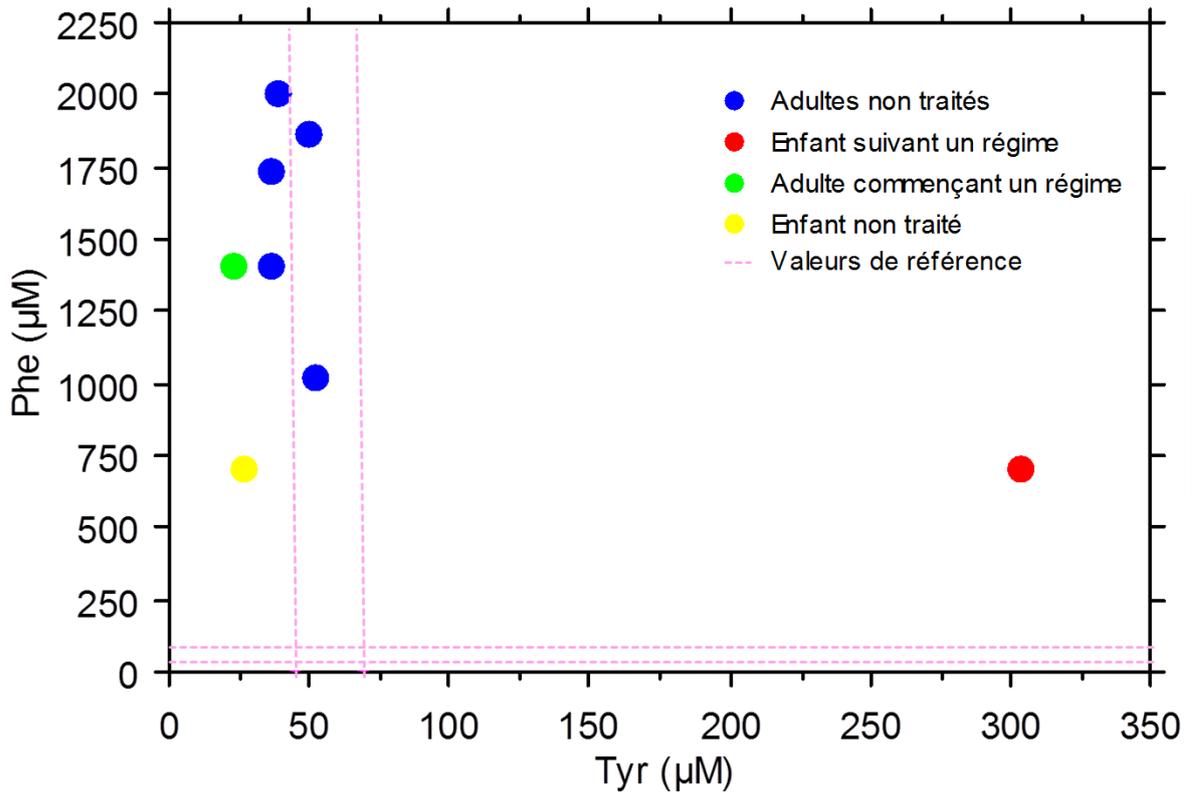


Figure 24 : Concentrations plasmatiques en phénylalanine (Phe) et en tyrosine (Tyr) retrouvées dans notre population PCU lors du prélèvement pour l'analyse de la voie du Trp.

Pour ce qui est des facteurs confondant de la voie du Trp, il est à noter qu'un patient adulte (PM) possède 2 facteurs : un surpoids ainsi qu'une infection par le VIH, ce qui est connu pour activer la voie des kynurénines (184) et l'IDO (185). Les autres patients possèdent des IMC dans la norme. Aucune carence en vitamine B1 ou B6 n'a été démontrée chez nos patients.

Les résultats obtenus montrent donc une diminution significative des concentrations sanguines de Trp, KYN et 3HK chez nos patients adultes PCU, et ce en l'absence de facteurs confondants.

Partie 4 : Discussion

Chapitre 1 : Méthode analytique

1. Maitrise des risques

Ce dosage possède plusieurs étapes critiques, pendant lesquelles une erreur peut survenir, avec des conséquences non négligeables sur les résultats obtenus. Nous nous sommes donc interrogés sur ces risques, afin de modifier si nécessaire nos pratiques. Nous avons volontairement laissé de côté tous les risques inhérents à la prise en charge en routine du patient (identitovigilance au CHU, circuit du prélèvement par la réception centralisée des prélèvements...), cette méthode étant pour l'instant utilisée uniquement à but de recherche (parcours de prélèvement adapté). Les risques identifiés, ainsi que la pratique mise en place afin de les maîtriser sont synthétisés dans le Tableau XX. L'échelle de criticité a été évaluée selon la procédure actuellement en vigueur au laboratoire (cf annexe 7).

5 M	Points critiques	Echelle de criticité : Fréquence / Gravité	Éléments à maîtriser	Moyen de maîtrise
Matière (échantillons)	Patient	3/4	Jeun	Non-conformité si patient non à jeun
	Type de contenant	2/4	Tube EDTA	Non-conformité si autre tube
	Délai et température avant traitement analytique	4/4	Acheminement < 30 min réfrigéré	Non-conformité si délai > 1h (ou 30 min à température ambiante)
	Prétraitement	1/1	Centrifugation ≥ 2500 g pendant ≥ 10 min pour obtenir plasma pauvre en plaquettes	Protocole de centrifugation : 2500 g pendant 15 min
	Interférences	3/4	Hémolyse et lipémie	Non-conformité si prélèvement hémolysé ou lipémique
Milieu	Conditions de conservation des échantillons et des réactifs	2/4	Conservation des échantillons et des solutions à -75°C +/- 15°C Conservation des réactifs selon recommandations fournisseur	Formation du personnel Métrologie du laboratoire (BIOMEDBIO.PRO.005) Etude de stabilité
Matériel	Qualité de l'eau et des solvants	2/2	Eau de qualité milliQ, solvants de grade analytique	Contrôle de l'eau par laboratoire accrédité COFRAC, achat de solvant de qualité analytique
	Surveillance des dérives de l'HPLC-MS/MS	2/2	Maîtrise du bon fonctionnement de l'HPLC-MS/MS	Maintenance fournisseur et équipe technique (PLATSPM.PRO.003) Suivi des CIQ et CEQ
	Surveillance du vieillissement de la colonne et pré-colonne	2/1	Changement de la colonne et/ou pré-colonne lorsque celle-ci vieillit	Surveillance de l'aspect des pics et changement du matériel lorsque celui-ci se dégrade
	Réalisation de la gamme	3/2	Justesse des solutions utilisées	Suivi des CIQ et CEQ Métrologie des pipettes et des balances (BIOMEDBIO.PRO.001)
Méthode	Limites de la méthode	NA	Limites de détection, de quantification, linéarité etc...	Processus de validation de méthode
	Causes d'incertitudes de mesure	NA	Calcul des incertitudes de mesures	Applicable seulement pour Trp et 5HT. Besoin de CEQ ou d'échanges inter-laboratoire pour les autres molécules
	Réalisation de la gamme	5/1	Fiabilité des gammes utilisées	Diminution du nombre de prises d'essai à mettre en place
Main d'oeuvre	Compétence et maintien de compétence du personnel	NA	Formation et habilitation du personnel	A mettre en place

Tableau XX : Risques potentiels inhérents au dosage des métabolites du Trp et pratiques mises en place pour les maîtriser. Adapté de (177). Echelle de criticité selon la procédure en vigueur au laboratoire (cf annexe7), allant de 1 à 5.

Parmi les points clés non entièrement maîtrisés, nous pouvons noter l'absence d'évaluation de la justesse et de l'exactitude pour 7 de nos molécules. Ceci peut s'expliquer par l'aspect novateur de ce dosage. En effet, pour ces 7 molécules, aucun CEQ ou solution titrée précisément n'est commercialisé à l'heure actuelle, et nous ne connaissons aucun laboratoire réalisant ce dosage pour mettre en place des CIQ externalisés. De plus, aucun autre moyen n'est à notre disposition pour titrer avec précision les solutions de standards (spectrophotométrie pas toujours documentée, et de précision non satisfaisante). Notre seul pare-feu réside dans le suivi de nos CIQ lors du changement de lot de standard, permettant de s'assurer d'une reconstitution correcte. De plus, il est à noter que nos valeurs de références ayant été calculées selon cette méthodologie (et globalement conformes à la littérature), un léger biais de nos résultats du à nos standards n'entraînerait pas d'erreur d'interprétation.

Le deuxième point critique est la stabilité des solutions utilisées pour réaliser les gammes. Afin d'éviter un biais, nous n'utilisons les solutions que pendant un temps donné, pour lequel la stabilité a été prouvée par le suivi de la pente de la gamme. Ainsi, à l'heure actuelle, elle n'est que de 4,5 mois pour l'ensemble des molécules, mais pourrait éventuellement être étendue en fonction de la continuité des tests. De plus, la stabilité des CIQ est également à étendre, d'une part pour une analyse de stabilité plus fine (nous comparons ici un CV obtenu sur un laps de temps de 4,5 mois à un CV fait sur 3,5 mois), et d'autre part pour une utilisation optimale.

Un troisième point concerne la réalisation du mélange de solutions utilisé lors de la réalisation de la gamme. Ce mélange, préparé à chaque manipulation, comprend de nombreuses prises d'essai, ce qui entraîne d'une part une augmentation de l'incertitude de mesure, mais également une source d'erreur humaine non négligeable. Bien que l'erreur soit maîtrisée par l'utilisation des CIQ, le risque est une perte d'échantillon ainsi qu'une perte de temps. Nous envisageons donc de congeler directement un ou plusieurs mélanges de ces solutions, afin de

diminuer le risque d'erreur possible. Ces mélanges seront mis en place en fonction de la stabilité des analytes en solution, afin d'éviter une surconsommation des poudres d'analytes stables.

Enfin, un dernier point important qui devra être mis en place est la formation et l'habilitation de l'équipe technique et biologique. En effet, nous ne sommes actuellement que 2 à savoir réaliser la manipulation et il serait souhaitable d'augmenter le pool technique en fonction des demandes. Pour cela, une procédure détaillée et une fiche d'habilitation au format qualité devront être rédigées, et une formation mise en place.

Les autres risques sont globalement bien maîtrisés, cela en particulier grâce à l'utilisation de matériel et des locaux du CHU qui bénéficient déjà d'une démarche transversale de qualité.

2. Paramètres de validation de méthode

Nous présentons dans ce travail la méthode que nous avons mise au point et validée. De nombreux essais préliminaires ont été effectués, que ce soit concernant les phases pré-analytique ou analytique, la phase la plus difficile de cette mise au point étant la phase pré-analytique. Nous avons testé plusieurs méthodes de déprotéinisation, notamment celles rapportées dans la littérature utilisant du MeOH, du TCA, ou de l'acide perchlorique. Nous avons également testé une déprotéinisation par acide sulfosalicylique, utilisée lors du dosage des acides aminés au laboratoire, et une méthode d'extraction liquide-liquide. Enfin, nous avons essayé 3 SPE : la HLB (mode mixte hydrophile-lipophile) et la MCX (mode mixte d'échange de cations) de Waters, ainsi que la SLE (extraction liquide simplifiée) de Phénomenex. Parmi toutes les méthodes testées, seules 2 permettaient une quantification de toutes nos molécules selon nos conditions analytiques et pré-analytiques : la déprotéinisation par MeOH + TFA et la SPE HLB. Devant le coût non négligeable des cartouches SPE (2€ par échantillon) et la simplicité d'une déprotéinisation, nous avons choisi la méthode MeOH + TFA. Cependant, lors de la validation de méthode, un encrassement inhabituel du spectromètre de masse a été mis en évidence, et nous avons préféré modifier notre procédure pré-

analytique pour une méthode plus efficace. Nous avons donc utilisé la SPE HLB et avons recommencé la validation de méthode. Celle-ci nous a cette fois permis de mettre en évidence un problème majeur: un manque de reproductibilité de cette technique d'extraction. Bien que ce paramètre soit maîtrisé par l'ajout de SI, la sensibilité analytique ne nous permettait pas de quantifier toutes nos molécules (notamment le 3HK) lorsque l'efficacité de l'extraction était faible. Ces données ont été présentées précédemment (186). Nous avons également comparé plusieurs colonnes analytiques (notamment une Poroshell d'Agilent et une Alltima de Fischer) avant de faire notre choix pour une Atlantis T3 de Waters. L'ensemble de nos composés étant polaires et possédant tous des pKa et pKb différents, l'utilisation d'une colonne C18 était la plus judicieuse.

Un changement d'appareillage (passage d'un API 3000 couplé à une HPLC Agilent 1100 à un API 4000 couplé à une HPLC Dionex Ultimate 3000) nous a alors ouvert de nouvelles perspectives : celles de la SPE en ligne (i.e. intégrée à l'HPLC). Cette technique possède deux avantages non négligeables : une partie du pré-analytique est automatisée, entraînant une facilité d'utilisation et un gain de temps technique (simple déprotéinisation en amont), mais également une extraction reproductible. Deux colonnes SPE en ligne ont été testées : la Poros de ThermoFischer et la HLB de Waters. La Poros ne nous a donné aucune satisfaction, la plupart de nos molécules n'étant pas retenues sur la phase solide. La HLB par contre était fort intéressante, mais malgré bon nombre d'essais, nous n'avons pas réussi à mettre au point cette méthode. En effet, l'ajout d'une HLB en ligne à notre colonne analytique de type C18 était incompatible avec nos phases mobiles et nos 9 molécules. La déprotéinisation simple par MeOH + TFA était donc la méthode pré-analytique à retenir. L'ajout de sulfate de Zn au mélange déprotéinisant a apporté un gain quant à la pureté du surnageant sans compromettre l'efficacité de notre analyse. Enfin, le changement d'HPLC a entraîné la possibilité de monter en pression (jusqu'à 400 bars sans difficultés), permettant l'utilisation de colonnes analytiques dites à noyaux durs. Cette technologie permet d'une part de gagner en résolution (et donc d'abaisser nos limites de quantification), et d'autre part de diminuer notre temps d'analyse. Nous avons ainsi abandonné l'Atlantis T3 au profit d'une Kinetex.

La faisabilité de la méthode ainsi mise au point est tout à fait adaptée : le temps technique d'une série est estimé à environ 1h, comprenant uniquement des gestes simples (dilution ou prise d'essai et centrifugation), contrairement aux méthodes SPE (61). La performance de notre technique, qui dépend du pré-analytique mais également de l'appareillage utilisé et des paramètres HPLC-MS/MS choisis, répond à notre besoin clinico-biologique.

Concernant la répétabilité et la fidélité intermédiaire, les résultats obtenus sont globalement comparables à ceux issus de la littérature pour une méthode en multiplexage (2,61,64,85). Ils sont également satisfaisants selon les critères de la FDA (180). Nos limites de quantification sont en revanche globalement plus élevées que celles décrites par ces mêmes auteurs, et nos limites de linéarité haute sont plus faibles. Concernant le Trp, notre LOQ et notre LL sont particulièrement plus élevées que la plupart des publications, ce qui s'explique par le split mis en place. Nos différentes linéarités sont donc moins étendues, mais sont réfléchies par rapport aux analyses que nous envisageons. En effet, nos linéarités sont suffisantes pour nous permettre une quantification dans le plasma humain en un seul run de nos 9 molécules, contrairement à d'autres auteurs qui sont systématiquement obligés de diluer leurs échantillons afin de quantifier le Trp (2).

Concernant l'effet matrice de toutes nos molécules hormis le 5HTP, nos résultats sont soit comparables (2,61,82) soit meilleurs (64,85) que ceux précédemment publiés. Les résultats de l'effet matrice et de l'efficacité d'extraction obtenus pour le 5HTP sont en revanche moins bons que ceux de la littérature (2,76), ce qui s'explique aisément par l'absence de SI adéquat dans notre méthode. Ces résultats ne sont cependant pas rédhibitoires : ils nous imposent seulement de continuer à utiliser une gamme plasmatique traitée dans les mêmes conditions que nos échantillons.

Nos valeurs de référence obtenues sur nos sujets-sains à jeun sont comparables à celles de la littérature (2,64,187,188), bien que nos valeurs de Trp soient plus faibles (les valeurs de nos patients non à jeun se rapprochent plus de ce qui est décrit dans la littérature).

La stabilité des molécules dans le sang total est concordante avec la littérature pour AA (189), mais contrairement à cet auteur, nous n'avons constaté aucune diminution de 3HK et de 3HA au cours du temps. L'augmentation du 5HTP observée dans le sang total pourrait éventuellement s'expliquer par un relargage plaquettaire, comme c'est le cas pour le 5HT (190), ou par une légère dégradation du Trp. Deux autres auteurs se sont intéressés à la stabilité des analytes dans la matrice d'injection (61,82), montrant peu de différence au cours du temps (maximum 48h). Ces résultats sont difficilement transposables, les matrices étant différentes. Une autre étude montre une perte de plus de 50% de 3HK et de 3HA en 29 ans dans le sérum congelé à -25°C, tandis qu'une augmentation de 516% de AA est également visible (191). Ce type d'étude n'a pour l'instant pas été mis en place par notre équipe, mais il serait intéressant de le réaliser pour confronter nos résultats.

L'un des paramètres de validation de méthode essentiel et insuffisamment documenté à notre avis est l'exactitude. En effet, nous avons à notre disposition uniquement des données d'exactitude concernant le Trp et le 5HT. Les résultats obtenus pour ces 2 molécules sont conformes aux attentes des fournisseurs, mais une étude sur un plus grand nombre d'échantillons est nécessaire. Concernant les autres molécules, nous pouvons éliminer un biais majeur car nos valeurs de références sont globalement identiques à celles de la littérature. Cependant, un biais minime ne peut être exclu. Bien que l'impact d'un possible biais soit minimisé par l'utilisation de valeurs de référence élaborées dans les mêmes conditions que nos échantillons, nous souhaitons connaître précisément ce biais s'il existe. Cette démarche se heurte à l'absence d'EEQ ou de CIQ externalisés pour nos 7 molécules. Nous avons donc pris contact avec un autre auteur réalisant le dosage des molécules de la voie des kynurénines (M Midttun, Bergen, Norvège) afin de réaliser un échange de CIQ externalisé.

Concernant la sérotonine, certaines données importantes nous manquent encore, comme par exemple la stabilité de cet analyte dans le sang total. L'utilité du dosage de la sérotonine plasmatique est cependant à discuter : en effet, nous avons vu que la variabilité intra- et inter-

individuelle est non négligeable. De plus, le dosage de 5HT dans le sang total est principalement le reflet du 5HT plaquettaire (190,192). Ainsi, une activation plaquettaire lors du prélèvement ou en amont de la centrifugation entraîne un relargage de 5HT dans le plasma, faussant alors la mesure plasmatique. Devant ces différentes sources de variabilité et bien que mise au point par ce travail, nous ne recommandons pas la quantification du 5HT dans le plasma.

Notre méthode est donc conforme à nos attentes clinico-biologique selon le protocole pré-analytique utilisé. La méthode est validée selon les recommandations COFRAC (177) relatives à la norme NF EN ISO 15189 des examens de biologie médicale (178). Nous envisageons cependant plusieurs améliorations, en particulier l'allongement des tests de stabilité (standards et CQI) afin de permettre une utilisation prolongée de ceux-ci, et la diminution du nombre de prises d'essais lors de la réalisation de la gamme. L'étude de l'exactitude de notre dosage est également une de nos priorités, et l'échange inter-laboratoire qui se met actuellement en place permettra de répondre à cette dernière question.

Chapitre 2 : Modifications du métabolisme du Trp dans une population phénylcétonurique

Cette étude possède plusieurs limites. Tout d'abord, le nombre de patients ayant pour l'instant été recruté est faible (8). Parmi ceux-ci, une grande hétérogénéité est visible, et plusieurs groupes pourraient être envisagés : les patients qui suivent un régime et ceux n'en suivant pas, des stratifications en fonction de l'âge, ou encore des groupes en fonction des mutations identifiées. Lors de cette étude, le faible recrutement ne nous a pas permis de regarder les modifications de la voie du Trp dans la population infantile, et aucun adulte suivant un régime de longue date n'a pu être inclus. De plus, aucune valeur de référence n'a été établie dans la population pédiatrique.

L'autre limite de cette étude est la nature de l'échantillon. En effet, afin de s'intéresser à la physiopathologie des atteintes neurologiques visibles dans la PCU, l'échantillon le plus judicieux serait le LCR. De même, il serait intéressant d'ajouter le dosage de QA à cette méthode, car cette molécule est le métabolite le plus neurotoxique connu de la voie du Trp.

Malgré ces différentes limites, nous avons cependant pu mettre en évidence une diminution significative des concentrations plasmatiques de Trp, KYN et 3HK dans la population phénylcétonurique adulte. Concernant l'enfant EY, les résultats obtenus se rapprochent plus de la population de référence que de nos patients adultes, ce qui est logique étant donné qu'il suit un régime alimentaire. Par contre, cet enfant possède lors de ce prélèvement une concentration de Phe anormale par rapport à son régime et aux recommandations. Le prélèvement, initialement prévu à 9h, a finalement été réalisé vers midi, ce qui nous incite à douter de l'état de jeun. Un prélèvement de contrôle est donc impératif avant d'inclure ce patient dans les statistiques de cette étude. Les dosages obtenus pour l'enfant DL sont eux comparables à ceux de la population PCU adulte non traitée. L'hyperphénylalaninémie observée dans cette population s'explique par l'absence de régime PCU. Concernant l'adulte suivant un régime PCU, il est à noter que ce régime venait d'être mis en place (femme ayant un désir de grossesse), il n'est donc pas aberrant que son taux de Phe soit

encore élevé (elle a par ailleurs normalisé ce taux dans les semaines suivantes). Enfin, une tendance à l'hypotyrosinémie est observée chez nos patients, ce qui peut s'expliquer par le fait qu'aucun de ces patients adultes ne prend de substitut d'acides aminés. En effet, parmi les 4 patients adultes suivis régulièrement par la diététicienne s'occupant des patients phénylcétonuriques adultes du CHU, seulement un (BB) possède des apports protéiques journaliers à 42 g/j, soit légèrement inférieurs à l'apport normoprotidique pour l'âge (entre 50 et 80 g/j). Les autres patients possèdent des apports normoprotidiques, permettant donc l'arrêt des substituts d'acides aminés.

Deux hypothèses peuvent être avancées pour expliquer ces diminutions significatives de concentration plasmatique de Trp, KYN et 3HK dans la population phénylcétonurique adulte : une diminution de la quantité de Trp atteignant le flux sanguin, ou une augmentation de son catabolisme. En effet, une diminution de la concentration de Trp circulant retentirait sur toutes les molécules de sa voie métabolique, permettant d'expliquer la diminution significative des concentrations de certaines molécules dans la population PCU de notre étude. Une des pistes à explorer pour expliquer ce phénomène serait une diminution de l'absorption intestinale de Trp par LAT1, dont le mécanisme d'action est identique au transporteur de la BHE. L'autre hypothèse consiste en une augmentation du catabolisme de cette voie, ce qui pourrait être exploré par le dosage des métabolites terminaux dans le sang, mais également par des dosages dans les matrices d'excrétion telle que l'urine.

Afin d'explorer plus amplement cette voie métabolique dans la PCU, il est donc essentiel d'augmenter notre recrutement. Par ailleurs, l'exploration de ces métabolites dans le LCR permettrait d'étayer les hypothèses physiopathologiques, ces études pouvant être envisagées chez la souris PCU ENU^2/ENU^2 (144). La mise en point du dosage de QA serait également judicieuse.

Il nous paraît également important de souligner que ce dosage pourrait être utilisé dans l'exploration d'autres pathologies héréditaires du métabolisme, comme l'acidurie glutarique de type I ou les déficits de la neurotransmission. Enfin, si cette voie métabolique possède un intérêt

dans le suivi des patients PCU, une mise au point de ce dosage à partir d'un papier Guthrie sera à envisager afin d'apporter un confort non négligeable aux patients.

THESE SOUTENUE PAR : Mme Lysiane BOULET-LE GOUAR

TITRE :

MISE AU POINT DU DOSAGE SANGUIN DES METABOLITES DE LA VOIE DU TRYPTOPHANE EN HPLC-MS/MS ET PERSPECTIVES DANS LE SUIVI BIOLOGIQUE DES PATIENTS ATTEINTS DE PHENYLCETONURIE.

CONCLUSION :

Nous avons mis au point en HPLC-MS/MS une méthode de dosage du tryptophane et de 8 de ses métabolites, en seulement 15 minutes. Le travail de validation de méthode selon la norme NF EN ISO 15189 a permis de démontrer la robustesse et la fiabilité de ce dosage, permettant ainsi au CHU de Grenoble de proposer cette analyse aux cliniciens.

Nous avons développé lors de ce travail les éléments rapprochant la phénylcétonurie et la voie métabolique du tryptophane, afin d'en souligner les possibles interactions physiopathologiques. Grâce à l'analyse mise au point, nous avons dosé ces 9 molécules dans un groupe de patients phénylcétonuriques. Nous avons ainsi mis en évidence des modifications du catabolisme du tryptophane dans le sang périphérique des adultes phénylcétonuriques non traités par rapport à une population de référence, avec une diminution significative des concentrations plasmatiques du tryptophane, de la kynurénine et de la 3-hydroxykynurénine dans notre groupe d'étude.

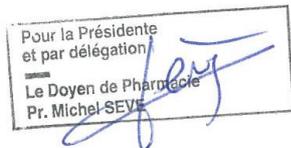
L'étude des modifications de cette voie reste cependant à explorer plus largement dans la phénylcétonurie, mais également dans d'autres pathologies, qu'elles soient innées (comme l'acidurie glutarique de type I) ou acquises (comme les pathologies cardiovasculaires par exemple). Dans la phénylcétonurie, cette exploration nécessite un recrutement plus important de patients, et un travail sur d'autres milieux biologiques, plus à même de répondre aux interrogations physiopathologiques. Cela contribuerait de plus à investiguer l'impact de nouvelles thérapies comme celle par L-acides aminés neutres. Nous espérons ainsi comprendre plus amplement l'implication du catabolisme du

tryptophane, que ce soit via la voie des kynurénines ou celle de la sérotonine, dans les symptômes neurologiques des patients phénylcétonuriques.

VU ET PERMIS D'IMPRIMER

Grenoble, le : 01/09/2016

LE DOYEN



Pr. Michel SEVE

LE PRESIDENT DE LA THESE

Département de Biochimie,
Toxicologie et Pharmacologie
Responsable Pr Patrice FAURE
Pôle de Biologie - CHU de Grenoble
CS 10217 - 38043 GRENOBLE CEDEX 9
Tel. 04 76 76 54 84 - Tel. 04 76 76 56 64

Pr Patrice FAURE

Bibliographie

1. Groupe de travail pour l'Agence Française de Sécurité Sanitaire des Aliments. Apport en protéines : consommation, qualité, besoins et recommandations. 2007.
2. Hényková E, Vránová HP, Amakorová P, Pospíšil T, Žukauskaitė A, Vlčková M, et al. Stable isotope dilution ultra-high performance liquid chromatography–tandem mass spectrometry quantitative profiling of tryptophan-related neuroactive substances in human serum and cerebrospinal fluid. *J Chromatogr A*. mars 2016;1437:145-57.
3. King NJC, Thomas SR. Molecules in focus: Indoleamine 2,3-dioxygenase. *Int J Biochem Cell Biol*. 2007;39(12):2167-72.
4. Metz R, Duhadaway JB, Kamasani U, Laury-Kleintop L, Muller AJ, Prendergast GC. Novel tryptophan catabolic enzyme IDO2 is the preferred biochemical target of the antitumor indoleamine 2,3-dioxygenase inhibitory compound D-1-methyl-tryptophan. *Cancer Res*. 1 août 2007;67(15):7082-7.
5. Kema IP, de Vries EG, Muskiet FA. Clinical chemistry of serotonin and metabolites. *J Chromatogr B Biomed Sci App*. 29 sept 2000;747(1-2):33-48.
6. Reiter RJ. Melatonin: the chemical expression of darkness. *Mol Cell Endocrinol*. août 1991;79(1-3):C153-8.
7. Keszthelyi D, Troost FJ, Masclee A. Understanding the role of tryptophan and serotonin metabolism in gastrointestinal function. *Neurogastroenterol Motil*. déc 2009;21(12):1239-49.
8. Niinisalo P, Raitala A, Pertovaara M, Oja SS, Lehtimäki T, Kähönen M, et al. Indoleamine 2,3-dioxygenase activity associates with cardiovascular risk factors: The Health 2000 study. *Scand J Clin Lab Invest*. janv 2008;68(8):767-70.
9. Reyes Ocampo J, Lugo Huitrón R, González-Esquivel D, Ugalde-Muñiz P, Jiménez-Anguiano A, Pineda B, et al. Kynurenines with Neuroactive and Redox Properties: Relevance to Aging and Brain Diseases. *Oxid Med Cell Longev*. 2014;2014:1-22.
10. Zhang Y, Shen J, He X, Zhang K, Wu S, Xiao B, et al. A Rare Variant at the KYNU Gene Is Associated With Kynureninase Activity and Essential Hypertension in the Han Chinese Population. *Circ Cardiovasc Genet*. 1 déc 2011;4(6):687-94.
11. Boulet L, Flore P, Le Gouellec A, Toussaint B, Pépin JL, Faure P. Is tryptophan metabolism involved in sleep apnea-related cardiovascular co-morbidities and cancer progression? *Med Hypotheses*. oct 2015;85(4):415-23.
12. Mangge H, Summers KL, Meinitzer A, Zelzer S, Almer G, Prassl R, et al. Obesity-related dysregulation of the Tryptophan-Kynurenine metabolism: Role of age and parameters of the metabolic syndrome: Tryptophan Metabolism and Inflammation in Obesity. *J Obes*. janv 2014;22(1):195-201.

13. Wirleitner B, Rudzite V, Neurauter G, Murr C, Kalnins U, Erglis A, et al. Immune activation and degradation of tryptophan in coronary heart disease. *Eur J Clin Invest.* 2003;33(7):550–4.
14. Sulo G, Vollset SE, Nygård O, Midttun Ø, Ueland PM, Eussen SJPM, et al. Neopterin and kynurenine–tryptophan ratio as predictors of coronary events in older adults, the Hordaland Health Study. *Int J Cardiol.* sept 2013;168(2):1435-40.
15. Pertovaara M, Raitala A, Juonala M, Lehtimäki T, Huhtala H, Oja SS, et al. Indoleamine 2,3-dioxygenase enzyme activity correlates with risk factors for atherosclerosis: the Cardiovascular Risk in Young Finns Study: Indoleamine 2,3-dioxygenase and atherosclerosis. *Clin Exp Immunol.* 26 janv 2007;148(1):106-11.
16. Pawlak K, Myśliwiec M, Pawlak D. Kynurenine pathway – a new link between endothelial dysfunction and carotid atherosclerosis in chronic kidney disease patients. *Adv Med Sci.* déc 2010;55(2):196-203.
17. Mizutani K, Sugimoto K, Okuda T, Katsuya T, Miyata T, Tanabe T, et al. Kynureninase is a novel candidate gene for hypertension in spontaneously hypertensive rats. *Hypertens Res.* janv 2002;25(1):135-40.
18. Kwok JBJ, Kapoor R, Gotoda T, Iwamoto Y, Iizuka Y, Yamada N, et al. A Missense Mutation in Kynurenine Aminotransferase-1 in Spontaneously Hypertensive Rats. *J Biol Chem.* 27 sept 2002;277(39):35779-82.
19. Ristagno G, Latini R, Vaahersalo J, Masson S, Kurola J, Varpula T, et al. Early Activation of the Kynurenine Pathway Predicts Early Death and Long-term Outcome in Patients Resuscitated From Out-of-Hospital Cardiac Arrest. *J Am Heart Assoc.* 4 août 2014;3(4):e001094.
20. Munn DH, Zhou M, Attwood JT, Bondarev I, Conway SJ, Marshall B, et al. Prevention of allogeneic fetal rejection by tryptophan catabolism. *Science.* 21 août 1998;281(5380):1191-3.
21. Prendergast GC, Smith C, Thomas S, Mandik-Nayak L, Laury-Kleintop L, Metz R, et al. Indoleamine 2,3-dioxygenase pathways of pathogenic inflammation and immune escape in cancer. *Cancer Immunol Immunother.* juill 2014;63(7):721-35.
22. Frumento G, Rotondo R, Tonetti M, Damonte G, Benatti U, Ferrara GB. Tryptophan-derived Catabolites Are Responsible for Inhibition of T and Natural Killer Cell Proliferation Induced by Indoleamine 2,3-Dioxygenase. *J Exp Med.* 19 août 2002;196(4):459-68.
23. Murray IA, Patterson AD, Perdew GH. Aryl hydrocarbon receptor ligands in cancer: friend and foe. *Nat Rev Cancer.* déc 2014;14(12):801-14.
24. Halberg F. Chronobiology. *Annu Rev Physiol.* 1969;31:675-725.
25. Réus GZ, Jansen K, Titus S, Carvalho AF, Gabbay V, Quevedo J. Kynurenine pathway dysfunction in the pathophysiology and treatment of depression: Evidences from animal and human studies. *J Psychiatr Res.* sept 2015;68:316-28.
26. Campbell BM, Charych E, Lee AW, Möller T. Kynurenines in CNS disease: regulation by inflammatory cytokines. *Front Neurosci.* 2014;8:12.

27. Kegel, Bhat M, Skogh E, Samuelsson M, Lundberg K, Dahl M, et al. Imbalanced Kynurenine Pathway in Schizophrenia. *Int J Tryptophan Res.* sept 2014;15.
28. Lim CK, Essa MM, de Paula Martins R, Lovejoy DB, Bilgin AA, Waly MI, et al. Altered kynurenine pathway metabolism in autism: Implication for immune-induced glutamatergic activity. *Autism Res.* juin 2016;9(6):621-31.
29. Darlington LG, Mackay GM, Forrest CM, Stoy N, George C, Stone TW. Altered kynurenine metabolism correlates with infarct volume in stroke: Tryptophan metabolism and stroke. *Eur J Neurosci.* 24 sept 2007;26(8):2211-21.
30. Gellért L, Fuzik J, Göblös A, Sárközi K, Marosi M, Kis Z, et al. Neuroprotection with a new kynurenic acid analog in the four-vessel occlusion model of ischemia. *Eur J Pharmacol.* 30 sept 2011;667(1-3):182-7.
31. Battaglia G, La Russa M, Bruno V, Arenare L, Ippolito R, Copani A, et al. Systemically administered D-glucose conjugates of 7-chlorokynurenic acid are centrally available and exert anticonvulsant activity in rodents. *Brain Res.* 31 mars 2000;860(1-2):149-56.
32. Vécsei L, Szalárdy L, Fülöp F, Toldi J. Kynurenines in the CNS: recent advances and new questions. *Nat Rev Drug Discov.* 14 déc 2012;12(1):64-82.
33. Dwarkasing JT, Witkamp RF, Boekschoten MV, Ter Laak MC, Heins MS, van Norren K. Increased hypothalamic serotonin turnover in inflammation-induced anorexia. *BMC Neurosci.* 2016;17(1):26.
34. Craske MG, Stein MB. Anxiety. *Lancet.* 24 juin 2016;
35. Zhang K, Zhu Y, Zhu Y, Wu S, Liu H, Zhang W, et al. Molecular, Functional, and Structural Imaging of Major Depressive Disorder. *Neurosci Bull.* juin 2016;32(3):273-85.
36. Berger M, Gray JA, Roth BL. The Expanded Biology of Serotonin. *Annu Rev Med.* févr 2009;60(1):355-66.
37. Chakraborti B, Verma D, Karmakar A, Jaiswal P, Sanyal A, Paul D, et al. Genetic variants of MAOB affect serotonin level and specific behavioral attributes to increase autism spectrum disorder (ASD) susceptibility in males. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry.* nov 2016;71:123-36.
38. Marcinkiewicz CA, Lowery-Gionta EG, Kash TL. Serotonin's Complex Role in Alcoholism: Implications for Treatment and Future Research. *Alcohol Clin Exp Res.* juin 2016;40(6):1192-201.
39. Hooten WM. Chronic Pain and Mental Health Disorders: Shared Neural Mechanisms, Epidemiology, and Treatment. *Mayo Clin Proc.* juill 2016;91(7):955-70.
40. Comai S, Bertazzo A, Vachon J, Daigle M, Toupin J, Côté G, et al. Tryptophan via serotonin/kynurenine pathways abnormalities in a large cohort of aggressive inmates: markers for aggression. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry.* oct 2016;70:8-16.
41. De Deurwaerdère P, Di Giovanni G. Serotonergic modulation of the activity of mesencephalic dopaminergic systems: Therapeutic implications. *Prog Neurobiol.* 22 mars 2016;

42. Hardeland R. Neurobiology, pathophysiology, and treatment of melatonin deficiency and dysfunction. *ScientificWorldJournal*. 2012;2012:640389.
43. de Herder WW. Biochemistry of neuroendocrine tumours. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab*. mars 2007;21(1):33-41.
44. Walther DJ, Peter J-U, Bashammakh S, Hörtnagl H, Voits M, Fink H, et al. Synthesis of serotonin by a second tryptophan hydroxylase isoform. *Science*. 3 janv 2003;299(5603):76.
45. Mosienko V, Beis D, Pasqualetti M, Waider J, Matthes S, Qadri F, et al. Life without brain serotonin: Reevaluation of serotonin function with mice deficient in brain serotonin synthesis. *Behav Brain Res*. janv 2015;277:78-88.
46. Camargo SMR, Bockenbauer D, Kleta R. Aminoacidurias: clinical and molecular aspects. *Kidney Int*. 2008;73(8):918-925.
47. Marecos C, Ng J, Kurian MA. What is new for monoamine neurotransmitter disorders? *J Inherit Metab Dis*. juill 2014;37(4):619-26.
48. Brun L, Ngu LH, Keng WT, Ch'ng GS, Choy YS, Hwu WL, et al. Clinical and biochemical features of aromatic L-amino acid decarboxylase deficiency. *Neurology*. 6 juill 2010;75(1):64-71.
49. Cellini B, Montioli R, Oppici E, Voltattorni CB. Biochemical and computational approaches to improve the clinical treatment of dopa decarboxylase-related diseases: an overview. *Open Biochem J*. 2012;6:131-8.
50. Zschocke J, Hoffmann G. *Vademecum Metabolicum*. Milupa. 2005.
51. Christensen M, Duno M, Lund AM, Skovby F, Christensen E. Xanthurenic aciduria due to a mutation in KYNU encoding kynureninase. *J Inherit Metab Dis*. avr 2007;30(2):248-55.
52. Martin JR, Mellor CS, Fraser FC. Familial hypertryptophanemia in two siblings. *Clin Genet*. avr 1995;47(4):180-3.
53. Snedden W, Mellor CS, Martin JR. Familial hypertryptophanemia, tryptophanuria and indoleketonuria. *Clin Chim Acta Int J Clin Chem*. 15 juill 1983;131(3):247-56.
54. Clayton PT, Bridges NA, Atherton DJ, Milla PJ, Malone M, Bender DA. Pellagra with colitis due to a defect in tryptophan metabolism. *Eur J Pediatr*. mai 1991;150(7):498-502.
55. Salih MA, Bender DA, McCreanor GM. Lethal familial pellagra-like skin lesion associated with neurologic and developmental impairment and the development of cataracts. *Pediatrics*. nov 1985;76(5):787-93.
56. Kölker S, Garbade SF, Greenberg CR, Leonard JV, Saudubray J-M, Ribes A, et al. Natural History, Outcome, and Treatment Efficacy in Children and Adults with Glutaryl-CoA Dehydrogenase Deficiency. *Pediatr Res*. juin 2006;59(6):840-7.
57. Varadkar S, Surtees R. Glutaric aciduria type I and kynurenine pathway metabolites: a modified hypothesis. *J Inherit Metab Dis*. 2004;27(6):835-42.

58. Maciejak P, Szyndler J, Turzyńska D, Sobolewska A, Kołosowska K, Krząścik P, et al. Is the interaction between fatty acids and tryptophan responsible for the efficacy of a ketogenic diet in epilepsy? The new hypothesis of action. *Neuroscience*. janv 2016;313:130-48.
59. The Merck Index. twelfth edition.
60. Benoist J. Introduction au métabolisme des acides aminés. *DIU Maladies Héréditaires du Métabolisme 2014/2015*;
61. Möller M, Du Preez JL, Harvey BH. Development and validation of a single analytical method for the determination of tryptophan, and its kynurenine metabolites in rat plasma. *J Chromatogr B*. juin 2012;898:121-9.
62. Huang Y, Louie A, Yang Q, Massenkoff N, Xu C, Hunt PW, et al. A simple LC–MS/MS method for determination of kynurenine and tryptophan concentrations in human plasma from HIV-infected patients. *Bioanalysis*. juin 2013;5(11):1397-407.
63. de Jong WHA, Smit R, Bakker SJL, de Vries EGE, Kema IP. Plasma tryptophan, kynurenine and 3-hydroxykynurenine measurement using automated on-line solid-phase extraction HPLC–tandem mass spectrometry. *J Chromatogr B*. mars 2009;877(7):603-9.
64. Midttun Ø, Hustad S, Ueland PM. Quantitative profiling of biomarkers related to B-vitamin status, tryptophan metabolism and inflammation in human plasma by liquid chromatography/tandem mass spectrometry. *Rapid Commun Mass Spectrom*. 15 mai 2009;23(9):1371-9.
65. Yamada K, Miyazaki T, Shibata T, Hara N, Tsuchiya M. Simultaneous measurement of tryptophan and related compounds by liquid chromatography/electrospray ionization tandem mass spectrometry. *J Chromatogr B*. 1 mai 2008;867(1):57-61.
66. Kato A, Suzuki Y, Suda T, Suzuki M, Fujie M, Takita T, et al. Relationship between an increased serum kynurenine/tryptophan ratio and atherosclerotic parameters in hemodialysis patients: IDO activity and atherosclerosis in HD patients. *Hemodial Int*. oct 2010;14(4):418-24.
67. Orsatti L, Speziale R, Orsale MV, Caretti F, Veneziano M, Zini M, et al. A single-run liquid chromatography mass spectrometry method to quantify neuroactive kynurenine pathway metabolites in rat plasma. *J Pharm Biomed Anal*. 24 janv 2015;107:426-31.
68. Zhu W, Stevens AP, Dettmer K, Gottfried E, Hoves S, Kreutz M, et al. Quantitative profiling of tryptophan metabolites in serum, urine, and cell culture supernatants by liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *Anal Bioanal Chem*. déc 2011;401(10):3249-61.
69. Ohashi H, Iizuka H, Yoshihara S, Otani H, Kume M, Sadamoto K, et al. Determination of L-tryptophan and L-kynurenine in Human Serum by using LC-MS after Derivatization with (R)-DBD-PyNCS. *Int J Tryptophan Res*. juill 2013;9.
70. Notarangelo FM, Wu H-Q, Macherone A, Graham DR, Schwarcz R. Gas chromatography/tandem mass spectrometry detection of extracellular kynurenine and related metabolites in normal and lesioned rat brain. *Anal Biochem*. févr 2012;421(2):573-81.

71. Forrest CM, Mackay GM, Stoy N, Spiden SL, Taylor R, Stone TW, et al. Blood levels of kynurenines, interleukin-23 and soluble human leucocyte antigen-G at different stages of Huntington's disease. *J Neurochem.* janv 2010;112(1):112-22.
72. Kolodziej L. Investigation of the kynurenine pathway in Indoleamine 2, 3 dioxygenase deficient mice with inflammatory arthritis. *Transgenic Res.* oct 2013;22(5):1049-54.
73. Laich A, Neurauter G, Widner B, Fuchs D. More rapid method for simultaneous measurement of tryptophan and kynurenine by HPLC. *Clin Chem.* mars 2002;48(3):579-81.
74. Amirkhani A, Heldin E, Markides KE, Bergquist J. Quantitation of tryptophan, kynurenine and kynurenic acid in human plasma by capillary liquid chromatography-electrospray ionization tandem mass spectrometry. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci.* 25 nov 2002;780(2):381-7.
75. Arvidsson B, Johannesson N, Citterio A, Righetti PG, Bergquist J. High throughput analysis of tryptophan metabolites in a complex matrix using capillary electrophoresis coupled to time-of-flight mass spectrometry. *J Chromatogr A.* août 2007;1159(1-2):154-8.
76. Sakaguchi Y, Ikenaga J, Yoshida H, Hayama T, Itoyama M, Todoroki K, et al. Selective and sensitive liquid chromatographic determination method of 5-hydroxyindoles with fluorogenic and fluorogenic derivatization. *J Pharm Biomed Anal.* 10 oct 2015;114:348-54.
77. Kema IP, Meijer WG, Meiborg G, Ooms B, Willemsse PH, de Vries EG. Profiling of tryptophan-related plasma indoles in patients with carcinoid tumors by automated, on-line, solid-phase extraction and HPLC with fluorescence detection. *Clin Chem.* 2001;47(10):1811-20.
78. Vaarmann A, Kask A, Mäeorg U. Novel and sensitive high-performance liquid chromatographic method based on electrochemical coulometric array detection for simultaneous determination of catecholamines, kynurenine and indole derivatives of tryptophan. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci.* 25 mars 2002;769(1):145-53.
79. Zagajewski J, Drozdowicz D, Brzozowska I, Hubalewska-Mazgaj M, Stelmaszynska T, Laidler PM, et al. Conversion L-tryptophan to melatonin in the gastrointestinal tract: the new high performance liquid chromatography method enabling simultaneous determination of six metabolites of L-tryptophan by native fluorescence and UV-VIS detection. *J Physiol Pharmacol.* 2012;63(6):613-21.
80. Zhao J, Chen H, Ni P, Xu B, Luo X, Zhan Y, et al. Simultaneous determination of urinary tryptophan, tryptophan-related metabolites and creatinine by high performance liquid chromatography with ultraviolet and fluorimetric detection. *J Chromatogr B.* sept 2011;879(26):2720-5.
81. Lesniak WG, Jyoti A, Mishra MK, Louissaint N, Romero R, Chugani DC, et al. Concurrent quantification of tryptophan and its major metabolites. *Anal Biochem.* déc 2013;443(2):222-31.
82. Lu H, Yu J, Wang J, Wu L, Xiao H, Gao R. Simultaneous quantification of neuroactive dopamine serotonin and kynurenine pathway metabolites in gender-specific youth urine by ultra performance liquid chromatography tandem high resolution mass spectrometry. *J Pharm Biomed Anal.* avr 2016;122:42-51.

83. Sano M, Ferchaud-Roucher V, Nael C, Aguesse A, Poupeau G, Castellano B, et al. Simultaneous detection of stable isotope-labeled and unlabeled L-tryptophan and of its main metabolites, L-kynurenine, serotonin and quinolinic acid, by gas chromatography/negative ion chemical ionization mass spectrometry. *J Mass Spectrom.* févr 2014;49(2):128-35.
84. Galba J, Michalicova A, Parrak V, Novak M, Kovac A. Quantitative analysis of phenylalanine, tyrosine, tryptophan and kynurenine in rat model for tauopathies by ultra-high performance liquid chromatography with fluorescence and mass spectrometry detection. *J Pharm Biomed Anal.* 22 août 2015;117:85-90.
85. Marcos J, Renau N, Valverde O, Aznar-Lain G, Gracia-Rubio I, Gonzalez-Sepulveda M, et al. Targeting tryptophan and tyrosine metabolism by liquid chromatography tandem mass spectrometry. *J Chromatogr A.* févr 2016;1434:91-101.
86. Badawy A, Morgan C. Rapid Isocratic Liquid Chromatographic Separation and Quantification of Tryptophan and Six kynurenine Metabolites in Biological Samples with Ultraviolet and Fluorimetric Detection. *Int J Tryptophan Res.* déc 2010;175.
87. Kuligowski J, Sanjuan-Herráez D, Vázquez-Sánchez MA, Brunet-Vega A, Pericay C, Ramírez-Lázaro MJ, et al. Metabolomic Analysis of Gastric Cancer Progression within the Correa's Cascade Using Ultrapformance Liquid Chromatography-Mass Spectrometry. *J Proteome Res.* 5 août 2016;15(8):2729-38.
88. Galba J, Michalicova A, Parrak V, Novak M, Kovac A. Quantitative analysis of phenylalanine, tyrosine, tryptophan and kynurenine in rat model for tauopathies by ultra-high performance liquid chromatography with fluorescence and mass spectrometry detection. *J Pharm Biomed Anal.* janv 2016;117:85-90.
89. Følling I. The discovery of phenylketonuria. *Acta Paediatr Oslo Nor* 1992 Suppl. déc 1994;407:4-10.
90. Bickel H, Gerrard J, Hickmans EM. Influence of phenylalanine intake on phenylketonuria. *Lancet.* 17 oct 1953;265(6790):812-3.
91. Wilson J, Jungner G. Principes et pratique du dépistage des maladies. Organisation Mondiale de la Santé; 1970.
92. Guthrie R, Susi A. A simple phenylalanine method for detecting phenylketonuria in large populations of newborn infants. *Pediatrics.* sept 1963;32:338-43.
93. Haute Autorité de Santé. Phénylcétonurie, Protocole national de diagnostic et de soins. 2010.
94. AFDPHE. 40 ans de dépistage néonatal. Colloque AFDPHE; 2013.
95. Fernanda Schuck P, Malgarin F, Henrique Cararo J, Cardoso F, Luiz Streck E, Costa Ferreira G. Phenylketonuria Pathophysiology: on the Role of Metabolic Alterations. *Aging Dis.* 2015;6(5):390.
96. Saudubray J-M, Van den Berghe G, Walter J. Inborn Metabolic Diseases : Diagnosis and Treatment. 5th edition. Springer; 2012.
97. Blau N. Genetics of Phenylketonuria: Then and Now. *Hum Mutat.* juin 2016;37(6):508-15.

98. Opladen T, Hoffmann GF, Blau N. An international survey of patients with tetrahydrobiopterin deficiencies presenting with hyperphenylalaninaemia. *J Inherit Metab Dis.* nov 2012;35(6):963-73.
99. Richardson SC, Aspbury RA, Fisher MJ. The role of reversible phosphorylation in the hormonal control of phenylalanine hydroxylase in isolated rat proximal kidney tubules. *Biochem J.* 1 juin 1993;292 (Pt 2):419-24.
100. Hufton SE, Jennings IG, Cotton RG. Structure and function of the aromatic amino acid hydroxylases. *Biochem J.* 15 oct 1995;311 (Pt 2):353-66.
101. Williams RA, Mamotte CD, Burnett JR. Phenylketonuria: an inborn error of phenylalanine metabolism. *metabolism.* 2008;12:13.
102. Konecki DS, Wang Y, Trefz FK, Lichter-Konecki U, Woo SL. Structural characterization of the 5' regions of the human phenylalanine hydroxylase gene. *Biochemistry.* 8 sept 1992;31(35):8363-8.
103. BioPKU. PAH genomic structure and variants [Internet]. 2014. Disponible sur: http://biopku.org/home/docs/variants_all.pdf
104. Moraes TB, Jacques CED, Rosa AP, Dalazen GR, Terra M, Coelho JG, et al. Role of catalase and superoxide dismutase activities on oxidative stress in the brain of a phenylketonuria animal model and the effect of lipoic acid. *Cell Mol Neurobiol.* mars 2013;33(2):253-60.
105. Justice P, Hsia DY. Studies on inhibition of brain 5-hydroxytryptophan decarboxylase by phenylalanine metabolites. *Proc Soc Exp Biol Med.* févr 1965;118:326-8.
106. Hood A, Antenor-Dorsey JAV, Rutlin J, Hershey T, Shimony JS, McKinstry RC, et al. Prolonged exposure to high and variable phenylalanine levels over the lifetime predicts brain white matter integrity in children with phenylketonuria. *Mol Genet Metab.* janv 2015;114(1):19-24.
107. Rech VC, Feksa LR, Dutra-Filho CS, Wyse AT de S, Wajner M, Wannmacher CMD. Inhibition of the mitochondrial respiratory chain by phenylalanine in rat cerebral cortex. *Neurochem Res.* mai 2002;27(5):353-7.
108. Waisbren SE, Brown MJ, de Sonneville LM, Levy HL. Review of neuropsychological functioning in treated phenylketonuria: an information processing approach. *Acta Paediatr Suppl.* déc 1994;407:98-103.
109. Jahja R, van Spronsen FJ, de Sonneville LMJ, van der Meere JJ, Bosch AM, Hollak CEM, et al. Social-cognitive functioning and social skills in patients with early treated phenylketonuria: a PKU-COBESO study. *J Inherit Metab Dis.* mai 2016;39(3):355-62.
110. Pietz J, Dunkelmann R, Rupp A, Rating D, Meinck HM, Schmidt H, et al. Neurological outcome in adult patients with early-treated phenylketonuria. *Eur J Pediatr.* oct 1998;157(10):824-30.
111. Robinson M, White FJ, Cleary MA, Wraith E, Lam WK, Walter JH. Increased risk of vitamin B12 deficiency in patients with phenylketonuria on an unrestricted or relaxed diet. *J Pediatr.* avr 2000;136(4):545-7.

112. Hoeks MPA, den Heijer M, Janssen MCH. Adult issues in phenylketonuria. *Neth J Med.* janv 2009;67(1):2-7.
113. Cleary MA, Walter JH, Wraith JE, Jenkins JP, Alani SM, Tyler K, et al. Magnetic resonance imaging of the brain in phenylketonuria. *Lancet.* 9 juill 1994;344(8915):87-90.
114. Joseph B, Dyer CA. Relationship between myelin production and dopamine synthesis in the PKU mouse brain. *J Neurochem.* août 2003;86(3):615-26.
115. Koch R, Burton B, Hoganson G, Peterson R, Rhead W, Rouse B, et al. Phenylketonuria in adulthood: a collaborative study. *J Inherit Metab Dis.* sept 2002;25(5):333-46.
116. Waisbren SE, Levy HL. Agoraphobia in phenylketonuria. *J Inherit Metab Dis.* 1991;14(5):755-64.
117. ten Hoedt AE, de Sonnevile LMJ, Francois B, ter Horst NM, Janssen MCH, Rubio-Gozalbo ME, et al. High phenylalanine levels directly affect mood and sustained attention in adults with phenylketonuria: a randomised, double-blind, placebo-controlled, crossover trial. *J Inherit Metab Dis.* févr 2011;34(1):165-71.
118. Gassió R, Campistol J, Vilaseca MA, Lambruschini N, Cambra FJ, Fusté E. Do adult patients with phenylketonuria improve their quality of life after introduction/resumption of a phenylalanine-restricted diet? *Acta Paediatr.* déc 2003;92(12):1474-8.
119. Anjema K, van Rijn M, Verkerk PH, Burgerhof JGM, Heiner-Fokkema MR, van Spronsen FJ. PKU: high plasma phenylalanine concentrations are associated with increased prevalence of mood swings. *Mol Genet Metab.* nov 2011;104(3):231-4.
120. Camp KM, Parisi MA, Acosta PB, Berry GT, Bilder DA, Blau N, et al. Phenylketonuria Scientific Review Conference: state of the science and future research needs. *Mol Genet Metab.* juin 2014;112(2):87-122.
121. Albrecht J, Garbade SF, Burgard P. Neuropsychological speed tests and blood phenylalanine levels in patients with phenylketonuria: A meta-analysis. *Neurosci Biobehav Rev.* mars 2009;33(3):414-21.
122. Lee PJ, Lilburn M, Baudin J. Maternal phenylketonuria: experiences from the United Kingdom. *Pediatrics.* 2003;112(Supplement 4):1553-1556.
123. Levy HL, Ghavami M. Maternal phenylketonuria: a metabolic teratogen. *Teratology.* mars 1996;53(3):176-84.
124. Werner ER, Blau N, Thöny B. Tetrahydrobiopterin: biochemistry and pathophysiology. *Biochem J.* 15 sept 2011;438(3):397-414.
125. Greene CL, Longo N. National Institutes of Health (NIH) review of evidence in phenylalanine hydroxylase deficiency (phenylketonuria) and recommendations/guidelines for therapy from the American College of Medical Genetics (ACMG) and Genetics Metabolic Dietitians International (GMDI). *Mol Genet Metab.* juin 2014;112(2):85-6.
126. Dhondt J-L. Lessons from 30 years of selective screening for tetrahydrobiopterin deficiency. *J Inherit Metab Dis.* oct 2010;33(Suppl 2):S219-223.

127. Blau N, Bélanger-Quintana A, Demirkol M, Feillet F, Giovannini M, MacDonald A, et al. Management of phenylketonuria in Europe: Survey results from 19 countries. *Mol Genet Metab.* févr 2010;99(2):109-15.
128. Van Spronsen FJ, Burgard P. The truth of treating patients with phenylketonuria after childhood: the need for a new guideline. *J Inherit Metab Dis.* déc 2008;31(6):673-9.
129. Hagedorn TS, van Berkel P, Hammerschmidt G, Lhotáková M, Saludes RP. Requirements for a minimum standard of care for phenylketonuria: the patients' perspective. *Orphanet J Rare Dis.* 2013;8(1):1-8.
130. Abadie V, Berthelot J, Feillet F, Maurin N, Mercier A, Ogier de Baulny H, et al. Consensus national sur la prise en charge des enfants dépistés avec une hyperphénylalaninémie. *Arch Pédiatrie.* mai 2005;12(5):594-601.
131. Vockley J, Andersson HC, Antshel KM, Braverman NE, Burton BK, Frazier DM, et al. Phenylalanine hydroxylase deficiency: diagnosis and management guideline. *Genet Med.* févr 2014;16(2):188-200.
132. Singh RH, Cunningham AC, Mofidi S, Douglas TD, Frazier DM, Hook DG, et al. Updated, web-based nutrition management guideline for PKU: An evidence and consensus based approach. *Mol Genet Metab.* juin 2016;118(2):72-83.
133. Les Feux Follets. La phénylcétonurie [Internet]. Les Feux Follets. [cité 5 juill 2016]. Disponible sur: <http://phenylcetonurie.org/la-phenylcetonurie/>
134. Walter JH, White FJ, Hall SK, MacDonald A, Rylance G, Boneh A, et al. How practical are recommendations for dietary control in phenylketonuria? *Lancet.* 6 juill 2002;360(9326):55-7.
135. Blau N, van Spronsen FJ, Levy HL. Phenylketonuria. *Lancet.* 2010;376(9750):1417-1427.
136. Okano Y, Nagasaka H. Optimal serum phenylalanine for adult patients with phenylketonuria. *Mol Genet Metab.* déc 2013;110(4):424-30.
137. Feillet F. Communication personnelle, Symposium PKU : a lifelong journey. 2015 SSIEM.
138. Maillot F. ECOPHEN, résultats préliminaires. SFEIM; 2016; Grenoble.
139. Haute Autorité de Santé. Commission de la Transparence : KUVAN 100 mg, comprimé pour solution buvable. 2009.
140. Kure S, Hou DC, Ohura T, Iwamoto H, Suzuki S, Sugiyama N, et al. Tetrahydrobiopterin-responsive phenylalanine hydroxylase deficiency. *J Pediatr.* sept 1999;135(3):375-8.
141. European Medicines Agency. KUVAN sapropterin dihydrochloride. 2015.
142. Singh RH, Quirk ME. Using change in plasma phenylalanine concentrations and ability to liberalize diet to classify responsiveness to tetrahydrobiopterin therapy in patients with phenylketonuria. *Mol Genet Metab.* déc 2011;104(4):485-91.

143. Trefz FK, Muntau AC, Lagler FB, Moreau F, Alm J, Burlina A, et al. The Kuvan[®] Adult Maternal Paediatric European Registry (KAMPER) Multinational Observational Study: Baseline and 1-Year Data in Phenylketonuria Patients Responsive to Sapropterin. *JIMD Rep.* 2015;23:35-43.
144. Matalon R, Michals-Matalon K, Bhatia G, Grechanina E, Novikov P, McDonald JD, et al. Large neutral amino acids in the treatment of phenylketonuria (PKU). *J Inherit Metab Dis.* déc 2006;29(6):732-8.
145. Singh RH, Rohr F, Frazier D, Cunningham A, Mofidi S, Ogata B, et al. Recommendations for the nutrition management of phenylalanine hydroxylase deficiency. *Genet Med.* févr 2014;16(2):121-31.
146. van Vliet D, Bruinenberg VM, Mazzola PN, van Faassen MHJR, de Blaauw P, Kema IP, et al. Large Neutral Amino Acid Supplementation Exerts Its Effect through Three Synergistic Mechanisms: Proof of Principle in Phenylketonuria Mice. *PLoS One.* 2015;10(12):e0143833.
147. Pietz J, Kreis R, Rupp A, Mayatepek E, Rating D, Boesch C, et al. Large neutral amino acids block phenylalanine transport into brain tissue in patients with phenylketonuria. *J Clin Invest.* 1999;103(8):1169.
148. Rocha JC, Martel F. Large neutral amino acids supplementation in phenylketonuric patients. *J Inherit Metab Dis.* août 2009;32(4):472-80.
149. Zaki OK, El-Wakeel L, Ebeid Y, Ez Elarab HS, Moustafa A, Abdulazim N, et al. The Use of Glycomacropeptide in Dietary Management of Phenylketonuria. *J Nutr Metab.* 2016;2016:1-5.
150. Sarkissian CN, Gámez A, Wang L, Charbonneau M, Fitzpatrick P, Lemontt JF, et al. Preclinical evaluation of multiple species of PEGylated recombinant phenylalanine ammonia lyase for the treatment of phenylketonuria. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 30 déc 2008;105(52):20894-9.
151. Ding Z, Harding CO, Rebuffat A, Elzaouk L, Wolff JA, Thöny B. Correction of murine PKU following AAV-mediated intramuscular expression of a complete phenylalanine hydroxylating system. *Mol Ther J Am Soc Gene Ther.* avr 2008;16(4):673-81.
152. Al Hafid N, Christodoulou J. Phenylketonuria: a review of current and future treatments. *Transl Pediatr.* 2015;4(4):304-17.
153. Hargreaves KM, Pardridge WM. Neutral amino acid transport at the human blood-brain barrier. *J Biol Chem.* 1988;263(36):19392-7.
154. Smith QR. Transport of glutamate and other amino acids at the blood-brain barrier. *J Nutr.* 2000;130(4):1016S-22S.
155. Pardridge WM. Blood-brain barrier carrier-mediated transport and brain metabolism of amino acids. *Neurochem Res.* mai 1998;23(5):635-44.
156. McKean CM. The effects of high phenylalanine concentrations on serotonin and catecholamine metabolism in the human brain. *Brain Res.* 12 déc 1972;47(2):469-76.
157. Pascucci T, Ventura R, Puglisi-Allegra S, Cabib S. Deficits in brain serotonin synthesis in a genetic mouse model of phenylketonuria. *Neuroreport.* 2002;13(18):2561-4.

158. Burlina AB, Bonafé L, Ferrari V, Suppiej A, Zacchello F, Burlina AP. Measurement of neurotransmitter metabolites in the cerebrospinal fluid of phenylketonuric patients under dietary treatment. *J Inherit Metab Dis.* juin 2000;23(4):313-6.
159. Kalkanoglu HS, Ahring KK, Sertkaya D, Møller LB, Romstad A, Mikkelsen I, et al. Behavioural effects of phenylalanine-free amino acid tablet supplementation in intellectually disabled adults with untreated phenylketonuria. *Acta Paediatr.* sept 2005;94(9):1218-22.
160. de Groot MJ, Hoeksma M, Blau N, Reijngoud DJ, van Spronsen FJ. Pathogenesis of cognitive dysfunction in phenylketonuria: Review of hypotheses. *Mol Genet Metab.* 2010;99:S86-9.
161. Ogawa S, Ichinose H. Effect of metals and phenylalanine on the activity of human tryptophan hydroxylase-2: comparison with that on tyrosine hydroxylase activity. *Neurosci Lett.* 3 juill 2006;401(3):261-5.
162. Pascucci T, Andolina D, Mela IL, Conversi D, Latagliata C, Ventura R, et al. 5-Hydroxytryptophan rescues serotonin response to stress in prefrontal cortex of hyperphenylalaninaemic mice. *Int J Neuropsychopharmacol.* sept 2009;12(8):1067-79.
163. Weglage J, Wiedermann D, Möller H, Ullrich K. Pathogenesis of different clinical outcomes in spite of identical genotypes and comparable blood phenylalanine concentrations in phenylketonurics. *J Inherit Metab Dis.* avr 1998;21(2):181-2.
164. Winn SR, Scherer T, Thöny B, Harding CO. High dose sapropterin dihydrochloride therapy improves monoamine neurotransmitter turnover in murine phenylketonuria (PKU). *Mol Genet Metab.* janv 2016;117(1):5-11.
165. Haruki H, Hovius R, Pedersen MG, Johnsson K. Tetrahydrobiopterin Biosynthesis as a Potential Target of the Kynurenine Pathway Metabolite Xanthurenic Acid. *J Biol Chem.* 8 janv 2016;291(2):652-7.
166. Kochen W, Byrd D, Bühner R, Bührlen E. Tryptophan metabolism in untreated phenylketonuria and in vitamin B6 dependent cramps. *Z Für Klin Chem Klin Biochem.* avr 1972;10(4):180.
167. Kochen W, Byrd DJ, Bühner R, Bührlen E. Studies on tryptophan metabolism in untreated phenylketonuric patients. *Z Für Klin Chem Klin Biochem.* janv 1975;13(1):1-12.
168. Godin C, Dolan G. Tryptophan metabolism in normal and phenylketonuric rats. *Biochim Biophys Acta.* 28 déc 1966;130(2):535-7.
169. Byrd DJ, Kochen W, Schürle L, Trefz FK. A study of urinary tryptophan metabolites in relation to the phenylalanine content of semi-synthetic diets in a patient with phenylketonuria. *Acta Vitaminol Enzymol.* 1975;29(1-6):55-61.
170. Milovanović DD, Milovanović L, Vranjesević D. Serum tryptophan to large neutral amino acid ratio and urinary tryptophan in three patients with phenylketonuria in a family. A clinical and biochemical study. *Adv Exp Med Biol.* 1999;467:289-95.
171. Turner EH, Loftis JM, Blackwell AD. Serotonin a la carte: supplementation with the serotonin precursor 5-hydroxytryptophan. *Pharmacol Ther.* mars 2006;109(3):325-38.

172. Weng R, Shen S, Tian Y, Burton C, Xu X, Liu Y, et al. Metabolomics Approach Reveals Integrated Metabolic Network Associated with Serotonin Deficiency. *Sci Rep.* 8 juill 2015;5:11864.
173. Chen Y, Guillemin GJ. Kynurenine pathway metabolites in humans: disease and healthy states. *Int J Tryptophan Res.* 2009;2:1.
174. BIOFORMA. Protéomique, spectrométrie de masse et analyses multiples. 2010.
175. Cheillan D, Cognat S, Vianey-Saban C, Maire I, Dorche C. Application of tandem mass spectrometry to neonatal screening of inherited metabolic diseases: focus on present developments. *Ann Biol Clin.* juin 2004;62(3):269-77.
176. Xiang X, Han Y, Neuvonen M, Laitila J, Neuvonen PJ, Niemi M. High performance liquid chromatography–tandem mass spectrometry for the determination of bile acid concentrations in human plasma. *J Chromatogr B.* janv 2010;878(1):51-60.
177. COFRAC. Guide technique d'accréditation de vérification (portée A) / validation (portée B) des méthodes en Biologie Médicale. SH GTA 04. Révision 01.
178. AFNOR. Norme NF EN ISO 15189 : Exigences concernant la qualité et la compétence. 2013.
179. Peters FT, Drummer OH, Musshoff F. Validation of new methods. *Forensic Sci Int.* janv 2007;165(2-3):216-24.
180. Department of Health and Human Services, Center for Drug Evaluation and Research, Center for Veterinary Medicine. Guidance for industry : bioanalytical method validation. F.A.D.A. US; 2001.
181. Matuszewski BK, Constanzer ML, Chavez-Eng CM. Strategies for the assessment of matrix effect in quantitative bioanalytical methods based on HPLC-MS/MS. *Anal Chem.* 1 juill 2003;75(13):3019-30.
182. Ricós C, Alvarez V, Cava F, García-Lario JV, Hernández A, Jiménez CV, et al. Current databases on biological variation: pros, cons and progress. *Scand J Clin Lab Invest.* nov 1999;59(7):491-500.
183. Kema IP, de Vries EG, Schellings AM, Postmus PE, Muskiet FA. Improved diagnosis of carcinoid tumors by measurement of platelet serotonin. *Clin Chem.* avr 1992;38(4):534-40.
184. Favennec M, Hennart B, Caiazzo R, Leloire A, Yengo L, Verbanck M, et al. The kynurenine pathway is activated in human obesity and shifted toward kynurenine monooxygenase activation. *Obes Silver Spring Md.* 8 sept 2015;
185. Gostner JM, Becker K, Kurz K, Fuchs D. Disturbed Amino Acid Metabolism in HIV: Association with Neuropsychiatric Symptoms. *Front Psychiatry.* 2015;6:97.
186. Boulet L. Mise au point du dosage sanguin des métabolites de la voie du tryptophane en HPLC-MS/MS et perspectives dans le suivi biologique des patients atteints de phénylcétonurie - Rapport pour la soutenance du DIU Maladies Héréditaires du Métabolisme 2015/2016.
187. Zuo H, Ueland PM, Ulvik A, Eussen SJPM, Vollset SE, Nygård O, et al. Plasma Biomarkers of Inflammation, the Kynurenine Pathway, and Risks of All-Cause, Cancer, and Cardiovascular Disease Mortality: The Hordaland Health Study. *Am J Epidemiol.* 27 janv 2016;

188. Deac OM, Mills JL, Shane B, Midttun Ø, Ueland PM, Brosnan JT, et al. Tryptophan catabolism and vitamin B-6 status are affected by gender and lifestyle factors in healthy young adults. *J Nutr.* avr 2015;145(4):701-7.
189. Midttun O, Townsend MK, Nygård O, Tworoger SS, Brennan P, Johansson M, et al. Most blood biomarkers related to vitamin status, one-carbon metabolism, and the kynurenine pathway show adequate preanalytical stability and within-person reproducibility to allow assessment of exposure or nutritional status in healthy women and cardiovascular patients. *J Nutr.* mai 2014;144(5):784-90.
190. Carling RS, Degg TJ, Allen KR, Bax NDS, Barth JH. Evaluation of whole blood serotonin and plasma and urine 5-hydroxyindole acetic acid in diagnosis of carcinoid disease. *Ann Clin Biochem.* nov 2002;39:577-82.
191. Hustad S, Eussen S, Midttun O, Ulvik A, van de Kant PM, Morkrid L, et al. Kinetic Modeling of Storage Effects on Biomarkers Related to B Vitamin Status and One-Carbon Metabolism. *Clin Chem.* 1 févr 2012;58(2):402-10.
192. Xiao R, Beck O, Hjemdahl P. On the accurate measurement of serotonin in whole blood. *Scand J Clin Lab Invest.* oct 1998;58(6):505-10.

Annexes

Molécule	Référence	Pureté
3HK	H1771	≥ 98%
KYN	K8625	≥ 98%
5HTP	H9772	≥ 99%
5HT	14927	≥ 98%
Trp	T0254	≥ 98%
AK	K3375	≥ 98%
3HA	148776	97%
AA	10678	≥ 99%
XA	D120804	96 %

Annexe 1 : Référence et pureté des poudres utilisées comme standard, fournies par Sigma Aldrich.



MINISTÈRE DE L'ÉDUCATION NATIONALE,
DE L'ENSEIGNEMENT SUPÉRIEUR ET DE LA RECHERCHE

Paris le - 1 JUIL. 2016

**Secrétariat d'Etat
à l'enseignement
supérieur et à la
recherche**

**Direction générale de
la recherche et de
l'innovation**

Cellule bioéthique

Affaire suivie par
S. Kerboriou
Téléphone
01 55 55 86 68

Mél.
Gestion.conservation
@recherche.gouv.fr

1 rue Descartes
75231 Paris cedex 05

Le Secrétariat d'Etat à l'enseignement
supérieur et à la recherche

à

Madame la directrice générale
Centre Hospitalier Universitaire Grenoble Alpes

A l'attention de Madame Nicole VEYRET

Objet : Dossiers de déclaration de conservation et préparation à des fins scientifiques
d'éléments du corps humain (responsable scientifique : Christelle CORNE)

Conformément aux dispositions des articles R. 1243-49 et suivants du code de la
santé publique, vous avez adressé à nos services un dossier de déclaration d'activité
de conservation et de préparation d'éléments du corps humain pour les besoins des
programmes de recherche de l'organisme que vous représentez.

La direction générale de la recherche et de l'innovation du ministère (cellule de
bioéthique) accuse réception de votre dossier, enregistré sous le n° **DC-2016-2741**.

La cellule s'est assurée que le comité de protection des personnes compétent a bien
reçu le dossier.

En l'absence de décision expresse d'opposition du ministre de l'éducation nationale,
de l'enseignement supérieur et de la recherche, l'activité déclarée peut commencer à
l'issue d'un délai de trois mois à compter de la date de cet accusé de réception.
Toutefois, ce délai peut être suspendu s'il est demandé de fournir des informations
manquantes ou incomplètes ou des compléments nécessaires à l'expertise du
dossier.

Sylvie KERBORIOU
Gestionnaire réglementaire

Annexe 2 : Accusé de réception émis par le ministère chargé de la recherche concernant la
déclaration de conservation et préparation à des fins scientifiques d'éléments du corps humain.

Code anonymat	Sexe	Date de naissance	IMC	3HK (nM)	KYN (μ M)	5HTP (nM)	5HT (nM)	3HA (nM)	Trp (μ M)	AK (nM)	AA (nM)	XA (nM)
CC01	F	avr-72	20	31,4	1,9	4,1	89,7	22,6	43,3	31,1	28,7	15,9
LV02	F	mars-82	24	26,2	1,8	5,2	ND	14,8	48,2	27,8	7,1	18,1
LBO3	F	mai-88	21	18,6	1,4	3,7	ND	14,6	52,2	24,9	7,6	11,2
CB04	F	nov-89	19	27,4	1,8	5,6	ND	16,8	56,0	37,5	6,5	21,3
DB05	F	janv-56	20	25,4	1,7	3,7	11,6	13,2	40,4	27,9	5,4	14,7
DD06	H	avr-80	24	25,0	1,9	3,0	46,7	18,0	55,1	34,6	4,5	13,7
SG07	F	nov-80	32	42,1	2,1	ND	36,2	21,6	50,3	36,0	5,3	14,8
MC08	F	oct-89	30	29,3	1,6	3,4	53,7	19,7	48,3	24,1	5,1	16,6
AZ09	F	avr-84	28	73,9	1,7	5,8	6,3	27,7	40,3	49,7	4,4	36,9
AT10	F	janv-93	21	35,5	2,0	5,4	4,0	16,1	52,4	30,1	4,5	14,8
AS11	F	juin-87	24	21,5	2,0	4,3	4,8	23,3	50,7	34,6	8,8	10,9
JR12	F	févr-54	21	29,8	2,4	3,1	13,9	16,8	48,1	44,5	6,3	16,0
FG13	H	mars-91	24	25,1	2,1	4,2	20,5	22,9	65,3	47,8	6,6	30,7
AL14	F	févr-81	22	27,8	1,9	4,8	ND	16,5	64,1	42,8	5,5	18,3
AC15	F	sept-81	21	48,3	2,3	5,4	10,3	25,7	49,8	46,8	6,8	20,8
PF16	H	févr-58	25	39,6	2,4	3,5	2,0	27,0	48,0	48,3	11,8	31,3
HP17	F	mars-62	18	27,0	1,8	3,2	2,0	27,6	42,2	38,3	10,0	23,7
VD18	F	nov-57	22	37,0	2,5	5,0	2,0	23,1	53,9	46,9	10,7	23,5
MF19	F	août-86	18	32,3	2,3	3,7	8,5	12,2	41,5	34,5	6,7	10,1
SV20	F	juin-65	34	31,2	1,7	5,1	2,0	18,5	49,3	41,0	7,6	18,9
MP21	H	avr-80	29	34,3	1,9	5,1	16,7	34,3	53,7	45,9	5,8	26,4
EG22	F	mai-85	19	31,7	1,8	3,3	4,0	17,2	55,5	40,4	7,6	16,9
PF23	H	oct-64	25	36,5	2,0	4,1	4,8	26,9	53,5	43,9	8,2	22,0
TW24	H	janv-92	20	22,7	2,0	3,7	12,8	20,3	52,2	29,0	7,0	14,3
JM25	H	mai-79	22	19,1	1,8	8,4	4,0	24,4	63,6	33,4	8,3	10,8
GH26	F	août-75	22	27,1	1,8	8,8	18,2	17,3	47,1	46,5	6,2	22,1
JR27	H	sept-81	25	31,5	2,2	5,3	15,5	28,8	59,9	75,7	5,4	29,6
VB28	F	juin-70	20	45,0	1,7	5,8	13,5	21,1	59,6	41,6	6,0	15,0
BT29	H	janv-65	23	24,2	2,0	8,5	ND	22,2	61,6	50,2	7,9	18,6
JT30	F	sept-77	24	35,4	2,1	9,4	2,0	18,5	51,7	61,6	8,6	25,1

Annexe 3 : Résultats obtenus pour nos 30 sujets-sains prélevés à jeun sur tube EDTA. Abréviations : IMC : indice de masse corporelle ; F : femme ; H : homme ; ND : non déterminé.

Code anonymat	Sexe	Date de naissance	IMC	3HK (nM)	KYN (μ M)	5HTP (nM)	5HT (nM)	3HA (nM)	Trp (μ M)	AK (nM)	AA (nM)	XA (nM)
EFS 1	F	avr-72	20	42,1	2,3	3,4	199,0	35,9	64,6	45,1	6,7	28,0
EFS 2	F	mars-82	24	25,2	1,8	5,2	72,3	22,5	54,0	24,1	6,9	15,3
EFS 3	F	mai-88	21	37,5	3,0	5,8	61,2	30,2	77,8	60,5	8,0	25,0
EFS 4	F	nov-89	19	44,2	2,5	4,7	53,3	23,3	64,6	33,9	4,8	28,8
EFS 5	F	janv-56	20	17,2	1,7	3,1	32,1	19,5	68,2	33,0	5,2	17,1
EFS 6	H	avr-80	24	28,0	1,8	3,2	65,8	24,3	65,4	54,4	3,4	19,2
EFS 7	F	nov-80	32	25,1	2,0	5,1	50,5	17,8	64,7	35,9	4,5	18,0
EFS 8	F	oct-89	30	56,1	2,2	3,4	67,7	51,4	83,0	44,1	5,5	26,5
EFS 9	F	avr-84	28	39,1	1,8	3,5	37,5	24,5	48,8	36,4	7,3	21,9
EFS 10	F	janv-93	21	37,9	2,5	6,3	29,5	22,1	64,9	63,1	8,3	30,6
EFS 11	F	juin-87	24	22,1	1,7	4,7	62,5	19,5	53,3	41,1	6,0	24,4
EFS 12	F	févr-54	21	34,4	2,9	7,1	182,0	53,5	86,3	43,9	11,8	19,0
EFS 13	H	mars-91	24	30,5	2,1	7,2	6,9	21,0	75,0	39,7	6,7	16,2
EFS 14	F	févr-81	22	36,4	3,4	5,5	4,7	26,5	61,6	53,3	12,0	24,6

Annexe 4 : Résultats obtenus pour nos 14 sujets-sains prélevés non à jeun sur tube EDTA. Abréviations : IMC : indice de masse corporelle ; F : femme ; H : homme.

Code anonymat	3HK (nM)	KYN (µM)	5HTP (nM)	5HT (nM)	3HA (nM)	Trp (µM)	AK (nM)	AA (nM)	XA (nM)
LV02	26,4	1,9	4,2	ND	16,3	50,3	31,9	8,0	16,7
LB03	19,5	1,5	3,9	ND	14,4	53,8	25,3	6,6	11,2
CB04	23,2	2,1	4,0	ND	21,5	64,4	40,3	8,9	16,7
DB05	23,5	1,6	3,6	117,0	12,5	40,7	28,2	6,0	14,4
DD06	25,2	2,1	4,3	47,5	18,2	59,9	40,6	5,1	20,0
SG07	44,2	2,1	2,6	197,0	19,9	49,8	40,4	6,1	14,7
MC08	24,9	1,4	2,4	55,9	17,7	49,9	21,7	5,1	15,0
AZ09	57,7	1,6	3,7	35,7	29,8	41,8	48,5	4,6	25,3
AT10	25,0	1,9	4,5	34,1	19,3	55,2	34,5	5,4	13,4
JR12	37,6	2,4	7,4	187,0	16,5	56,8	42,1	6,4	13,2
FG13	23,5	1,8	3,3	152,0	18,5	66,5	46,4	7,6	29,5
AL14	26,8	1,8	4,5	ND	15,0	61,0	38,5	5,1	16,2
AC15	50,5	2,3	3,6	19,7	21,3	47,6	40,0	5,9	16,1
PF16	37,4	2,3	4,7	4,0	28,2	50,5	65,1	10,3	25,3
HP17	28,4	1,8	6,2	45,8	17,6	36,2	35,7	20,8	16,6
VD18	48,7	2,4	3,8	88,2	21,9	57,7	56,2	17,9	21,2
MF19	32,5	2,2	5,0	17,8	17,7	42,8	29,5	14,6	7,8
SV20	24,2	1,4	8,2	15,2	16,9	45,9	45,5	14,6	12,8
MP21	31,6	1,8	7,0	35,1	28,6	51,3	50,4	13,9	17,7
EG22	29,2	1,8	5,5	60,6	16,3	53,8	39,8	16,7	13,9
PF23	23,0	1,8	4,2	118,0	26,2	54,4	48,8	13,8	15,7
TW24	21,9	2,1	5,4	177,0	19,3	47,1	29,7	16,3	10,7
JM25	18,8	1,9	11,7	169,0	20,6	60,8	29,4	18,2	10,9
GH26	27,7	1,6	5,0	43,6	18,7	47,7	47,7	13,0	16,4
JR27	24,3	2,0	12,1	34,7	32,3	59,2	69,9	15,3	25,3
VB28	26,6	1,9	6,7	78,9	16,8	53,3	32,4	14,0	10,6
BT29	21,1	1,7	3,9	ND	19,0	51,1	33,6	7,8	13,4
JT30	26,6	1,7	7,7	17,7	21,1	42,7	45,9	13,1	17,3

Annexe 5 : Résultats obtenus pour nos 28 sujets-sains prélevés à jeun sur tube hépariné. Abréviations : IMC : indice de masse corporelle ; F : femme ; H : homme ; ND : non déterminé.

Code anonymat	3HK (nM)	KYN (µM)	5HTP (nM)	3HA (nM)	Trp (µM)	AK (nM)	AA (nM)	XA (nM)	Phe (µM)	Tyr (µM)	Vitamine B1 (nM)	Vitamine B6 (nM)
10BY	12,4	0,7	6,9	11,7	48,3	23,2	5,5	9,5	1733	36	109	180
12TJ	16,6	0,6	3,8	13,0	30,9	18,5	3,5	19,1	1406	23	82	92
13BB	21,2	1,1	5,5	23,1	48,3	41,1	6,5	16,6	1409	36	140	163
14DL	11,5	0,8	2,4	6,3	30,5	16,8	4,9	5,6	700	27	127	119
15DBK	26,5	1,0	3,7	27,0	39,1	69,4	6,9	28,4	1867	50	126	110
16PM	23,2	0,8	4,4	23,6	32,1	73,7	12,7	29,7	2005	39	155	140
17EY	72,0	2,9	6,0	112,0	81,9	85,4	8,6	44,7	706	304	130	145
18CC	39,3	1,3	4,2	28,2	53,0	82,6	7,8	46,3	1022	52	187	96

Code anonymat	Sexe	Date de naissance	Sous-groupe	Type de PCU	Mutations identifiées (%age d'activité résiduelle)
10BY	H	oct-93	Adultes non traités	Typique	c.838G>A (2%) c.838G>A (2%)
12TJ	F	juin-87	Adulte commençant un régime	Typique	c.682G>A (ND) c.1066-11G>A (5%)
13BB	F	juin-91	Adultes non traités	Atypique	c.143T>C (39%) c.1066-11G>A (5%)
14DL	F	mars-98	Enfant non traité	Typique	c.782G>A (44%) c.1045T>G (0%)
15DBK	F	août-93	Adultes non traités	Typique	c.1055deIG (0%) c.1055deIG (0%)
16PM	H	janv-89	Adultes non traités	Typique	c.526C>T (0%) c.734T>C (50%) c.842C>T (2%)
17EY	F	déc-12	Enfant suivant un régime	Atypique	ND
18CC	F	oct-86	Adultes non traités	Atypique	c.204A>T (68%) c.838G>A (2%)

Annexe 6 : résultats obtenus pour nos 8 patients PCU. Abréviations : F : femme ; H : homme ; ND : non déterminé. Le pourcentage d'activité a été obtenu selon le site BioPKU.org.

Echelle de fréquence F		
1	rare	Arrive une fois tous les 5 à 10 ans, n'est jamais arrivé
2	peu fréquent	Une fois à quelques fois/an
3	possible	Une fois à quelques fois /trimestre
4	fréquent	Une fois à quelques fois /mois
5	très fréquent	Systematique, tous les jours, toutes les semaines

Echelle de gravité G		
1	conséquence mineure	pas ou peu d'effets sur les résultats rendus
2	conséquence significative	résultats rendus en retard
3	conséquence grave	résultat modifié après envoi ou rendu en retard du fait d'une externalisation
4	conséquence critique	absence de résultat rendu, ou rendu faux, ou avec un retard très important
5	conséquence dramatique	met en jeu la vie du patient

Annexe 7 : Echelle d'évaluation de la criticité en vigueur au laboratoire du CHU de Grenoble

*Faculté de Pharmacie,
Université Grenoble Alpes.*



Serment de Galien



« Je jure en présence des Maîtres de la Faculté, des Conseillers de l'Ordre des Pharmaciens et de mes condisciples :

D'honorer ceux qui m'ont instruit(e) dans les préceptes de mon art et de leur témoigner ma reconnaissance en restant fidèle à leur enseignement.

D'exercer, dans l'intérêt de la santé publique, ma profession avec conscience et de respecter non seulement la législation en vigueur, mais aussi les règles de l'honneur, de la probité et du désintéressement.

De ne jamais oublier ma responsabilité et mes devoirs envers le malade et sa dignité humaine ; en aucun cas, je ne consentirai à utiliser mes connaissances et mon état pour corrompre les mœurs et favoriser des actes criminels.

Que les hommes m'accordent leur estime si je suis fidèle à mes promesses. Que je sois couvert(e) d'opprobre et méprisé(e) de mes confrères si j'y manque ».

Lysiane BOULET-LE GOUAR

MISE AU POINT DU DOSAGE SANGUIN DES METABOLITES DE LA VOIE DU TRYPTOPHANE EN HPLC-MS/MS ET PERSPECTIVES DANS LE SUIVI BIOLOGIQUE DES PATIENTS ATTEINTS DE PHENYLCETONURIE.

RESUME :

La phénylcétonurie (PCU ; OMIM 261600) est une amino-acidopathie dont la prévalence est d'environ 1/16 000 bébés en France. Son évolution clinique s'est fortement améliorée depuis 1972, date à laquelle le dépistage systématique a été instauré en France. Cette pathologie est traitable, mais la physiopathologie neurologique n'est pas encore parfaitement comprise.

Le tryptophane (Trp), acide aminé essentiel, possède une dégradation selon deux voies métaboliques principales : celle des kynurénines et celle de la sérotonine. La recherche sur le métabolisme du Trp a vu un grand essor au cours des dernières années, et certains éléments nous ont permis d'émettre l'hypothèse d'une relation entre la PCU et le métabolisme du Trp.

Nous avons mis au point, en HPLC-MS/MS, une méthode de quantification de 9 molécules de la voie métabolique du Trp. Nous avons également validé ce dosage plasmatique selon la norme NF EN ISO 15189. Une comparaison des concentrations de ces différents métabolites dans un groupe de patients phénylcétonuriques par rapport à une population de référence a ensuite été effectuée, permettant la mise en évidence d'une diminution significative de Trp, kynurénine et 3-hydroxykynurénine dans notre population phénylcétonurique adulte non traitée.

L'étude des modifications de ce métabolisme reste cependant à explorer plus largement dans la PCU, mais également dans d'autres pathologies, qu'elles soient héréditaires ou non. Nous espérons ainsi comprendre plus amplement l'implication du catabolisme du Trp, via la voie des kynurénines et de la sérotonine, dans les symptômes neurologiques des patients atteints de PCU.

MOTS CLES :

Tryptophane, Kynurénine, Sérotonine, Phénylcétonurie, Spectrométrie de masse en tandem, Maladie héréditaire du métabolisme

ADRESSE DE L'AUTEUR :

[Données à caractère personnel]