



HAL
open science

Dosage des catécholamines et des dérivés méthoxylés urinaires par LC-MS/MS : un régime alimentaire strict est-il indispensable au diagnostic du phéochromocytome ?

Alizée Violin

► **To cite this version:**

Alizée Violin. Dosage des catécholamines et des dérivés méthoxylés urinaires par LC-MS/MS : un régime alimentaire strict est-il indispensable au diagnostic du phéochromocytome ?. Sciences du Vivant [q-bio]. 2019. dumas-02892333

HAL Id: dumas-02892333

<https://dumas.ccsd.cnrs.fr/dumas-02892333v1>

Submitted on 7 May 2021

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.

THÈSE D'EXERCICE / UNIVERSITÉ DE RENNES 1
sous le sceau de l'Université Bretagne Loire

Thèse en vue du
DIPLÔME D'ÉTAT DE DOCTEUR EN PHARMACIE

Présentée sous forme de
**MÉMOIRE EN VUE DE L'OBTENTION
DU DIPLOME D'ÉTUDES SPÉCIALISÉES
EN BIOLOGIE MEDICALE**

présentée par
Alizée VIOLIN

**Dosage des
catécholamines et des
dérivés méthoxylés
urinaires par LC-MS/MS.
Un régime alimentaire
strict est-il
indispensable au
diagnostic du
phéochromocytome ?**

**Thèse soutenue à NANTES
le 01/07/2019**

devant le jury composé de :

Isabelle MOREL

PU-PH, CHU de Rennes / Président

Kalyane BACH

MCU-PH, CHU de Nantes / Directeur de thèse

Delphine DRUI

PH, CHU de Nantes / *examineur*

Damien MASSON

PU-PH, CHU de Nantes / *examineur*

Christian RENAUD

Ingénieur, CHU de Nantes / *examineur*

ANNEE 2018-2019
Listes des enseignants-chercheurs de la Faculté des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques
PROFESSEURS

		Pharmacien	HDR	Hospitalo-U
1	BOUSTIE Joël	X	HDR	
2	DONNIO Pierre Yves	X	HDR	X
3	FAILI Ahmad		HDR	
4	FARDEL Olivier	X	HDR	X
5	FELDEN Brice	X	HDR	
6	GAMBAROTA Giulio		HDR	
7	GOUGEON Anne	X	HDR	
8	LAGENTE Vincent	X	HDR	
9	LE CORRE Pascal	X	HDR	X
10	LORANT (BOICHOT) Elisabeth		HDR	
11	MOREL Isabelle	X	HDR	X
12	SERGENT Odile	X	HDR	
13	SPARFEL-BERLIVET Lydie	X	HDR	
14	TOMASI Sophie	X	HDR	
15	URIAC Philippe	X	HDR	
16	VAN DE WEGHE Pierre		HDR	
17	VERNHET Laurent	X	HDR	

PROFESSEURS ASSOCIES

		Pharmacien	HDR	Hospitalo-U
1	BUREAU Loïc	X		
2	DAVOUST Noëlle	X		

PROFESSEURS EMERITES

		Pharmacien	HDR	Hospitalo-U
1	CILLARD Josiane	X	HDR	
2	GUILLOUZO André		HDR	

MAITRES DE CONFERENCES

		Pharmacien	HDR	Hospitalo-U
1	ABASQ-PAOFAT	Marie-Laurence		
2	ANINAT	Caroline	X	HDR
3	AUGAGNEUR	Yoann		
4	BEGRICHE	Karima		
5	BOUSARGHIN	Latifa		HDR
6	BRANDHONNEUR	Nolwenn		
7	BRUYERE	Arnaud	X	
8	BUNETEL	Laurence	X	
9	CHOLLET-KRUGLER	Marylène	X	
10	COLLIN	Xavier	X	
11	CORBEL	Jean-Charles	X	HDR
12	DELALANDE	Olivier		
13	DELMAIL	David		HDR
14	DION	Sarah	X	
15	DOLLO	Gilles	X	HDR
16	GICQUEL	Thomas	X	X
17	GILOT	David		HDR
18	GOUAULT	Nicolas		HDR
19	HITTI	Eric		
20	JEAN	Mickaël	X	
21	JOANNES	Audrey		
22	LECURIEUR	Valérie		HDR
23	LE FERREC	Eric	X	
24	LE GALL-DAVID	Sandrine		
25	LE PABIC	Hélène		
26	LEGOUIN-GARGADENNEC	Béatrice		
27	LOHEZIC-LE DEVEHAT	Françoise	X	
28	MARTIN-CHOULY	Corinne		HDR
29	NOURY	Fanny		
30	PINEL-MARIE	Marie-Laure		
31	PODECHARD	Normand		
32	POTIN	Sophie	X	X
33	RENAULT	Jacques	X	HDR
34	ROUILLON	Astrid		

ASSISTANT HOSPITALO-UNIVERSITAIRE (AHU)

		Pharmacien	HDR	Hospitalo-U
1	BACLE	Astrid	X	X
2	BOUVRY	Christelle	X	X

ATER

		Pharmacien	HDR	Hospitalo-U
1	CHEBIK	Lisa	X	

LRU

		Pharmacien	HDR	Hospitalo-U
1	AFONSO	Damien		
2	VICTONI	Tatiana	X	

Remerciements

Je souhaiterais adresser mes remerciements, tout d'abord, aux membres du jury.

A Madame Isabelle MOREL, président de thèse,

Je vous remercie d'avoir accepté avec bienveillance la présidence de ma thèse. Je vous remercie également pour tout le temps que vous aurez bien voulu accorder à juger mon travail.

A Madame Kalyane BACH, directeur de thèse,

Je te remercie grandement d'avoir accepté d'encadrer mon travail, de m'avoir aiguillée sur ce projet et pour toute l'aide apportée dans l'aboutissement de celui-ci.

A Madame Delphine DRUI, membre du jury,

Je vous remercie d'avoir accepté avec autant d'entrain de faire partie des membres du jury et de prendre le temps d'examiner ma thèse.

A Monsieur Damien MASSON, membre du jury,

Je te remercie d'avoir accepté de faire partie des membres du jury. Merci pour ton enthousiasme et ton implication autour de ce projet.

A Monsieur Christian RENAUD, membre du jury,

Je te remercie d'avoir accepté d'être membre de mon jury. Merci encore pour ta grande disponibilité, ton aide technique et pour tout l'investissement consacré au développement de cette méthode.

Je tiens ensuite à remercier tous ceux qui ont participé de près ou de loin à l'élaboration de ce projet, Justine BLIN, interne en biologie médicale, et Alexandre STOERKLER, étudiant en pharmacie, pour avoir initié ces travaux, les biologistes – Kalyane, Nolwenn, Damien, Aurore, Hélène, Thomas - et les techniciens du laboratoire de biochimie du CHU de Nantes, et notamment l'équipe du secteur hormonologie – Evelyne, Lucie, Jérôme, Blandine, Marine -, mes co-internes, etc...

Merci aux membres de ma famille, qui sont si importants pour moi et que j'aime tellement, même si je ne le montre pas toujours : Papa, Maman, pour votre présence et votre soutien au quotidien depuis le début, ma sœur Jade, que j'aurais souvent énervée et qui n'aura pas manqué de me rendre la pareille, mais avec qui les rapports sont bien meilleurs depuis son déménagement à Paris (merci pour le squat gratuit !), Boubou, mon petit chat, que j'aime imaginer me regarder de là-haut et qui était toujours là pour « m'aider dans mes révisions », Orangeade qui elle continue de « m'assister » en ronronnant sur mes genoux mais qui sabote parfois mon travail...

Merci à mes amis de la fac, Hélène, Clémence, Anne-Solenne, Laura, Antonin, Anne-Laure et Antoine (on peut te compter dans notre groupe maintenant), pour tous les bons moments passés ensemble et ceux qui viendront encore, pour les souvenirs inoubliables et les liens qui restent malgré la distance et les chemins qui divergent.

Merci à Coralie, Caroline et Yoann, avec qui j'aurai passé de très bons moments (le tour du monde des restos restera gravé dans ma mémoire), avec qui j'aurai eu des fous rires comme il ne m'en est pas arrivé souvent (un peacock !!).

Merci à Caroline, mon amie d'enfance. Le temps passe, tu es toujours là, et on se marre toujours autant (je suis désolée mais j'ai une image dans un hôtel coréen qui m'est subitement revenue en tête... mais chut, je ne dis rien !).

Merci à mes amies de l'autre bout de la France, Margot et Flore (est-ce que vous savez comment on fait pour récolter les papayes ??), qui me « soutiennent » quotidiennement avec leurs photos de bouffe et de bar à vins. Merci d'être présentes et merci pour vos encouragements (mention spéciale à Flore : je ne sais pas si je dois te remercier pour les spams, les conversations endiablées sur le thé et les cookies, etc... alors que j'étais censée écrire ma thèse, mais on dirait que ça l'a fait quand même !).

Merci d'être entrés dans ma vie. Je vous aime.

Enfin, petite dédicace à mon groupe préféré, 방탄소년단, dont les chansons accompagnent souvent mes pas et m'aident à avancer dans la vie.

Serment de Galien

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

D'honorer ceux qui m'ont instruit 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 d'opprobre et méprisé de mes confrères si j'y manque.

Table des matières

LISTE DES ANNEXES.....	Page 10
LISTE DES FIGURES.....	Page 13
LISTE DES TABLEAUX.....	Page 14
LISTE DES ABREVIATIONS.....	Page 16
INTRODUCTION.....	Page 17
I – PHEOCHROMOCYTOMES ET PARAGANGLIOMES.....	Page 18
1 – Définition.....	Page 18
2 – Epidémiologie.....	Page 19
3 – Physiopathologie et manifestations cliniques.....	Page 19
1) Métabolisme des catécholamines.....	Page 19
a) Définition.....	Page 19
b) Synthèse.....	Page 20
c) Stockage, sécrétion et recapture.....	Page 21
d) Dégradation.....	Page 22
2) Manifestations cliniques.....	Page 24
4 – Diagnostic.....	Page 25
1) Diagnostic biologique.....	Page 25
a) Dosage des catécholamines et dérivés méthoxylés plasmatiques et urinaires.....	Page 25
b) Dosage de la chromogranine A.....	Page 26
2) Imagerie.....	Page 26
3) Génétique.....	Page 27
a) Formes familiales syndromiques des phéochromocytomes et paragangliomes.....	Page 27
I – Néoplasie endocrinienne multiple de type 2.....	Page 27
II – Maladie de von Hippel-Lindau.....	Page 27
III – Neurofibromatose de type 1 ou maladie de von Recklinghausen.....	Page 27
b) Formes familiales non syndromiques des phéochromocytomes et paragangliomes.....	Page 28
I – Mutations des gènes <i>SDHx</i>	Page 28
II – Mutation du gène <i>TMEM127</i>	Page 28
III – Autres mutations.....	Page 28
c) Recommandations concernant le test génétique.....	Page 29
4) Anatomico-pathologie.....	Page 29
5 – Traitement et surveillance.....	Page 29
6 – Aparté : les neuroblastomes.....	Page 30
II – DOSAGE DES CATECHOLAMINES ET DERIVES METHOXYLES URINAIRES PAR CHROMATOGRAPHIE LIQUIDE HAUTE PERFORMANCE COUPLEE A LA SPECTROMETRIE DE MASSE EN TANDEM.....	Page 31
1 – Chromatographie liquide haute performance couplée à la spectrométrie de masse en tandem.....	Page 31
1) Chromatographie liquide haute performance.....	Page 31
a) Principe de la chromatographie.....	Page 31
b) Chromatographie liquide haute performance.....	Page 32
I – Chromatographie sur colonne.....	Page 32
II – Chromatographie liquide haute performance.....	Page 33
c) Détection.....	Page 33
2) Spectrométrie de masse en tandem.....	Page 35
a) Principe.....	Page 35
b) Présentation de l'appareil.....	Page 35
I – Sources d'ionisation.....	Page 35

II – Analyseur.....	Page 37
III – Détecteur.....	Page 37
c) Modes d'acquisition du spectromètre de masse en tandem.....	Page 37
I – Balayage des ions fils.....	Page 38
II – Balayage des ions parents.....	Page 38
III – Balayage en perte de neutres.....	Page 38
IV – Balayage en MRM.....	Page 38
3) Théorie et utilisation en pratique.....	Page 39
2 – Validation de méthode.....	Page 40
1) Matériel et méthode.....	Page 40
a) Gamme, contrôles et échantillons.....	Page 40
I – Gamme et contrôles.....	Page 40
II – Recueil urinaire et échantillons.....	Page 41
b) Mélange essai et composés deutérés.....	Page 41
c) Traitement des échantillons.....	Page 41
d) Matériel et analyse.....	Page 42
I – Solutions et solvants.....	Page 42
II – Appareillage.....	Page 42
III – Intégration des résultats bruts.....	Page 42
IV – Traitement des données.....	Page 42
2) Résultats.....	Page 43
a) Détermination des transitions par infusions et mélange essai.....	Page 43
b) Conditions d'extraction et mode opératoire.....	Page 47
c) Répétabilité.....	Page 47
d) Reproductibilité.....	Page 49
e) Etendue de mesure et linéarité.....	Page 50
I – Limite de quantification.....	Page 50
II – Limite de détection.....	Page 51
III – Linéarité.....	Page 51
IV – Limite supérieure de linéarité.....	Page 53
V – Domaine de mesure.....	Page 54
f) Contaminations.....	Page 54
g) Effets matrice.....	Page 55
h) Comparaison de méthodes.....	Page 56
I – Méthode de Passing-Bablok.....	Page 57
II – Méthode de Bland-Altman.....	Page 59
III – Cas particulier de la dopamine.....	Page 61
i) Intervalles de référence.....	Page 61
j) Stabilité.....	Page 63
I – Stabilité des échantillons traités.....	Page 63
II – Stabilité des échantillons urinaires natifs.....	Page 67
III – Stabilité des réactifs.....	Page 71
k) Linéarité : validité des dilutions.....	Page 72
III – INFLUENCE DU PH URINAIRE.....	Page 76
1 – Objectif.....	Page 76
2 – Matériel et méthode.....	Page 76
1) Recueil urinaire.....	Page 76
2) Préparation des échantillons.....	Page 76
3 – Résultats.....	Page 78
4 – Discussion.....	Page 82
IV – INTERFERENCES ALIMENTAIRES ET MEDICAMENTEUSES.....	Page 84
1 – Interférences dues au stress.....	Page 84
2 – Interférences médicamenteuses.....	Page 85
1) Interférences pharmacodynamiques.....	Page 85
2) Interférences analytiques.....	Page 88

a) Suppression ou amplification ionique.....	Page 89
b) Réactions croisées entre ions.....	Page 91
c) Fragmentation intra-source.....	Page 92
d) Interférences isobariques.....	Page 93
e) Problématique de l'épinéphrine.....	Page 93
3 – Interférences alimentaires.....	Page 96
1) Objectif.....	Page 96
2) Choix des aliments à considérer.....	Page 96
3) Interférences alimentaires : consommation d'un aliment isolé.....	Page 97
a) Matériel et méthode.....	Page 97
I – Détermination des proportions d'aliments à ingérer.....	Page 97
II – Recrutement.....	Page 99
III – Conservation des échantillons urinaires.....	Page 100
b) Résultats.....	Page 100
4) Interférences alimentaires : régime varié et riche en aliments contenant des catécholamines.....	Page 103
a) Matériel et méthode.....	Page 103
I – Recrutement.....	Page 103
II – Conservation des échantillons urinaires.....	Page 103
b) Résultats.....	Page 103
5) Discussion.....	Page 105
V – APPLICATION CLINIQUE AU CHU DE NANTES.....	Page 106
1 – Diagnostic et suivi des phéochromocytomes : comparaison aux résultats obtenus par Biomnis.....	Page 106
2 – Rétrospectives sur les deux années de dosage en « routine » au CHU de Nantes.....	Page 111
CONCLUSION.....	Page 114
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	Page 116

Liste des annexes

Annexe 1 : Mode opératoire : dosage des catécholamines et des dérivés méthoxylés libres urinaires par LC-MS/MS.....	Page 121
Annexe 2 : Fiches d'information, de consentement et de prélèvement à l'attention des sujets sains pour définition des intervalles de référence.....	Page 126
Annexe 3 : Utilisation du logiciel Analyst dans le cadre du dosage des catécholamines et des dérivés méthoxylés libres urinaires par LC-MS/MS.....	Page 129
Annexe 4 : Reproductibilité. Coefficients de variation pour chaque catécholamine et dérivé méthoxylé urinaires aux deux niveaux de contrôle au cours de l'année 2017.....	Page 134
Annexe 5 : Limites de quantification. Résultats obtenus après dilutions du point de gamme n°2, G2.....	Page 135
Annexe 6 : Linéarité. Concentrations obtenues après cinq dosages successifs de chaque point de gamme.....	Page 136
Annexe 7 : Linéarité. Concentrations moyennes, écart-types et coefficients de variation obtenus après cinq dosages successifs de chaque point de gamme.....	Page 137
Annexe 8 : Linéarité. Droites de calibration des catécholamines urinaires.....	Page 138
Annexe 9 : Contamination inter-échantillons.....	Page 139
Annexe 10 : Dopamine : comparaison de méthode en concentrations.....	Page 140
Annexe 11 : Dopamine : comparaison de méthode en quantités.....	Page 141
Annexe 12 : Norépinéphrine : comparaison de méthode en concentrations.....	Page 142
Annexe 13 : Norépinéphrine : comparaison de méthode en quantités.....	Page 143
Annexe 14 : Epinéphrine : comparaison de méthodes en concentrations.....	Page 144
Annexe 15 : Epinéphrine : comparaison de méthodes en quantités.....	Page 145
Annexe 16 : 3-Méthoxytyramine : comparaison de méthodes en concentrations.....	Page 146
Annexe 17 : Normétanéphrine : comparaison de méthodes en concentrations.....	Page 147
Annexe 18 : Métanéphrine : comparaison de méthodes en concentrations.....	Page 148
Annexe 19 : Comparaison de méthodes : cas particulier de la dopamine.....	Page 149
Annexe 20 : Liste des médicaments interférents et des aliments à exclure du régime alimentaire pendant 72 heures en vue du recueil urinaire pour détermination des valeurs de référence des catécholamines et des dérivés méthoxylés libres urinaires.....	Page 150
Annexe 21 : Résultats obtenus après dosage des catécholamines et dérivés méthoxylés urinaires chez les 41 volontaires sains.....	Page 151
Annexe 22 : Stabilité des urines traitées. Aires sous la courbe de la dopamine et de la dopamine-D4, et concentrations en dopamine à J0, J1, J2, J7 et J30.....	Page 153
Annexe 23 : Stabilité des urines traitées. Aires sous la courbe de la norépinéphrine et de la norépinéphrine-D6, et concentrations en norépinéphrine à J0, J1, J2, J7 et J30.....	Page 156
Annexe 24 : Stabilité des urines traitées. Aires sous la courbe de l'épinéphrine et de l'épinéphrine-D6, et concentrations en épinéphrine à J0, J1, J2, J7 et J30.....	Page 159
Annexe 25 : Stabilité des urines traitées. Aires sous la courbe de la 3-méthoxytyramine et de la 3-méthoxytyramine-D4 à J0, J1, J2, J7 et J30.....	Page 161
Annexe 26 : Stabilité des urines traitées. Aires sous la courbe de la normétanéphrine et de la normétanéphrine-D3 à J0, J1, J2, J7 et J30.....	Page 163
Annexe 27 : Stabilité des urines traitées. Aires sous la courbe de la métanéphrine et de la métanéphrine-D3 à J0, J1, J2, J7 et J30.....	Page 165
Annexe 28 : Stabilité des urines natives. Aires sous la courbe de la dopamine et de la dopamine-D4, et concentrations en dopamine pour cinq urines pures et diluées au dixième à J0, J2, J7, J14 et J30.....	Page 167
Annexe 29 : Stabilité des urines natives. Aires sous la courbe de la norépinéphrine et de la norépinéphrine-D6, et concentrations en norépinéphrine pour cinq urines pures et diluées au dixième à J0, J2, J7, J14 et J30.....	Page 168

Annexe 30 : Stabilité des urines natives. Aires sous la courbe de la 3-méthoxytyramine et de la 3-méthoxytyramine-D4 pour cinq urines pures et diluées au dixième à J0, J2, J7, J14 et J30.....	Page 169
Annexe 31 : Stabilité des urines natives. Aires sous la courbe de la normétanéphrine et de la normétanéphrine-D3 pour cinq urines pures et diluées au dixième à J0, J2, J7, J14 et J30.....	Page 170
Annexe 32 : Stabilité des urines natives. Aires sous la courbe de la métanéphrine et de la métanéphrine-D3 pour cinq urines pures et diluées au dixième à J0, J2, J7, J14 et J30.....	Page 171
Annexe 33 : Concentrations en catécholamines pour dix échantillons urinaires dosés initialement (t_0) et à un temps t	Page 172
Annexe 34 : Mode opératoire et résultats du test de stabilité du complexant.....	Page 173
Annexe 35 : Dilutions : concentrations en dopamine et CV (n=188).....	Page 175
Annexe 36 : Dilutions : concentrations en norépinéphrine et CV (n=8).....	Page 182
Annexe 37 : Dilutions : concentrations en épinéphrine et CV (n=3).....	Page 182
Annexe 38 : Dopamine : résultats du test de l'influence du pH urinaire.....	Page 183
Annexe 39 : Norépinéphrine : résultats du test de l'influence du pH urinaire.....	Page 184
Annexe 40 : Données sur les interférences analytiques vis-à-vis des catécholamines et des dérivés méthoxylés dans le plasma.....	Page 185
Annexe 41 : Fiche de recueil et d'information et fiche d'entrée d'étude fournies aux douze volontaires sains dans le cadre d'une recherche d'interférences dues à un aliment en particulier.....	Page 186
Annexe 42 : Concentrations en catécholamines et dérivés méthoxylés obtenues avant et après régime riche en l'aliment considéré.....	Page 188
Annexe 43 : Chromatogrammes des catécholamines et dérivés méthoxylés avant et après consommation d'agrumes.....	Page 189
Annexe 44 : Chromatogrammes des catécholamines et dérivés méthoxylés avant et après consommation de kiwis.....	Page 190
Annexe 45 : Chromatogrammes des catécholamines et dérivés méthoxylés avant et après consommation de vanille.....	Page 191
Annexe 46 : Chromatogrammes des catécholamines et dérivés méthoxylés avant et après consommation de bananes.....	Page 192
Annexe 47 : Chromatogrammes des catécholamines et dérivés méthoxylés avant et après consommation d'ananas.....	Page 193
Annexe 48 : Chromatogrammes des catécholamines et dérivés méthoxylés avant et après consommation de gruyère.....	Page 194
Annexe 49 : Chromatogrammes des catécholamines et dérivés méthoxylés avant et après consommation de tomates.....	Page 195
Annexe 50 : Chromatogrammes des catécholamines et dérivés méthoxylés avant et après consommation d'avocats.....	Page 196
Annexe 51 : Chromatogrammes des catécholamines et dérivés méthoxylés avant et après consommation de noix.....	Page 197
Annexe 52 : Chromatogrammes des catécholamines et dérivés méthoxylés avant et après consommation de chocolat.....	Page 198
Annexe 53 : Chromatogrammes des catécholamines et dérivés méthoxylés avant et après consommation de café.....	Page 199
Annexe 54 : Chromatogrammes des catécholamines et dérivés méthoxylés avant et après consommation de thé.....	Page 200
Annexe 55 : Quantités d'HVA et VMA urinaires chez l'adulte suite à un régime riche en l'aliment considéré.....	Page 201
Annexe 56 : Approche clinique devant une élévation des métanéphrines plasmatiques chez des patients suspectés d'avoir une forme sporadique de phéochromocytome.....	Page 202
Annexe 57 : Fiche de recueil et d'information fournie aux dix volontaires sains dans le cadre d'une recherche d'interférences dues à un régime varié.....	Page 203

Annexe 58 : Comparaison des valeurs des catécholamines urinaires chez l'enfant entre notre laboratoire et celui de Biomnis et comparaison au contexte clinique. Données de l'année 2018.....Page 205

Annexe 59 : Catécholamines urinaires : résultats patients de 2016 à septembre 2018 (échelle logarithmique).....Page 207

Liste des figures

Figure 1 : Localisations anatomiques des paraganglions. A) Au niveau de la tête et du cou (système parasymphatique). B) Au niveau de la région thoraco-abdomino-pelvienne (système sympathique).....	Page 18
Figure 2 : Structure moléculaire de base des catécholamines.....	Page 19
Figure 3 : Biosynthèse des catécholamines.....	Page 21
Figure 4 : Catabolisme des catécholamines.....	Page 23
Figure 5 : Séparation des composés au cours de leur passage à travers une colonne chromatographique.....	Page 32
Figure 6 : Appareillage d'un système de chromatographie liquide haute performance.....	Page 34
Figure 7 : Principe de l'ESI.....	Page 36
Figure 8 : Schéma d'un analyseur triple quadripôle.....	Page 37
Figure 9 : Principe de fonctionnement du mode MRM.....	Page 38
Figure 10 : Scan obtenu après infusion d'une solution pure de dopamine dans le spectromètre de masse. Intensité en nombre de coups (counts) en fonction du m/z	Page 44
Figure 11 : Chromatogramme obtenu après injection d'un mélange essai constitué des six analytes d'intérêt et des six standards internes respectifs.....	Page 45
Figure 12 : Linéarité. Droites de calibration des dérivés méthoxylés urinaires.....	Page 52
Figure 13 : Comparaison de méthodes : droites de régression de Passing-Bablok (dérivés méthoxylés).....	Page 58
Figure 14 : Comparaison de méthodes : graphiques de Bland-Altman (dérivés méthoxylés).....	Page 60
Figure 15 : Préparation des échantillons pour le test de l'influence du pH urinaire.....	Page 77
Figure 16 : Mécanismes d'interférences pharmacologiques avec les catécholamines et les dérivés méthoxylés urinaires.....	Page 85
Figure 17 : Chromatogrammes de l'épinéphrine (point de gamme n°6). A) Lors de la validation de méthode (05/2016). B) Récemment (02/2019).....	Page 94
Figure 18 : Dérivés méthoxylés urinaires : résultats patients de 2016 à septembre 2018 (échelle logarithmique). Intervalles de référence bornés par les traits épais noirs.....	Page 111

Liste des tableaux

Tableau 1 : Critères devant faire rechercher un phéochromocytome ou un paragangliome.....	Page 24
Tableau 2 : Caractéristiques techniques de l'appareillage utilisé pour le dosage des catécholamines et dérivés méthoxylés urinaires par LC-MS/MS.....	Page 42
Tableau 3 : Choix des transitions et des paramètres physiques des six analytes d'intérêt et leurs standards internes deutérés respectifs.....	Page 46
Tableau 4 : Répétabilité (catécholamines).....	Page 48
Tableau 5 : Répétabilité (dérivés méthoxylés).....	Page 48
Tableau 6 : Reproductibilité (catécholamines).....	Page 49
Tableau 7 : Reproductibilité (dérivés méthoxylés).....	Page 49
Tableau 8 : Limites de quantification et limites de détection.....	Page 51
Tableau 9 : Limites supérieures de linéarité (catécholamines).....	Page 53
Tableau 10 : Limites supérieures de linéarité (dérivés méthoxylés).....	Page 53
Tableau 11 : Etendues de mesure (en µg/L) des catécholamines et dérivés méthoxylés urinaires.....	Page 54
Tableau 12 : Contaminations inter-échantillons.....	Page 55
Tableau 13 : Effets matrice (catécholamines).....	Page 56
Tableau 14 : Effets matrice (dérivés méthoxylés).....	Page 56
Tableau 15 : Intervalles de référence chez l'adulte définis pour chacun des six analytes grâce à Reference Value Advisor (n= 41 volontaires sains).....	Page 62
Tableau 16 : Stabilité des urines traitées. Concentrations en 3-méthoxytyramine aux temps J0, J1, J2, J7 et J30.....	Page 64
Tableau 17 : Stabilité des urines traitées. Concentrations en normétanéphrine aux temps J0, J1, J2, J7 et J30.....	Page 65
Tableau 18 : Stabilité des urines traitées. Concentrations en métanéphrine aux temps J0, J1, J2, J7 et J30.....	Page 66
Tableau 19 : Stabilité des urines natives. Concentrations en 3-méthoxytyramine pour chacune des cinq urines dosées pures et diluées au dixième et à chacun des différents temps.....	Page 68
Tableau 20 : Stabilité des urines natives. Concentrations en normétanéphrine pour chacune des cinq urines dosées pures et diluées au dixième et à chacun des différents temps.....	Page 68
Tableau 21 : Stabilité des urines natives. Concentrations en métanéphrine pour chacune des cinq urines dosées pures et diluées au dixième et à chacun des différents temps.....	Page 69
Tableau 22 : Concentrations en 3-méthoxytyramine pour dix échantillons urinaires dosés initialement et à un temps t.....	Page 70
Tableau 23 : Concentrations en normétanéphrine pour dix échantillons urinaires dosés initialement et à un temps t.....	Page 70
Tableau 24 : Concentrations en métanéphrine pour dix échantillons urinaires dosés initialement et à un temps t.....	Page 71
Tableau 25 : Durées de conservation possibles des échantillons et réactifs.....	Page 72
Tableau 26 : Dilutions : concentrations en 3-méthoxytyramine et CV.....	Page 73
Tableau 27 : Dilutions : concentrations en normétanéphrine et CV.....	Page 74
Tableau 28 : Dilutions : concentrations en métanéphrine et CV.....	Page 74
Tableau 29 : 3-méthoxytyramine : résultats du test de l'influence du pH urinaire.....	Page 79
Tableau 30 : Normétanéphrine : résultats du test de l'influence du pH urinaire.....	Page 80
Tableau 31 : Métanéphrine : résultats du test de l'influence du pH urinaire.....	Page 81
Tableau 32 : Circonstances cliniques associées à une hypertension sympathique.....	Page 84
Tableau 33 : Principales classes pharmacologiques impliquées dans la physiopathologie des pseudo-phéochromocytomes médicamenteux.....	Page 87

Tableau 34 : Principaux médicaments responsables d'interférences analytiques par fausse élévation des catécholamines et dérivés méthoxylés urinaires par technique de dosage par HPLC-ECD.....	Page 89
Tableau 35 : Drogues et médicaments pouvant être responsables d'interférences analytiques dans le dosage des catécholamines et des dérivés méthoxylés urinaires.....	Page 95
Tableau 36 : Taux en composés aminés dans les aliments interférents par gramme de nourriture.....	Page 98
Tableau 37 : Taux en composés aminés pour une unité en aliment interférent.....	Page 98
Tableau 38 : Seuil limite de positivité dans les urines pour chacune des catécholamines et leurs dérivés méthoxylés.....	Page 99
Tableau 39 : Quantités minimales d'aliment à ingérer pour observer une interférence.....	Page 99
Tableau 40 : Quantité en catécholamines et dérivés méthoxylés avant (Qav) et après (Qap) régime riche en l'aliment considéré.....	Page 100
Tableau 41 : Quantité en catécholamines et dérivés méthoxylés urinaires après régime riche en l'aliment considéré.....	Page 102
Tableau 42 : Quantité en catécholamines et dérivés méthoxylés urinaires après régime varié en aliments riches en catécholamines.....	Page 104
Tableau 43 : Comparaison des valeurs des dérivés méthoxylés urinaires chez l'adulte entre notre laboratoire et celui de Biomnis et comparaison au contexte clinique. Données de l'année 2018.....	Pages 107-108

Liste des abréviations

Par ordre d'apparition dans le texte :

LC-MS/MS : chromatographie liquide haute-performance couplée à une détection par spectrométrie de masse en tandem
 CHU : centre hospitalier et universitaire
 L-DOPA : L-dihydroxyphénylalanine
 DBH : dopamine β -hydroxylase
 PNMT : phényléthanolamine *N*-méthyltransférase
 VMAT : vesicular mono-amine transporter
 ATP : adénosine triphosphate
 COMT : catécholamine *O*-méthyltransférase
 MAO : monoamine oxydase
 HVA : acide homovanillique
 VMA : acide vanylmandélique
 IRM : imagerie par résonance magnétique
¹²³I-MIBG : ¹²³I-méta-iodobenzylguanidine
 TEP : tomographie par émission de positons
 NEM : néoplasie endocrinienne multiple
 GDNF : glial-derived nerve growth
 VHL : maladie de von Hippel-Lindau
 HIF : hypoxia inducible factors
 NF1 : neurofibromatose de type 1
 SDH : succinate-déshydrogénase
 NGF : nerve growth factor
 HPLC : chromatographie liquide haute performance
 UPLC : chromatographie liquide ultra haute performance
 FAB : fast atom bombardment
 ESI : electrospray ionization
 APCI : atmospheric pressure chemical ionization
 MALDI : matrix assisted laser desorption ionization
 MRM : multi reaction monitoring
 COFRAC : comité français d'accréditation
 SPE : solid phase extraction
 DP : declustering potential
 EP : entrance potential
 CE : collision energy
 CXP : collision cell exit potential
 CIQ : contrôle interne de qualité
 CV : coefficient de variation
 SFBC : société française de biologie clinique
 FDA : food and drug administration
 LOQ : limite de quantification
 LOD : limite de détection
 EMA : agence européenne du médicament
 HCl : acide chlorhydrique
 DHPG : dihydroxyphénylglycol
 4N : quatre fois la limite supérieure des valeurs de référence
 HPLC-ECD : chromatographie liquide haute performance couplée à une détection électro-chimique
 5-ASA : acide 5-aminosalicylique
 MDMA : 3,4-méthylènedioxymétamphétamine
 GC-MS : chromatographie gazeuse couplée à une détection par spectrométrie de masse
 2N : deux fois la limite supérieure des valeurs de référence

Introduction

Les phéochromocytomes et paragangliomes, ainsi que les neuroblastomes, sont des pathologies neuroendocrines rares qui peuvent être redoutables si elles ne sont pas dépistées suffisamment tôt. Le travail réalisé dans le cadre de cette thèse a pour objectif d'implémenter, sur le site du CHU de Nantes, une méthode de dosage permettant la recherche et la quantification des catécholamines et des dérivés méthoxylés dans les urines, analytes significativement élevés au cours des pathologies citées ci-dessus.

Ce manuscrit sera divisé de la façon suivante :

Tout d'abord, il y aura une brève présentation, avec des rappels physiopathologiques, sur les phéochromocytomes et paragangliomes et sur les catécholamines. Ensuite, nous parlerons de la mise au point et de la validation de la méthode de dosage par spectrométrie de masse des catécholamines et dérivés méthoxylés urinaires au CHU de Nantes. Nous aurons notamment à cœur de présenter deux aspects nécessaires des conditions pré-analytiques : la prise en compte du pH urinaire dans l'interprétation qui peut être faite des résultats, et les risques de surestimation dus aux interférences alimentaires. Nous terminerons par une présentation des premières données sur le CHU de Nantes, avant de faire une conclusion sur le travail réalisé.

I - Phéochromocytomes et paragangliomes

1 - Définition

Les paragangliomes sont des tumeurs qui se développent aux dépens des paraganglions, structures neuroendocrines issues de la différenciation des crêtes neurales. Les paraganglions appartiennent au système nerveux autonome. Il existe ainsi des paraganglions parasympathiques que l'on rencontre principalement au niveau de la tête et du cou, et des paraganglions sympathiques rencontrés le long de la moelle épinière dans la région thoraco-abdomino-pelvienne (figure 1).

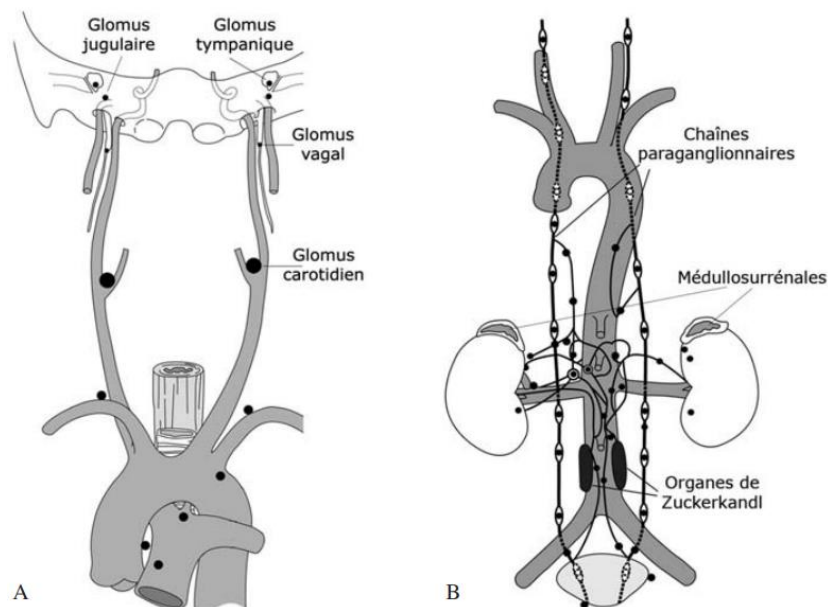


Figure 1 : Localisations anatomiques des paraganglions. A) Au niveau de la tête et du cou (système parasympathique). B) Au niveau de la région thoraco-abdomino-pelvienne (système sympathique) (1).

La médullo-surrénale, zone médullaire de la glande surrénale, peut aussi être assimilée à un paraganglion appartenant au système nerveux sympathique, puisqu'elle se compose de neurones différenciés (cellules chromaffines) qui réagissent en réponse aux stimuli nerveux sympathiques orchestrés par les centres bulbaires en sécrétant des hormones, les catécholamines. Les tumeurs de la médullo-surrénale sont désignées sous le terme de phéochromocytomes - du grec *phaios* signifiant « sombre » et *chroma* signifiant « couleur », désignant l'aspect de ces cellules tumorales après coloration aux sels de chrome.

On distingue donc les phéochromocytomes d'origine surrénalienne, des paragangliomes d'origine extra-surrénalienne.

Ces tumeurs sont dites fonctionnelles lorsqu'elles sécrètent des catécholamines de manière autonome et inappropriée.

2 - Epidémiologie

L'incidence des phéochromocytomes et des paragangliomes est de 0,1% chez les patients hypertendus. La prévalence, dans nos pays occidentaux, où l'hypertension concerne 30% de la population générale, peut donc être estimée entre 1/4500 et 1/1700, avec une incidence annuelle de 3 à 8 cas pour un million. Généralement, ils se manifestent chez les personnes âgées de 40 à 50 ans sans distinguo entre hommes et femmes. Ce sont des tumeurs malignes dans 10% des cas, avec des métastases découvertes d'emblée au diagnostic initial. Dans 40% des cas, une origine familiale ou génétique est retrouvée. Elles sont localisées dans 90% des cas au niveau de la médullo-surrénale (c'est alors qu'on parle de phéochromocytome) et dans 10% des cas, c'est une localisation extra-surrénalienne, principalement en sous-diaphragmatique (1).

3 - Physiopathologie et manifestations cliniques

1) Métabolisme des catécholamines

a) Définition

Les catécholamines sont des dérivés 3,4-dihydroxyphényléthylamine qui sont constituées d'un noyau catéchol et d'un résidu éthylamine. Elles possèdent donc une fonction amine et deux fonctions hydroxyles (figure 2).

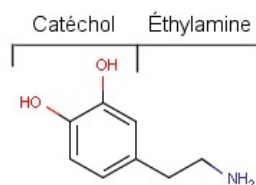


Figure 2 : Structure moléculaire de base des catécholamines.

On rassemble sous le terme de catécholamines les trois molécules suivantes : la dopamine, la norépinéphrine – aussi connue sous le nom de noradrénaline – et l'épinéphrine – aussi

connue sous le nom d'adrénaline. Ces substances sont essentielles à la régulation de nombreux processus physiologiques mais jouent aussi un rôle important dans le développement de maladies neurobiologiques, psychiatriques, endocrines et cardiovasculaires (2) (3).

b) Synthèse

Les réactions biochimiques qui conduisent à la production des catécholamines ont lieu dans diverses cellules à travers tout l'organisme. Cela comprend principalement les systèmes nerveux central et périphérique, le système neuro-endocrinien, mais aussi du tractus gastro-intestinal et des reins, où des cellules possèdent la machinerie enzymatique nécessaire à la production de ces molécules (4).

La L-tyrosine, isomère lévogyre de la tyrosine et acide aminé non essentiel – pouvant être apporté par l'alimentation ou synthétisé par le foie par hydroxylation de la phénylalanine -, sert de substrat initial à la synthèse des catécholamines.

La figure 3 résume les mécanismes de biosynthèse des catécholamines. Sous l'effet de la tyrosine-hydroxylase, enzyme limitante et donc indispensable à leur biosynthèse (5), la L-tyrosine est convertie en L-dihydroxyphénylalanine (L-DOPA). L'expression tissulaire de la tyrosine-hydroxylase est presque exclusivement présente au niveau des neurones dopaminergiques et noradrénergiques du système nerveux central, des nerfs sympathiques du système nerveux périphérique et des cellules chromaffines de la médullo-surrénale et des paraganglions. On la retrouve aussi dans les cellules entérochromaffines des tumeurs endocrines gastro-intestinales (6). La L-DOPA subit alors une étape de décarboxylation par l'intermédiaire de la DOPA-décarboxylase, ce qui aboutit à la production de dopamine. La dopamine peut ensuite être métabolisée en norépinéphrine sous l'effet de la dopamine β -hydroxylase (DBH), une enzyme qu'on ne retrouve que dans les vésicules des cellules productrices d'épinéphrine et de norépinéphrine. Puis, dans les cellules chromaffines de la médullo-surrénale exclusivement, la norépinéphrine est convertie en épinéphrine grâce à une enzyme cytosolique, la phényléthanolamine *N*-méthyltransférase (PNMT). L'expression de cette dernière enzyme est négligeable dans les paraganglions, ce qui explique pourquoi il n'y a pas de production d'épinéphrine à ce niveau-là, et seule la norépinéphrine, qui joue le rôle de neuromédiateur, est synthétisée (7).

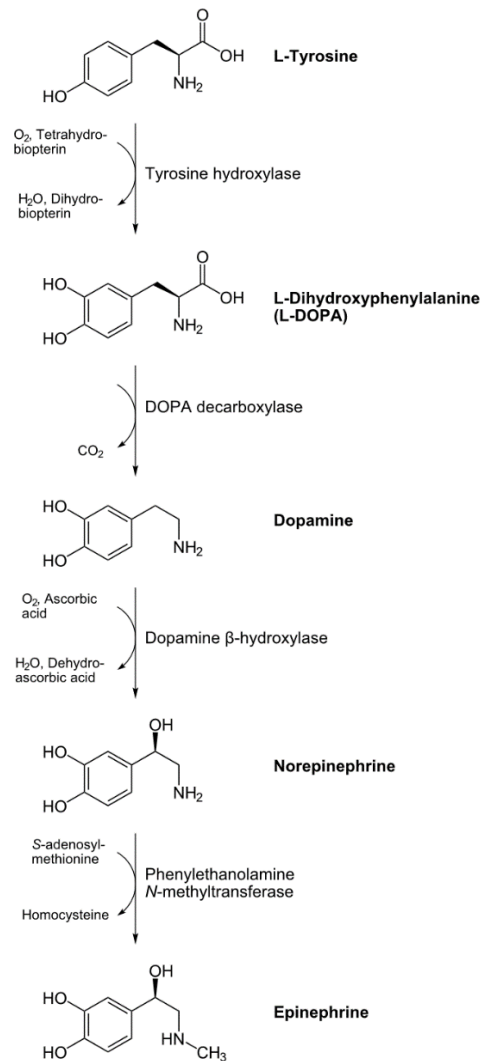


Figure 3 : Biosynthèse des catécholamines.

c) Stockage, sécrétion et recapture

La translocation des catécholamines dans les vésicules de stockage intra-cellulaires des cellules chromaffines de la médullo-surrénale et dans les vésicules sécrétoires des terminaisons sympathiques est favorisée par deux transporteurs, VMAT1 et VMAT2 (*vesicular mono-amine transporter 1 et 2*) (8). Dans la cellule, un équilibre dynamique se crée entre la fuite passive des catécholamines vers le cytoplasme de la cellule et le transport actif de ré-internalisation vésiculaire médié par les VMATs. Dans les granules de stockage, les catécholamines partagent l'espace avec d'autres substances parmi lesquelles de l'adénosine triphosphate (ATP), des peptides et protéines dont les plus connues sont les chromogranines (9). Les chromogranines sont des composants ubiquitaires des vésicules sécrétoires et leur présence largement répandue parmi les tissus endocriniens a mené à leur dosage dans le

plasma comme marqueurs sensibles, bien que relativement non spécifiques, des tumeurs neuro-endocrines, dont les phéochromocytomes et paragangliomes (2).

Dans la médullo-surrénale, l'épinéphrine constitue 80% des catécholamines stockées par les granules chromaffines, le reste étant de la norépinéphrine. A l'inverse, au niveau des vésicules synaptiques des neurones noradrénergiques périphériques et centraux, c'est la norépinéphrine qui constitue le neuromédiateur principal.

L'exocytose des catécholamines est déclenchée par propagation de l'influx nerveux issu des neurones préganglionnaires acétylcholinergiques après stimulation des récepteurs nicotiques, ou après activation des canaux sodiques dans les neurones sympathiques périphériques. Chez l'adulte, par exemple, les taux de sécrétion de l'épinéphrine sont proches de 1 mg/jour.

Après relargage dans l'espace synaptique, une partie des catécholamines est recaptée par la terminaison pré-synaptique tandis que l'autre partie diffuse dans la circulation sanguine puis subit une recapture extraneuronale en vue de leur dégradation (3). Pour bien comprendre la physiopathologie et la symptomatologie des phéochromocytomes et des paragangliomes, il faut avoir conscience des mécanismes physiologiques suivants. Les catécholamines ont un métabolisme très finement régulé et une sécrétion spécifique d'organe. Alors que la dopamine est un neurotransmetteur central majeur, peu présent dans la circulation sanguine, ses taux périphériques peuvent être très élevés dans de rares phéochromocytomes dopamino-sécrétants. La médullo-surrénale, d'un autre côté, sécrète à la fois de l'épinéphrine – en majorité - et de la norépinéphrine directement dans la circulation sanguine, mais 90% de ce qui aura été relargué sera rapidement éliminé par recapture hépatique principalement. Les paraganglions sécrètent exclusivement de la norépinéphrine, qui est le neurotransmetteur majeur du système nerveux sympathique. 90% de la norépinéphrine sécrétée par les neurones sympathiques est recapté par ces neurones, 5% est recapté par des systèmes de recapture extra-neuronaux et 5% échappe à ce processus et rejoint alors la circulation sanguine. Tous ces phénomènes, imbriqués les uns avec les autres, confèrent aux catécholamines une demi-vie dans le compartiment sanguin inférieure à deux minutes (10).

d) Dégradation

Le catabolisme des catécholamines se fait en parallèle à leur synthèse, à l'intérieur même des cellules productrices, et indépendamment de leur sécrétion (11). Ce phénomène métabolique est un élément essentiel à considérer quant aux actuelles stratégies de diagnostic biologique du phéochromocytome (1).

La dégradation des catécholamines a lieu au niveau du foie, du rein et de la médullo-surrénale. Deux enzymes interviennent principalement. Il s'agit de la catécholamine O-méthyltransférase (COMT) et de la monoamine oxydase (MAO). La COMT est responsable d'une voie majeure du catabolisme des catécholamines en catalysant une réaction d'O-méthylation de la dopamine en 3-méthoxytyramine, de la norépinéphrine en normétanéphrine, et de l'épinéphrine en métanéphrine (figure 4). Ces trois métabolites sont appelés « dérivés méthoxylés des catécholamines », ou, de façon générique « métanéphrines ». La COMT n'est pas exprimée par les neurones producteurs de catécholamines, la normétanéphrine et la métanéphrine ne sont donc produites qu'en petites quantités et seulement dans des localisations extra-neuronales, les cellules chromaffines de la médullo-surrénale étant la source de production principale. La MAO représente une voie alternative du catabolisme des catécholamines et permet de produire d'autres composés intermédiaires. Par la suite, les métabolites qui ont été pris en charge par la COMT seront métabolisés par la MAO – et inversement – aboutissant à la formation des dérivés méthoxylés terminaux urinaires, l'acide homovanillique (HVA) et l'acide vanylmandélique (VMA) (figure 4). Le dosage de ces derniers est effectué dans le cadre de la recherche de neuroblastome, tumeur se développant aux dépens des cellules issues de la crête neurale, beaucoup moins différenciées que les cellules chromaffines, les neuroblastes.

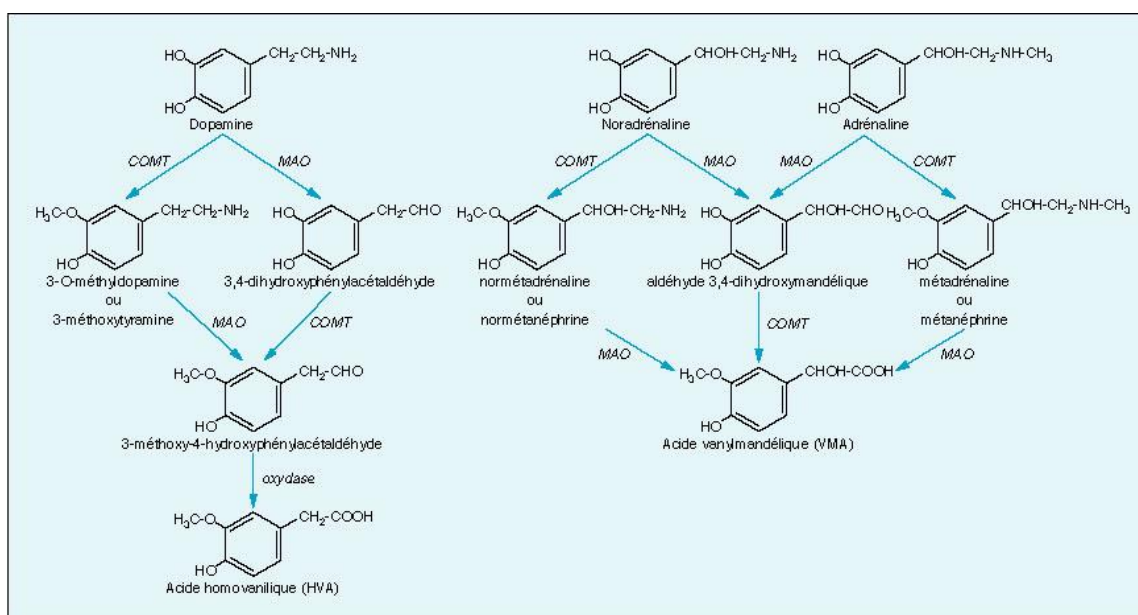


Figure 4 : Catabolisme des catécholamines (12).

Les catécholamines et les dérivés méthoxylés sont éliminés principalement par excrétion urinaire sous forme sulfo-conjuguée ou glucuro-conjuguée (2).

2) Manifestations cliniques

La symptomatologie des patients porteurs d'un phéochromocytome ou d'un paragangliome est assez hétérogène. Non seulement aspécifique, elle peut être fluctuante, voire inexistante. En effet, les symptômes observés résultant de l'hypersécrétion de catécholamines, dépendent de plusieurs paramètres, dont le caractère fonctionnel ou non de la tumeur, la fréquence et l'intensité des sécrétions qui sont autonomes mais discontinues. Les symptômes adrénergiques sont non spécifiques et parmi ceux rencontrés, on retrouvera de l'hypertension artérielle, des céphalées, des palpitations, une tachycardie, une pâleur, une anxiété, des tremblements, des douleurs thoraciques et abdominales, nausées et vomissements, une perte de poids, une intolérance à la chaleur, une hypotension orthostatique ou permanente, une constipation, etc...

Cliniquement, la présence d'une hypertension artérielle (permanente ou survenant sous la forme de crises hypertensives paroxystiques qui peuvent s'avérer fatales pour le patient (13)) associée à une triade de Ménard (présence concomitante de céphalées, sueurs et tachycardie) est très évocateur de phéochromocytome.

Environ 25% des phéochromocytomes sont de découverte fortuite. Parmi les incidentalomes surrenaliens, on dénombre 5% de phéochromocytomes (14). Ainsi, une recherche de phéochromocytome est justifiée et doit être réalisée chez les patients présentant un ou plusieurs critères parmi ceux mentionnés dans le tableau 1 ci-dessous.

- Hypertension artérielle résistante, définie comme une pression artérielle systolique supérieure ou égale à 140 mmHg et/ou une pression artérielle diastolique supérieure ou égale à 90 mmHg malgré une trithérapie antihypertensive à dose efficace contenant au moins un diurétique.
- Présence de symptômes adrénergiques.
- Labilité tensionnelle importante.
- Patient de moins de 50 ans, diabétique, hypertendu, ayant un indice de masse corporelle inférieur à 25.
- Patient porteur d'un incidentalome surrenalien.
- Présence de symptômes d'un syndrome de masse cervical, thoracique, abdominal ou pelvien.
- Patient atteint d'une maladie génétique prédisposant aux phéochromocytomes et paragangliomes.
- Patient asymptomatique mais identifié grâce au dépistage génétique familial comme porteur d'une mutation sur un gène de prédisposition aux phéochromocytomes et paragangliomes.

Tableau 1 : Critères devant faire rechercher un phéochromocytome ou un paragangliome. D'après (1).

4 - Diagnostic

1) Diagnostic biologique

a) Dosage des catécholamines et dérivés méthoxylés plasmatiques et urinaires

Le diagnostic biologique des phéochromocytomes et paragangliomes repose sur la mise en évidence, dans le sang ou les urines, de l'augmentation des concentrations des catécholamines et de leurs métabolites, les dérivés méthoxylés, en particulier puisque leur dosage est doté d'une supériorité diagnostique par rapport à celui des catécholamines. En effet, les dérivés méthoxylés des catécholamines – 3-méthoxytyramine, normétanéphrine et métanéphrine – ont une production indépendante des fluctuations de sécrétion et de relargage des catécholamines dans la circulation sanguine (15). Ainsi, le dosage des métanéphrines libres plasmatiques et des métanéphrines fractionnées urinaires rapporté à la diurèse ou à la créatininurie ont une excellente valeur prédictive positive (14). Entre le dosage des métanéphrines plasmatiques et celui des métanéphrines urinaires, il est bien évidemment plus aisé de faire une prise de sang que de faire un recueil urinaire sur 24 heures en évitant de consommer des aliments interférents pendant trois jours. Pourtant, un simple prélèvement sanguin peut ne pas être suffisant pour établir le diagnostic. En effet, dans le sang, les concentrations en catécholamines et en dérivés méthoxylés sont plus faibles et, de par leur courte demi-vie et l'existence d'un cycle nyctéméral, nous ne sommes pas non plus à l'abri de passer à côté d'un relargage important de catécholamines. De plus, le dosage des métanéphrines plasmatiques est difficile à mettre en place. Au contraire, un recueil urinaire, bien que plus contraignant, permet d'obtenir le reflet de la sécrétion en catécholamines sur une journée entière, à des taux donc plus importants que dans le sang et avec une technique plus facile à mettre en place au laboratoire. Ainsi, tandis que le dosage des métanéphrines plasmatiques offre une sensibilité élevée (16), celui des métanéphrines urinaires est très spécifique (2) (17).

On parle de dosage de métanéphrines fractionnées lorsque l'on dose spécifiquement la 3-méthoxytyramine, la normétanéphrine et la métanéphrine. Les métanéphrines libres correspondent à la fraction des métanéphrines qui ne sont pas conjuguées, et les métanéphrines totales comprennent à la fois les métanéphrines libres et les métanéphrines conjuguées. Il en est de même pour les catécholamines.

Il faut noter que les phéochromocytomes et paragangliomes ne sont pas obligatoirement producteurs des trois catécholamines. Ainsi, seuls certains paramètres peuvent être augmentés. L'expression de la PNMT dans les paragangliomes est négligeable, ce qui explique la production préférentielle de norépinéphrine dans ces tumeurs, contrairement au

phéochromocytome où on va retrouver une synthèse augmentée à la fois pour la norépinéphrine et pour l'épinéphrine (7). Par ailleurs, deux populations de cellules chromaffines ont été décrites, avec des vésicules morphologiquement distinctes stockant préférentiellement soit la norépinéphrine, soit l'épinéphrine, relarguant ces molécules différemment selon les stimuli. Il en résulte que la plupart des phéochromocytomes surrenaliens sécrètent à la fois de la norépinéphrine et de l'épinéphrine, un tiers ne produit que de la norépinéphrine, et une plus faible proportion encore ne produit exclusivement que de l'épinéphrine (2).

b) Dosage de la chromogranine A

Le dosage de la chromogranine A peut être aussi d'un grand intérêt pour orienter vers l'étiologie suspectée, puisqu'il s'agit d'un marqueur général des tumeurs neuro-endocrines. Il faut cependant bien faire attention à ce qu'il ne soit qu'une aide au diagnostic puisqu'il existe des cas de phéochromocytome sans augmentation de la chromogranine A.

2) Imagerie

Pour compléter le diagnostic biologique des phéochromocytomes et paragangliomes, une imagerie anatomique couplée à une imagerie fonctionnelle est nécessaire pour localiser la tumeur, voire la présence éventuelle de métastases.

Pour l'imagerie anatomique, le clinicien peut avoir recours au scanner ou à l'imagerie par résonance magnétique (IRM). Pour l'imagerie fonctionnelle, le choix peut être fait entre la tomographie par émission de positons (TEP) au ^{68}Ga ou à la ^{18}F -DOPA, la scintigraphie à l' ^{123}I -méta-iodobenzylguanidine (^{123}I -MIBG) ou à l' ^{111}In -pentétréotide.

Dans le cas où on observe des taux élevés de méthanéphrines persistant après un geste chirurgical visant à éliminer la tumeur, cela peut être le signe de la présence de tumeur résiduelle ou de métastases qui nécessitera une imagerie complémentaire, telle qu'une TEP avec utilisation du ^{18}F -fluorodéoxyglucose ou de la ^{18}F -DOPA.

Concernant le cas particulier des formes non sécrétantes de phéochromocytomes et paragangliomes – c'est-à-dire avec des taux normaux de méthanéphrines et une scintigraphie à l' ^{123}I -MIBG négative – le diagnostic consiste en une imagerie anatomique suivie d'une scintigraphie à l' ^{111}In -pentétréotide (18).

3) Génétique

Les phéochromocytomes et paragangliomes peuvent avoir une présentation familiale ou sporadique. Parmi les formes familiales, on note des formes syndromiques et des formes non syndromiques. Les données actuelles montrent que 40% de ces tumeurs seraient déterminées génétiquement. Une recherche génétique et un conseil génétique - si la cause mutationnelle est avérée – sont donc essentiels à la prise en charge du patient et de sa famille (1).

a) Formes familiales syndromiques des phéochromocytomes et paragangliomes

I - Néoplasie endocrinienne multiple de type 2

Dans les deux types de néoplasies endocriniennes multiples de type 2 (NEM2), la NEM2A et la NEM2B, la présence d'un cancer médullaire de la thyroïde et la possibilité de développer un phéochromocytome sont des constantes. Ce syndrome est secondaire à une mutation activatrice du proto-oncogène *RET* qui code pour un récepteur à tyrosine-kinase dont les ligands sont des facteurs de croissance de la famille du GDNF (*glial-derived nerve growth*). La mutation de *RET* entraîne une auto-activation constitutive et permanente du récepteur qui induit la transduction de signaux de croissance et de différenciation de certains tissus, dont les tissus dérivés de la crête neurale (1).

II - Maladie de von Hippel-Lindau

Ce syndrome héréditaire prédispose au développement de tumeurs bénignes ou malignes touchant le système nerveux central – hémangioblastomes, par exemple -, la rétine, les reins – tels que carcinome du rein à cellules claires, kystes rénaux -, les surrénales et le pancréas (19). C'est plus précisément dans le type 2 de la maladie de von Hippel-Lindau (VHL) que les phéochromocytomes et paragangliomes sont fréquents. Il est lié à des mutations du gène *VHL* qui est un gène suppresseur de tumeur codant pour la protéine pVHL régissant la protéolyse, dépendante de l'oxygène et des facteurs induits par l'hypoxie (*hypoxia inducible factors* ou HIF). La mutation de *VHL* mime les conditions hypoxiques, ce qui induit, au final, la transcription de gènes impliqués dans l'adaptation cellulaire et tissulaire à l'hypoxie (1).

III - Neurofibromatose de type 1 ou maladie de von Recklinghausen

La neurofibromatose de type 1 (NF1) est une maladie dans laquelle un phéochromocytome peut être présent dans moins de 1% des cas. Cependant, étant une maladie héréditaire

fréquente, elle serait à l'origine d'environ 5% des cas de phéochromocytomes. Elle est due à une mutation du gène *NF1*, gène suppresseur de tumeur qui code pour la neurofibromine, une protéine qui constitue un régulateur négatif de la voie de prolifération cellulaire Ras (1).

b) Formes familiales non syndromiques des phéochromocytomes et paragangliomes

Toute forme familiale de phéochromocytome et paragangliome non associée aux syndromes précédents est désignée par le terme de phéochromocytome ou paragangliome héréditaire non syndromique.

I - Mutations des gènes *SDHx*

La symptomatologie consiste en l'association de phéochromocytomes et/ou paragangliomes chez un même patient et/ou au sein d'une même famille. Les tumeurs sont de survenue plus précoce, souvent bilatérales ou multifocales, récidivantes et/ou malignes. La maladie est due à la mutation de gènes *SDHx* qui codent pour les sous-unités protéiques du complexe II mitochondrial ou succinate-déshydrogénase (SDH), enzyme de la chaîne respiratoire mitochondriale et siège de la phosphorylation oxydative et du cycle de Krebs, qui protègent la cellule contre le stress oxydatif (20). Comme pour les mutations *VHL*, un lien a été établi entre mutations *SDHx* et activation de la réponse pseudo-hypoxique (21) (1).

II - Mutation du gène *TMEM127*

Une mutation du gène suppresseur de tumeur *TMEM127* serait à l'origine d'une absence de régulation de la protéine mTOR, ce qui pourrait également conduire dans certains cas à la survenue d'un phéochromocytome ou d'un paragangliome (1).

III - Autres mutations

Il existe d'autres mutations, plus rares, qui peuvent être rencontrées dans les formes familiales non syndromiques des phéochromocytomes et paragangliomes. Parmi celles-ci, on note celles qui touchent le gène *KIF1Bβ* codant pour une kinésine nécessaire à l'induction de l'apoptose neuronale en absence de NGF (*nerve growth factor*) ; le gène *PHD2* plus souvent rapporté aux patients atteints d'érythrocytose familiale ; le gène *IDH1* dont les mutations sont à l'origine d'une stabilisation des facteurs HIF tout comme les mutations *SDHx* (1) ; ou le gène *MAX* (22).

c) Recommandations concernant le test génétique

A tout patient chez lequel un phéochromocytome ou un paragangliome est diagnostiqué doit être proposée une consultation de génétique qui aboutira sur la proposition d'un test génétique.

Les mutations des gènes *RET*, *VHL*, *NF1*, *SDHB*, *SDHD* et *SDHC* doivent être recherchées en première intention. Les gènes à analyser peuvent cependant être ciblés selon l'histoire personnelle et familiale du patient et les caractéristiques cliniques présentées (âge au diagnostic, localisation et nombre de tumeurs, degré de malignité) (1). La réalisation d'une étude génétique est longue et on ne doit pas attendre d'en obtenir les résultats pour prendre la décision de traiter le patient.

4) Anatomicopathologie

Au final, le diagnostic est toujours porté par l'anatomicopathologie. Une exérèse de la tumeur doit être pratiquée et la pièce anatomique envoyée au laboratoire d'anatomicopathologie pour analyse immunohistochimique.

5 - Traitement et surveillance

L'exérèse chirurgicale est le seul traitement curatif des phéochromocytomes et paragangliomes. En raison du risque de décharges catécholaminergiques dans la circulation sanguine lors du geste chirurgical, une prémédication par α -bloquants, dans le but de bloquer les récepteurs α -adrénergiques, est donc devenue la règle afin de limiter les dégâts occasionnés par une libération massive de catécholamines pendant l'opération et qui pourrait être fatale pour le patient (13) (23). Le traitement des phéochromocytomes est la surrénalectomie totale unilatérale dans la majorité des cas. Une surrénalectomie partielle peut être envisagée chez les patients dont le gène *RET* est muté, étant donné l'atteinte souvent bilatérale et/ou multifocale, afin d'éviter toute insuffisance surrénalienne ultérieure. Pour les paragangliomes de la tête et du cou, une radiothérapie externe peut présenter une alternative à la chirurgie afin de réduire le volume tumoral et de limiter sa progression. Pour les phéochromocytomes et paragangliomes multiples, récurrents ou malins qui fixent la MIBG, une radiothérapie métabolique à l' ^{131}I -MIBG peut être proposée (1). En cas de métastases, une polychimiothérapie peut s'avérer nécessaire.

Compte-tenu du risque de récurrences ou de métastases, la surveillance post-traitement des phéochromocytomes et paragangliomes sécrétants repose sur un suivi biologique à vie, tous les ans, par le dosage des métanéphrines.

6 - Aparté : les neuroblastomes

Les neuroblastomes sont des tumeurs embryonnaires qui se développent, comme les phéochromocytomes et les paragangliomes, aux dépens des cellules issues de la crête neurale. Ils peuvent siéger à tous les niveaux de l'organisme, la localisation rétropéritonéale étant largement prédominante (75% des cas). Ce sont des tumeurs malignes du jeune enfant qui apparaissent entre 3 mois et 5 ans, et dont le pronostic est sombre en l'absence de dépistage précoce.

Dans les neuroblastomes, c'est la dopamine qui est augmentée, souvent massivement. Le diagnostic du neuroblastome chez ces jeunes patients est porté par le dosage de la dopamine et de ses métabolites, le VMA et l'HVA, dans les urines, rapporté à la créatininurie.

II – Dosage des catécholamines et dérivés méthoxylés urinaires par chromatographie liquide haute performance couplée à la spectrométrie de masse en tandem

1 - Chromatographie liquide haute performance couplée à la spectrométrie de masse en tandem

A l'heure actuelle où la médecine se doit d'être toujours plus performante pour assurer la meilleure prise en charge possible des patients, la demande concernant l'étendue d'analyses envisageables, la fiabilité et la rapidité de rendu des résultats des examens biologiques n'a jamais été aussi importante. Ainsi, l'association d'un système chromatographique sous la forme de chromatographie liquide haute performance (HPLC) ou ultra haute performance (UPLC) et d'un système de détection qui utilise la spectrométrie de masse en tandem constitue, à ce jour, un des moyens les plus puissants et fiables que nous puissions envisager pour répondre à cette problématique, permettant, en fonction des avancées et des possibilités actuelles, de rechercher une molécule bien précise dans une matrice définie.

Pour bien comprendre comment fonctionne la chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse en tandem (LC-MS/MS), nous aborderons le principe du système chromatographique et celui du spectromètre de masse en deux sous-chapitres.

1) Chromatographie liquide haute performance

a) Principe de la chromatographie

La chromatographie est une méthode de séparation analytique de composés, ayant diverses applications parmi lesquelles l'identification de composés (méthode qualitative), le dosage (méthode quantitative) ou la purification (méthode préparative). Le principe de la séparation chromatographique repose sur l'interaction entre deux phases non miscibles, une phase mobile et une phase stationnaire. La phase stationnaire est présente sur ou à l'intérieur d'un support dans lequel elle est immobilisée. La phase mobile traverse la phase stationnaire grâce à des phénomènes de capillarité ou de gravité (plus ou moins accélérés par l'ajout d'une pression supplémentaire), ce qui va permettre aux différents composés présents dans celle-ci

de s'équilibrer entre phase mobile et phase stationnaire (en fonction de leur poids, leur charge, etc...). La séparation chromatographique repose sur la succession de processus élémentaires d'échanges du soluté entre phase mobile et phase stationnaire.

Il existe différents types de chromatographie mais c'est la chromatographie liquide haute performance qui nous intéresse ici.

b) Chromatographie liquide haute performance

I - Chromatographie sur colonne

La chromatographie sur colonne est une chromatographie en phase liquide sur une phase stationnaire solide, localisée au niveau de la colonne chromatographique. C'est une méthode chromatographique d'élution qui va permettre la séparation des composés en sortie de colonne. Le principe est le suivant : la colonne chromatographique est imprégnée au préalable de la phase mobile. Puis, on dépose l'échantillon en tête de colonne, et la migration se fait grâce au flux continu de phase mobile à travers la colonne. Les composés vont être séparés au fur et à mesure de leur migration à travers la colonne (figure 5), par des phénomènes d'adsorption – c'est-à-dire d'interactions réversibles, d'un soluté sur le support solide -, des équilibres ioniques – selon la charge du soluté et de la phase stationnaire – et des équilibres de chromatographie d'exclusion – permettant de séparer des grosses molécules d'autres plus petites.

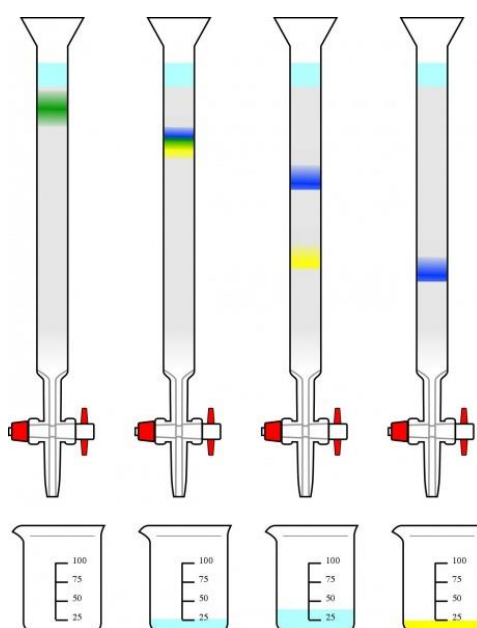


Figure 5 : Séparation des composés au cours de leur passage à travers une colonne chromatographique (24).

On parle de chromatographie en phase normale lorsque la phase stationnaire est polaire et la phase mobile peu polaire. C'est le cas par exemple des phases stationnaires composées de gel de silice ayant à leur surface des groupements silanols (-Si-OH) et siloxanes (-Si-O-Si-) sur lesquels peuvent être greffés des groupements amines (-NH₂), carbonitrile (-CN) ou diol [(-CHOH)-CH₂OH]. Elles permettent de retenir principalement des composés polaires par des liaisons hydrogènes. Mais la silice présente l'inconvénient de se dégrader très rapidement et entraîne un manque de reproductibilité de la séparation.

On parle de chromatographie en phase inverse lorsque la phase stationnaire est très peu polaire et la phase mobile polaire. Concernant la phase stationnaire, il s'agit bien souvent d'une phase normale greffée avec des chaînes alkyle allant de C₄ à C₃₀ – C₈ et C₁₈ étant le plus souvent utilisés – sur les groupements silanols.

Une fois séparés, les composés sont élués en sortie de colonne où ils peuvent être détectés par divers systèmes de détection.

II - Chromatographie liquide haute performance

La chromatographie liquide haute performance (HPLC) est une chromatographie sur colonne dont le phénomène de migration est potentialisé par application d'une pression grâce à l'utilisation d'une pompe. Par le biais de cette technologie, on peut faire varier la proportion d'éluants qui composent la phase mobile au cours du temps, générant ainsi différents gradients d'éluants. Les éluants sont stockés dans des réservoirs de solvants et reliés au système de pompe par des tubulures. La migration peut se faire alors selon deux modes différents. On peut travailler en mode isocratique, c'est-à-dire en utilisant toujours le même éluant tout au long de l'analyse ; ou bien, on peut travailler en mode gradient, avec une variation de la concentration des constituants du mélange d'éluants. Ce dernier mode permet d'améliorer la séparation des analytes et de raccourcir le temps d'analyse.

c) Détection

Après séparation des composés en sortie de colonne, ceux-ci sont détectés par le biais d'un détecteur qui peut prendre différentes formes et utiliser diverses techniques (détection électrochimique, spectrométrie de masse...). Le détecteur est relié à un enregistreur, et on obtient alors ce que l'on appelle un chromatogramme. Le chromatogramme correspond au signal enregistré par le détecteur en fonction du temps. Ce chromatogramme permet de définir le temps de rétention d'un composé, c'est-à-dire le temps entre l'injection de l'échantillon et

l'intensité maximale du pic d'un composé. Il correspond au temps nécessaire à ce composé pour traverser la colonne. L'aire sous la courbe d'un pic permet de quantifier le composé dans l'échantillon injecté.

La figure 6 illustre un système chromatographique utilisant l'HPLC. Les réservoirs de solvants contiennent les éluants qui composent la phase mobile, le système de pompe permet de travailler en mode isocratique ou en mode gradient, les échantillons seront injectés dans le système au niveau de la boucle d'injection, la colonne peut être précédée d'une pré-colonne pour une séparation encore plus optimale des composés et pour limiter son usure, enfin le détecteur et l'enregistreur sont situés en sortie de colonne.

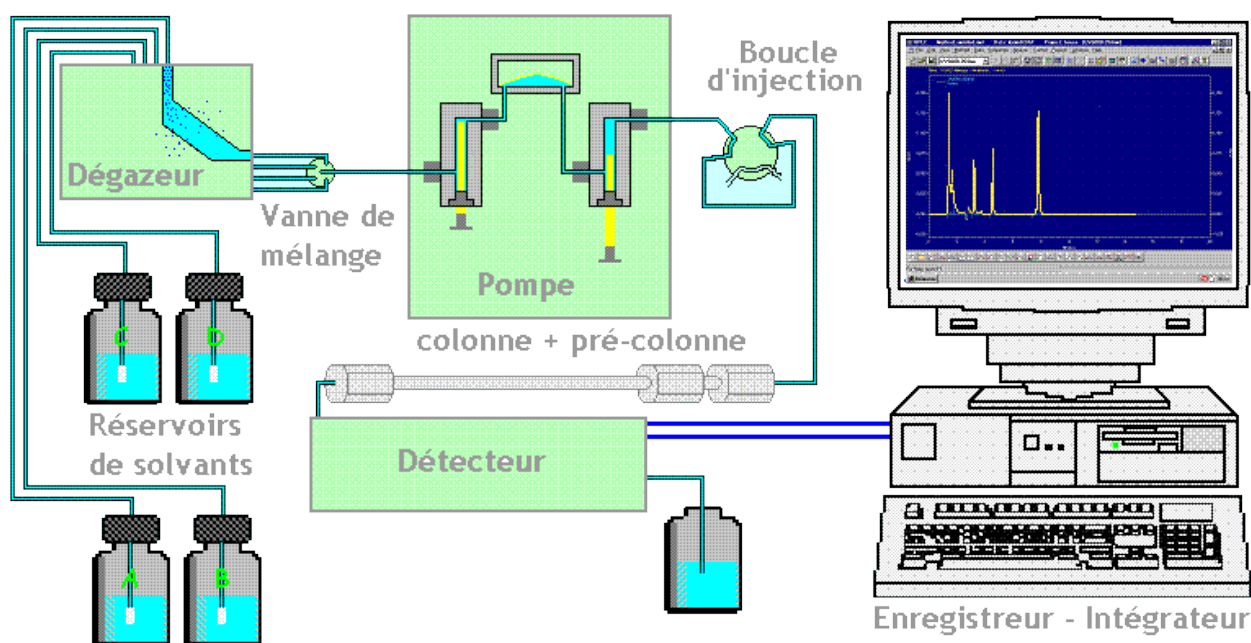


Figure 6 : Appareillage d'un système de chromatographie liquide haute performance (25).

Dans la LC-MS/MS, le système chromatographique est situé en amont du spectromètre de masse. Et c'est lui qui permettra une séparation préalable des composés avant leur introduction, à l'aide d'une seringue, dans le spectromètre de masse.

2) Spectrométrie de masse en tandem

a) Principe

La spectrométrie de masse en tandem permet une analyse qualitative et quantitative de molécules cibles dans un mélange. La distinction entre les diverses molécules du mélange et les molécules d'intérêt, préalablement ionisées, pourra être faite grâce à leur rapport masse sur charge (m/z), caractérisant une molécule en particulier.

b) Présentation de l'appareil

Le spectromètre de masse est un appareil complexe que nous pouvons diviser en trois grandes parties :

- la source d'ionisation est la zone au niveau de laquelle les composés d'intérêt sont ionisés puis injectés dans le spectromètre de masse,
- l'analyseur, constitué de trois quadripôles disposés en série, sépare les ions produits en fonction de leur rapport m/z ,
- le détecteur convertit le courant ionique en courant électrique. Il est relié à un système informatique de traitement des données.

I- Sources d'ionisation

La source d'ionisation sert à ioniser les substances à analyser par spectromètre de masse en tandem. En biologie, les principales sources rencontrées sont le FAB (*Fast Atom Bombardment*), l'ESI (*ElectroSpray Ionization*), l'APCI (*Atmospheric Pressure Chemical Ionization*), et le MALDI (*Matrix Assisted Laser Desorption Ionization*).

Etant donné que le FAB ne permet pas l'introduction automatisée des échantillons, il n'est plus très répandu.

L'ESI est utilisé pour l'étude des petites molécules en milieu liquide tandis que le MALDI sert à l'étude des grosses molécules.

La figure 7 illustre le principe de l'ESI, mode d'ionisation qui nous intéresse dans cette étude.

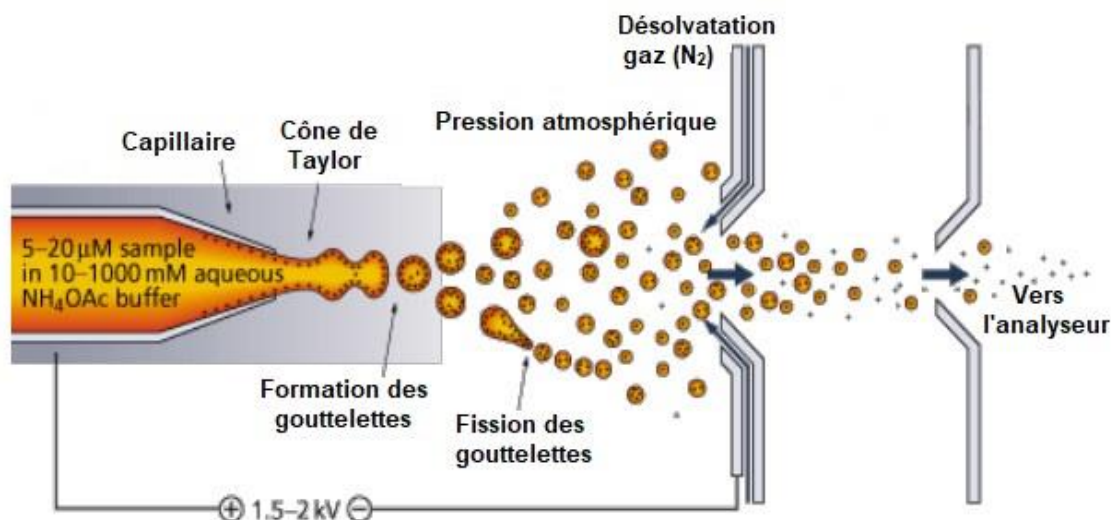


Figure 7 : Principe de l'ESI. D'après (26).

L'électronebulisation ou *electrospray* est produite par application, à pression atmosphérique, d'un fort champ électrique sur un liquide traversant un tube capillaire avec un faible débit. Le courant est obtenu par une différence de potentiel entre le capillaire et une contre-électrode. Le champ électrique formé engendre une accumulation de charge à la surface du liquide en sortie du capillaire. Le liquide est déformé par cette accumulation de charge, ce qui aboutit à la formation d'un cône de Taylor qui sera décomposé en gouttelettes hautement chargées. Ces gouttelettes passent ensuite à travers un rideau de gaz inerte et chauffé (généralement, de l'azote N₂) qui est dirigé à contre-courant du trajet des ions, ce qui permet au solvant de s'évaporer. C'est la désolvatation. Les gouttelettes subissent ensuite une cascade de fissions qui aboutit à la désorption des ions. Ces ions, alors en phase gazeuse, sont orientés dans l'analyseur grâce à des lentilles électromagnétiques. Les ions sont chargés positivement ou négativement selon la structure chimique de la molécule à analyser et pour un mode d'ionisation – positif ou négatif – donné. En mode positif (ESI+), les anions sont retenus dans le capillaire tandis que les cations sont repoussés jusqu'à l'extrémité du cône de Taylor. Dans ce mode-ci, la charge positive est souvent un adduit de proton H⁺. En mode négatif (ESI-), c'est l'inverse.

En général, l'ESI est utilisée pour les composés thermolabiles.

L'APCI est une variation de l'ESI et repose sur l'utilisation d'une aiguille électrifiée permettant d'ioniser l'azote. Elle est utilisée pour l'étude de composés peu polaires.

Les ions formés sont ensuite conduits vers l'analyseur.

II - Analyseur

L'analyseur est composé de trois quadripôles montés en série (figure 8). Chacun de ces quadripôles est formé de quatre électrodes hyperboliques où sont appliqués deux champs électriques dont l'un est constant et l'autre est alternatif. Dans un quadripôle, la trajectoire d'un ion soumis à ces champs électriques est dépendante de sa masse et de sa charge. Ainsi, dans un mélange complexe, nous pouvons séparer les différents ions en fonction de leur rapport masse sur charge (m/z).

Dans un spectromètre de masse en tandem, le premier quadripôle, nommé Q1, isole l'ion parent (ion précurseur) de la molécule d'intérêt à partir d'un mélange complexe. Cet ion sera ensuite fragmenté dans la cellule de collision, correspondant au second quadripôle Q2, où il entrera en collision avec des atomes d'argon pour donner des ions fils (ions produits) et des fragments neutres - c'est-à-dire non chargés – caractéristiques de la substance d'intérêt. Enfin, le troisième et dernier quadripôle, Q3, analyse et sépare les ions fils d'intérêt.

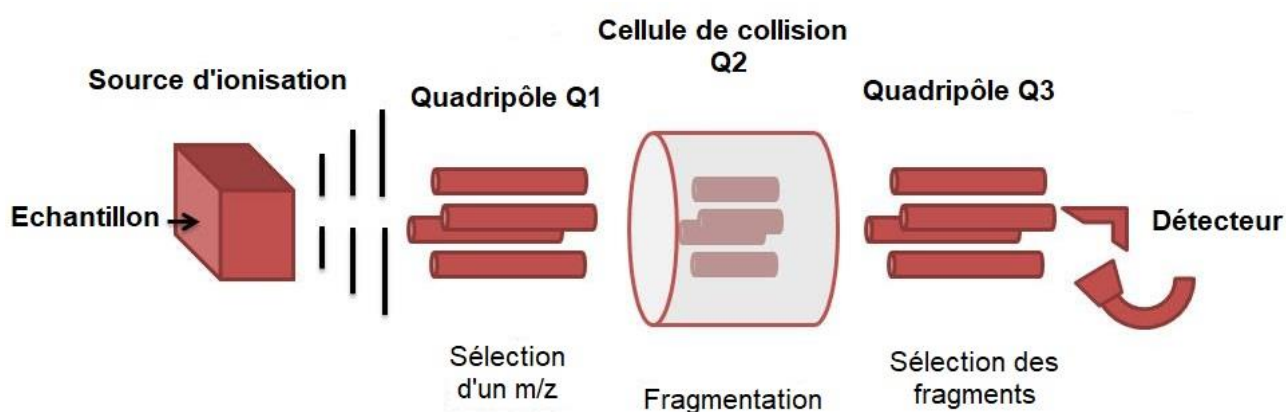


Figure 8 : Schéma d'un analyseur triple quadripôle.

III - Détecteur

A la sortie de l'analyseur, le rôle du détecteur est de détecter les ions parvenus jusque-là. Les données recueillies forment un courant électrique amplifié qui est converti par un système informatique en spectres de masse directement exploitables.

c) Modes d'acquisition du spectromètre de masse en tandem

L'analyse en spectrométrie de masse en tandem peut se faire selon quatre modes différents en fonction des molécules à étudier.

I - Balayage des ions fils

Le balayage des ions fils (*product ion scan*) consiste à injecter un échantillon, sélectionner un ion parent correspondant à la molécule d'intérêt en Q1, le fragmenter en Q2 et déterminer tous les ions fils en Q3. Ce mode est utilisé pour identifier une substance inconnue dans un mélange complexe.

II - Balayage des ions parents

Le balayage des ions parents (*precursor ion scan*) consiste à sélectionner un ion fils en Q3 et à balayer en Q1 dans le but de retrouver les ions parents correspondants. Ce mode est utilisé pour identifier une famille de molécules ayant une partie de leur structure moléculaire similaire.

III - Balayage en perte de neutres

Le balayage en perte de neutres (*neutral loss*) consiste à choisir un fragment neutre et à détecter toutes les fragmentations provoquant la perte de ce fragment. Tout comme le balayage des ions parents, ce mode de balayage-ci permet l'identification d'une famille de molécules partageant une structure chimique similaire.

IV - Balayage en MRM

Le balayage en MRM (*Multi Reaction Monitoring*) (figure 9) permet de trier une ou plusieurs molécules ayant un ion parent et un ion fils spécifiques. Nous obtenons alors des paires d'ions parent/ion fils très spécifiques d'une molécule. Chacune de ses paires correspond à une transition MRM. Grâce à ce mode, nous pouvons quantifier simultanément de très nombreux composés ayant des structures chimiques différentes.

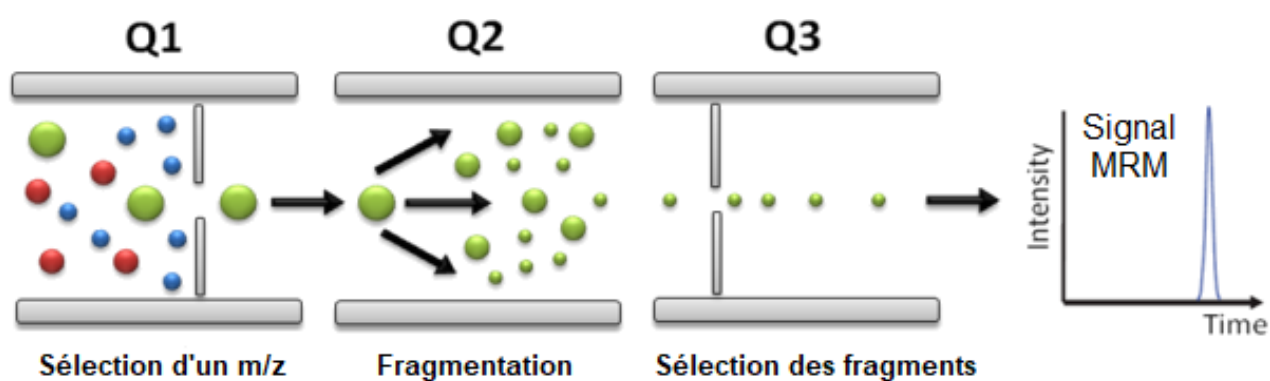


Figure 9 : Principe de fonctionnement du mode MRM. D'après (27).

Le mode d'acquisition employé dans notre étude est le mode MRM. Il s'agit du mode de choix pour la quantification, d'une part, du fait de sa sélectivité vis-à-vis des ions parents et ions fils, et d'autre part car ce mode permet de suivre précisément et simultanément les transitions MRM de plusieurs ions parents.

3) Théorie et utilisation en pratique

Au final, la LC-MS/MS constitue un outil important dans le contexte d'une médecine toujours plus demandeuse vis-à-vis des possibilités analytiques (nombreuses possibilités de dosages/mise en évidence de molécules bien définies, gain de temps, tests fiables, etc...). La spectrométrie de masse, en soi, présente déjà un très fort potentiel, mais son couplage à un système chromatographique la rend encore plus performante. En effet, le spectromètre de masse permet une détection très fine des molécules dans un mélange, en utilisant leur rapport masse sur charge (m/z) comme moyen de séparation. Lui associer un système chromatographique, facilement modulable, permet de caractériser plus précisément encore les molécules d'intérêt.

De nombreux centres hospitalo-universitaires (CHU) surtout, mais aussi certains laboratoires de biologie médicale privés s'équipent de systèmes LC-MS/MS. Ces systèmes permettent de développer de nouveaux dosages, d'abandonner d'anciennes techniques pouvant présenter un danger pour le technicien de laboratoire (radio-immunoanalyses). La LC-MS/MS est dotée d'une grande sensibilité analytique, ainsi que d'une spécificité élevée, ce qui en fait une technique de choix.

En pratique, au niveau du pôle de biologie, la plateforme de spectrométrie de masse du CHU de Nantes dispose actuellement de quatre appareils de LC-MS/MS. Un cinquième est en cours d'installation. Parmi ces appareils, deux sont utilisés uniquement par le laboratoire de pharmacologie-toxicologie, et les deux autres sont partagés entre le laboratoire de biochimie et le laboratoire de pharmacologie-toxicologie. Les analyses qui nous intéressent dans le cadre de ce mémoire sont les catécholamines et leurs dérivés méthoxylés urinaires. Cette technique a été validée selon les critères du Comité français d'accréditation (COFRAC) (28). Elle est maintenant réalisée en routine le mardi, avec possibilité de refaire un dosage le jeudi en cas de souci sur le premier ou en cas d'urgence. L'appareil de LC-MS/MS utilisé associe une chaîne chromatographique Nexera XR de Shimadzu avec un spectromètre de masse en tandem 5500 QTrap® d'AB Sciex.

2 - Validation de méthode

Jusqu'à présent, les dosages des catécholamines et des dérivés méthoxylés urinaires prescrites au CHU de Nantes étaient envoyés au laboratoire Biomnis (Lyon). Pour des questions de coût et pour une plus grande rapidité dans le rendu de résultats, nous souhaitions ré-internaliser ces analyses au laboratoire d'hormonologie du CHU. Pour cela, nous avons acquis un appareil de spectrométrie de masse de haute sensibilité. L'objectif était de doser simultanément les six composés d'intérêt (dopamine, norépinéphrine, épinéphrine, 3-méthoxytyramine, normétanéphrine et métanéphrine). Plusieurs essais initiaux, selon différentes méthodes, ont été testés. Au départ, nous étions partis sur une extraction des échantillons urinaires utilisant une méthode SPE (*Solid Phase Extraction*) mais les premières tentatives étaient peu concluantes. En effet, le temps d'écoulement des échantillons et des solvants dans les colonnes SPE était très aléatoire selon les échantillons concernés. L'extraction pouvait être faite en quelques minutes comme elle pouvait nécessiter plusieurs heures, voire ne pas se faire correctement (le liquide ne s'écoulant plus au travers de la colonne). Nous avons donc vite abandonné cette méthode. Par la suite, nous avons donc testé une méthode décrite par l'équipe de Diniz *et al.* (29), permettant un dosage simultané des six composés qui nous intéressaient en passant par une extraction liquide-liquide. Les premiers essais prometteurs nous ont fait nous engager dans cette voie avec la mise au point et la validation de cette méthode adaptée à la routine de notre laboratoire.

Ce chapitre décrit les différents points de la validation de méthode en portée B du dosage des catécholamines et des dérivés méthoxylés libres urinaires par technique de LC-MS/MS.

La validation de méthode est basée sur le *Guide technique d'accréditation de vérification (portée A) / de validation (portée B) des méthodes de biologie médicale* (SH GTA 04), document du COFRAC (28).

1) Matériel et méthode

a) Gamme, contrôles et échantillons

I - Gamme et contrôles

Les différents points de gamme sont obtenus par dilutions de deux en deux à partir d'un calibrant commercial (Biogenic Amines by HPLC®, Bio-rad, Marnes-la-Coquette, France) et reconstitué par dix millilitres d'acide chlorhydrique 0,05N.

Les deux niveaux de contrôles (Lyphocheck® Quantitative Urine Control 1 Normal et 2 Abnormal, Bio-rad) sont reconstitués par dix millilitres d'acide chlorhydrique 0,05N. Le niveau

de contrôle le plus faible (niveau 1) est situé dans l'étendue de mesure comme définie dans le chapitre *Etendue de mesure et linéarité* (page 50). Le niveau de contrôle le plus fort (niveau 2) se situe en dehors de l'étendue de mesure pour tous ou certains composés. C'est la raison pour laquelle, le contrôle haut que nous utilisons est un contrôle « maison » reconstitué à partir du contrôle niveau 2 et d'acide chlorhydrique comme décrit en annexe 1 *Mode opératoire : dosage des catécholamines et des dérivés méthoxylés libres urinaires par LC-MS/MS*.

II - Recueil urinaire et échantillons

Les recueils urinaires effectués chez des patients ou des volontaires sains sont réalisés sur des urines de 24 heures, dans des flacons de recueil dédiés. Les modalités entourant le recueil, et plus précisément le respect d'un régime alimentaire excluant tout aliment riche en catécholamines, sont décrites dans l'annexe 2.

b) Mélange essai et composés deutérés

Des solutions pures de dopamine, norépinéphrine, épinéphrine, 3-méthoxytyramine, normétanéphrine et métanéphrine (LGC Standards, Molsheim, France) ont contribué à la reconstitution d'un mélange essai permettant d'identifier les transitions MRM préalablement à la validation de méthode et autres dosages mis en place.

Des solutions pures de ces mêmes molécules deutérées, dopamine-D4, norépinéphrine-D6, épinéphrine-D6, 3-méthoxytyramine-D4, normétanéphrine-D3 et métanéphrine-D3 (LGC Standards), servent de standards internes et sont ajoutées aux échantillons lors des dosages.

c) Traitement des échantillons

Le traitement des échantillons - points de gamme, contrôles, et échantillons patient ou volontaire sain - est réalisé comme adapté de l'article de Diniz *et al.* (29) selon notre mode opératoire en annexe 1.

d) Matériel et analyse

I - Solutions et solvants

Toute information relative aux solutions et solvants utilisés est disponible en annexe 1.

II - Appareillage

Les caractéristiques de l'appareillage utilisé pour la technique de LC-MS/MS sont décrites ci-dessous (tableau 2).

Système	Appareillage	Informations fournisseur
Système chromatographique	Nexera XR UPLC, pompe binaire	Shimadzu, Noisiel, France
Colonne chromatographique	Allure® PFP Propyl 5µm 50 x 2,1 mm	Restek™, Lisses, France Référence : 9169532
Système de détection	Spectromètre de masse en tandem	5500 QTRAP® AB Sciex, Les Ulis, France
Système d'acquisition	Logiciel de traitement de données	Analyst® Software AB Sciex

Tableau 2 : Caractéristiques techniques de l'appareillage utilisé pour le dosage des catécholamines et dérivés méthoxylés urinaires par LC-MS/MS.

III - Intégration des résultats bruts

L'acquisition et le traitement des résultats est effectué grâce au logiciel Analyst®. Les pics analytiques de chaque point de gamme, contrôle et échantillon sont intégrés par le logiciel et peuvent être retravaillés manuellement par l'utilisateur. Les résultats obtenus en aire sous la courbe et en concentration, exprimée en µg/L, sont accessibles dans le tableur généré.

IV - Traitement des données

Les différentes données obtenues sont exploitées dans des tableurs Microsoft® Excel.

Le logiciel servant à établir les valeurs de référence Reference Value Advisor est un outil complémentaire utilisable sous Excel (30).

2) Résultats

a) Détermination des transitions par infusions et mélange essai

Les composés pour lesquels nous devons établir les conditions d'ionisation sont les suivants : la dopamine, la norépinéphrine, l'épinéphrine, la 3-méthoxytyramine, la normétanéphrine et la métanéphrine. Ainsi que les standards internes deutérés de chaque composé : la dopamine-D4 (quatre atomes de deutérium remplacent quatre atomes d'hydrogène dans la molécule), la norépinéphrine-D6, l'épinéphrine-D6, la 3-méthoxytyramine-D4, la normétanéphrine-D3 et la métanéphrine-D3.

Les infusions consistent, pour chaque composé d'intérêt, en l'injection directement dans le spectromètre de masse d'une solution pure de ce composé, dilué dans le méthanol. L'objectif est de déterminer la meilleure transition entre l'ion parent – défini par Q1 et caractérisé par son rapport masse sur charge (m/z) qui lui est propre - et l'ion fils – défini par Q3 et caractérisé également par son m/z - et de réaliser un premier choix des paramètres physiques à adopter. Les paramètres physiques sont les différences de potentiel exercées aux endroits clés du spectromètre de masse. Nous qualifions ainsi :

- DP (*declustering potential*), la différence de potentiel exercée au niveau de l'orifice du spectromètre de masse et qui empêche les différents ions de s'attirer entre eux,
- EP (*entrance potential*), la différence de potentiel à l'entrée des quadripôles,
- CE (*collision energy*), la différence de potentiel dans la cellule de collision (Q2). Plus CE sera élevée et plus la fragmentation sera importante.
- CXP (*collision cell exit potential*), la différence de potentiel en sortie de cellule de collision, qui dirige tous les ions fragmentés de Q2 vers le quadripôle Q3 où s'effectuera la sélection de l'ion fils.

Le mélange essai est constitué d'un mélange des six composés et de leurs standards internes deutérés. Il permet de définir les paramètres physiques optimaux afin d'obtenir une bonne intensité des pics et une bonne séparation entre chacun des pics.

La figure 10 illustre un exemple de *scan* obtenu après infusion d'une solution pure de dopamine.

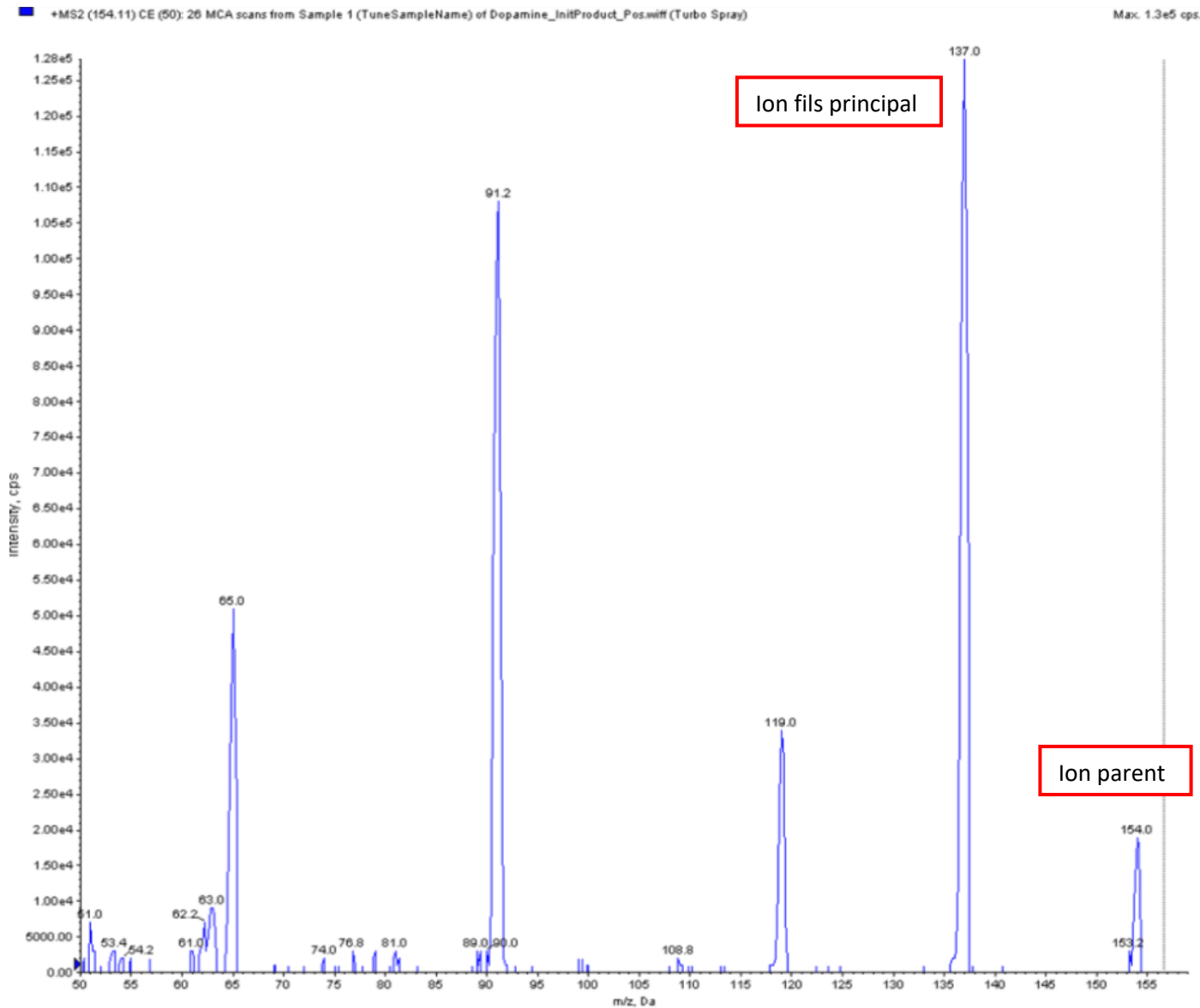


Figure 10 : Scan obtenu après infusion d'une solution pure de dopamine dans le spectromètre de masse. Intensité en nombre de coups (counts) en fonction du m/z.

Pour réaliser une bonne identification de nos molécules d'intérêt, il faut privilégier les fragments les plus gros, ayant l'intensité la plus élevée. Dans cet exemple, l'ion parent est visible avec un m/z à 154. Les autres pics, dont les m/z sont moins importants, correspondent à ceux des différents ions fils obtenus après fragmentation de l'ion parent dans la cellule de collision. L'ion fils le plus gros est celui qui présente un m/z à 137, et c'est donc celui que nous allons utiliser en priorité dans le choix des transitions pour cet analyte.

La figure 11 montre le profil chromatographique des catécholamines et dérivés méthoxylés, ainsi que leurs standards internes deutérés respectifs, obtenu après injection d'un mélange essai dans le système LC-MS/MS et optimisation des paramètres physiques.

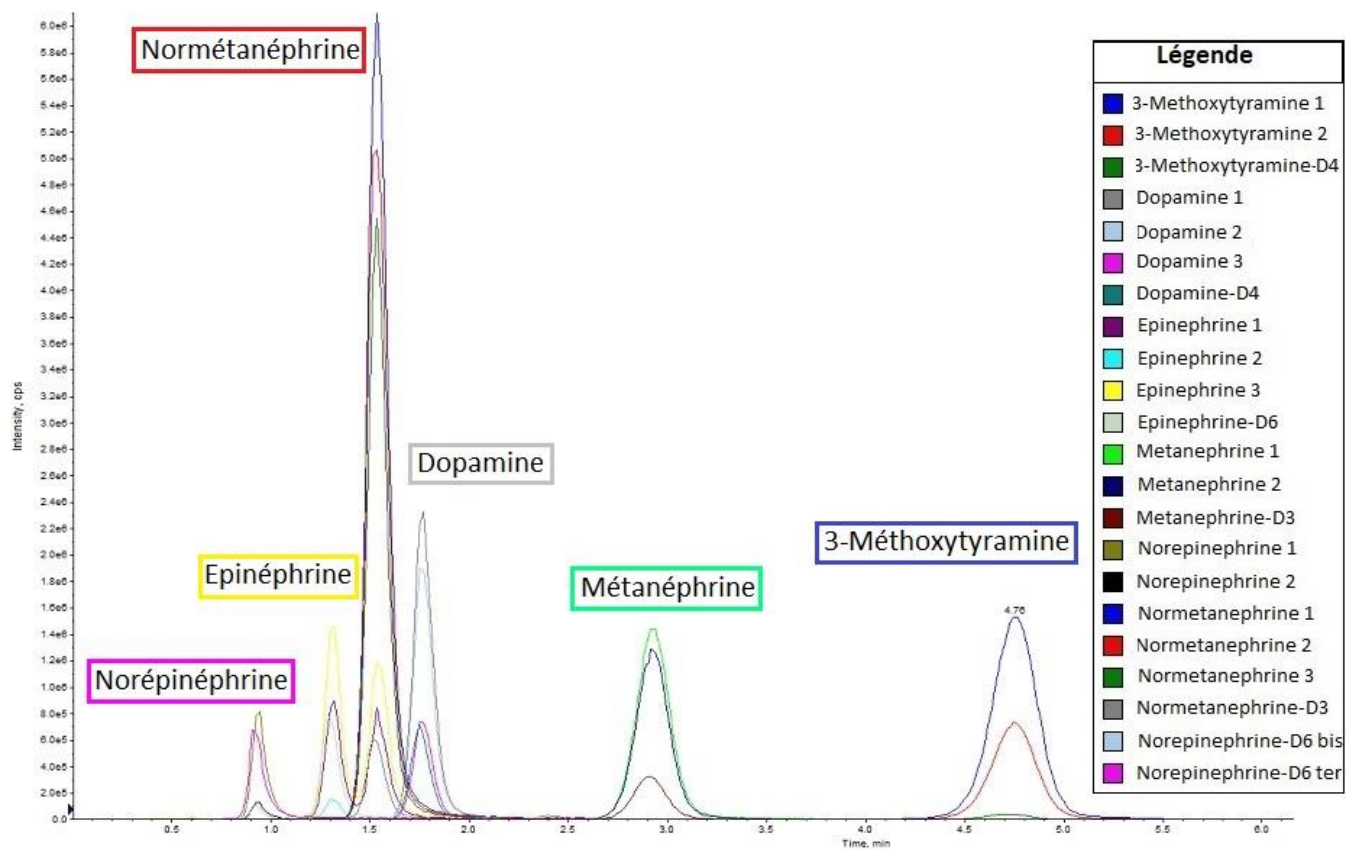


Figure 11 : Chromatogramme obtenu après injection d'un mélange essai constitué des six analytes d'intérêt et des six standards internes respectifs.

Deux à trois transitions par analyte. Intensité en fonction du temps.

Au final, les infusions et le passage d'un mélange essai nous ont permis d'obtenir les deux meilleures transitions (T1 et T2) pour chaque analyte et le standard interne correspondant (tableau 3). L'intérêt de conserver plusieurs transitions pour un analyte est de pouvoir se reposer sur la seconde quand la première est victime d'interférences, comme nous le verrons dans le chapitre *Interférences analytiques* (page 88).

Q1 et Q3 en m/z ; DP, EP, CE et CXP en volts		Q1	Q3	DP	EP	CE	CXP
Dopamine	Dopamine T1	154	137	41	10	11	14
	Dopamine T2	154	91	41	10	29	10
Dopamine-D4		158	95	41	10	29	10
Norépinéphrine	Norépinéphrine T1	152	107	25	10	22	12
	Norépinéphrine T2	170	107	55	10	27	12
Norépinéphrine-D6		176	158	26	10	11	4
Epinéphrine	Epinéphrine T1	184	166	31	10	13	18
	Epinéphrine T2	184	166	31	10	13	18
	Epinéphrine T3	184	107	31	10	29	10
Epinéphrine-D6		190	172	31	10	15	14
3-Méthoxytyramine	3-Méthoxytyramine T1	151	91	121	10	27	8
	3-Méthoxytyramine T2	151	119	121	10	19	12
3-Méthoxytyramine-D4		172	95	41	10	33	12
Normétanéphrine	Normétanéphrine T1	166	134	71	10	23	12
	Normétanéphrine T2	166	106	71	10	25	12
Normétanéphrine-D3		169	137	71	10	23	12
Métanéphrine	Métanéphrine T1	180	165	120	10	23	8
	Métanéphrine T2	180	148	120	10	27	7
Métanéphrine-D3		183	151	126	10	25	12

Tableau 3 : Choix des transitions et des paramètres physiques des six analytes d'intérêt et leurs standards internes deutérés respectifs.

Dans ce tableau, nous présentons également une transition qui a été ajoutée suite aux essais effectués, une transition supplémentaire pour l'épinéphrine.

Il est intéressant de noter que, pour la norépinéphrine, les transitions 1 et 2 correspondent en fait à des transitions de deux ions parents différents vers un même ion fils.

Ces conditions sont ensuite paramétrées dans la méthode créée dans le logiciel d'acquisition Analyst®, permettant l'identification et la quantification optimales des analytes. Ceci nous permettra de commencer les essais de passage d'une gamme et de contrôles.

b) Conditions d'extraction et mode opératoire

Le pré-traitement des échantillons urinaires de nos patients constitue une étape clé dans la mise au point de notre méthode. En effet, les transitions et les paramètres physiques nous permettant une identification optimale des analytes d'intérêt ont été définis à partir de solutions pures en analytes dans du méthanol. Or, les urines constituent une matrice biologique complexe riche en sels, en minéraux et en molécules organiques diverses. Ainsi, il est nécessaire de bien extraire nos composés d'intérêt de cette matrice en limitant au maximum l'extraction conjointe d'autres composés afin d'éviter toute interférence.

Nous voulons mettre en place une méthode nous permettant de quantifier à la fois les catécholamines et leurs dérivés méthoxylés urinaires. Ceci constitue une réelle difficulté (en témoigne le nombre important de laboratoires, en France, qui ne proposent que la détection des dérivés méthoxylés urinaires) du fait de leur nature chimique. En effet, les catécholamines sont polaires alors que leurs dérivés méthoxylés sont plus apolaires.

Nous avons testé au préalable une extraction en phase solide, sur colonnes SPE (extraction en phase solide), mais les essais réalisés n'étaient pas concluants (temps d'extraction variable allant de quelques minutes à plusieurs heures) et nous ont vite amené à abandonner cette méthode.

L'objectif étant d'utiliser une méthode simple et reproductible, nous avons adopté la technique utilisée par Diniz *et al.* (29), permettant la détection conjointe des catécholamines et des dérivés méthoxylés dans les urines, par extraction liquide-liquide (mode opératoire en annexe 1).

L'acquisition et le retraitement des données (choix de la méthode, modification de la méthode, caractérisation des échantillons dosés (points de gamme, contrôles, etc...), intégration et quantification, etc...), ont été effectués à l'aide du logiciel Analyst® (annexe 3).

Dans le cadre d'une validation de méthode en portée B, nous avons dû vérifier plusieurs items selon le *Guide technique d'accréditation de vérification (portée A) / de validation (portée B) des méthodes de biologie médicale* (SH GTA 04), édité par le Comité français d'accréditation (COFRAC) (28).

c) Répétabilité

La répétabilité consiste à analyser un même échantillon dans les conditions suivantes : même opérateur, même lot de réactifs, même instrument, même étalonnage dans un délai le plus

court possible. Il s'agit de caractériser la meilleure performance possible dans des conditions optimales, et de vérifier le bon fonctionnement du système pour les analytes concernés.

Nous n'avons qu'une seule matrice biologique à tester, les urines. En revanche, nous avons six paramètres différents pour lesquels il faut effectuer une répétabilité : la dopamine, la norépinéphrine, l'épinéphrine, la 3-méthoxytyramine, la normétanéphrine et la métanéphrine. Pour chacun de ces six paramètres, nous testerons deux niveaux de concentration différents grâce à deux contrôles internes de qualité (CIQ), que nous dénommerons *contrôle 1* – pour le CIQ ayant la plus faible concentration en analytes mesurés (Lyphocheck® Quantitative Urine Control 1, Bio-rad) -, et *contrôle 2* – pour le CIQ ayant la plus forte concentration en analytes mesurés (cf *Matériel et méthode* page 40). Chaque niveau de contrôle est passé dix fois pour les six paramètres d'intérêt. Puis, un coefficient de variation (CV) est calculé. Ce coefficient de variation doit être comparé au CV du fournisseur ou des sociétés savantes. Le CV cible de répétabilité correspond à 0,75 fois le CV de reproductibilité d'une société savante, selon la Société Française de Biologie Clinique (SFBC) (31). Le CV cible de reproductibilité étant de 15%, le CV cible de répétabilité est donc de 11%.

Les tableaux 4 et 5 résument les résultats obtenus.

n=10	Dopamine		Norépinéphrine		Epinéphrine	
	Contrôle 1	Contrôle 2	Contrôle 1	Contrôle 2	Contrôle 1	Contrôle 2
Moyenne (µg/L)	83	231	46	106	13	33
CV (%)	0,92	2,5	10,3	3,39	3,41	5,17
CV cible (%)	11		11		11	

Tableau 4 : Répétabilité (catécholamines).

n=10	3-Méthoxytyramine		Normétanéphrine		Métanéphrine	
	Contrôle 1	Contrôle 2	Contrôle 1	Contrôle 2	Contrôle 1	Contrôle 2
Moyenne (µg/L)	16	178	300	670	85	289
CV (%)	3,28	2,9	2,2	4,41	1,29	2,68
CV cible (%)	11		11		11	

Tableau 5 : Répétabilité (dérivés méthoxylés).

Chaque CV calculé, pour nos six analytes d'intérêt et pour les deux niveaux de concentration est inférieur au CV cible retenu par le laboratoire (11%). Ces premiers dosages nous permettent de valider la répétabilité.

d) Reproductibilité

La reproductibilité consiste à analyser un même échantillon dans des conditions différentes en faisant varier au moins un paramètre parmi l'opérateur, le temps, les lots de réactifs, les étalonnages... Cela permet de paramétrer les critères d'acceptation des antécédents en combinaison avec les variations biologiques.

Nous avons utilisé les mêmes niveaux de contrôle de qualité que ceux testés pour la répétabilité. Dans notre cas, ce sont les facteurs temps et lots de réactifs qui diffèrent. Au total, pour un analyte, à un niveau de concentration donné, douze valeurs différentes sont obtenues. Les CV cibles ont été déterminés selon les recommandations de la FDA (*Food and Drug Administration*) 2015 (32), qui stipulent qu'un CV de reproductibilité inférieur à 15% doit être l'objectif à atteindre pour les techniques utilisant la spectrométrie de masse. Dans les valeurs faibles, il serait possible d'accepter des CV de reproductibilité supérieurs à 15% à condition qu'ils restent inférieurs à 20%.

Les résultats sont présentés dans les tableaux 6 et 7 ci-dessous :

n=12	Dopamine		Norépinéphrine		Epinéphrine	
	Contrôle 1	Contrôle 2	Contrôle 1	Contrôle 2	Contrôle 1	Contrôle 2
Moyenne (µg/L)	86	263	47	113	12	38
CV (%)	4,5	5,5	16,3	12,6	7,7	7,4
CV cible (%)	15		20	15	15	

Tableau 6 : Reproductibilité (catécholamines).

n=12	3-Méthoxytyramine		Normétanéphrine		Métanéphrine	
	Contrôle 1	Contrôle 2	Contrôle 1	Contrôle 2	Contrôle 1	Contrôle 2
Moyenne (µg/L)	14	220	298	767	87	320
CV (%)	4,9	5,0	4,1	3,3	3,1	2,5
CV cible (%)	15		15		15	

Tableau 7 : Reproductibilité (dérivés méthoxylés).

Pour la norépinéphrine, le contrôle 1 présente un CV supérieur à 15% mais inférieur à 20%, il reste acceptable. Dans tous les cas, les CV calculés à partir des valeurs obtenues au cours du test de reproductibilité sont inférieurs aux CV cibles. La reproductibilité est validée.

A titre indicatif, l'annexe 4 montre les CV de reproductibilité, obtenus après passage en routine, sur l'année 2017, pour chaque analyte et pour les deux niveaux de contrôle.

e) Etendue de mesure et linéarité

L'étendue de mesure comprend la limite de détection, la limite de quantification et la limite supérieure de linéarité.

La limite de détection correspond au plus petit signal exprimé en quantité ou en concentration qui peut être distingué, avec une probabilité donnée, d'un blanc de réaction réalisé dans les mêmes conditions.

La limite de quantification correspond à la plus petite valeur mesurée, exprimée en concentration, qui peut être fournie pour un échantillon de patient.

La limite supérieure de linéarité correspond à la plus haute valeur, exprimée en concentration, après dilution d'un échantillon de concentration très élevée, pour laquelle nous observons une relation linéaire entre les concentrations théoriques des dilutions effectuées et les concentrations observées.

La limite de quantification et la limite supérieure de linéarité délimitent ce que nous dénommons le domaine de mesure de la méthode.

I - Limite de quantification

Afin de déterminer la limite de quantification (LOQ), nous avons utilisé le point de gamme n°2 (G2) que nous avons dosé dix fois pur, dilué au demi – ce qui correspond au point de gamme n°1 -, dilué au quart et dilué au huitième. Nous avons défini la LOQ comme étant la première concentration pour laquelle le coefficient de variation observé entre les dix valeurs était supérieur à 20% (annexe 5).

Aucune des dilutions effectuées ne présentait un CV supérieur à 20%. La concentration obtenue après dilution au huitième a donc été choisie comme notre limite de quantification pour chacun de nos six composés, étant donné que ces valeurs basses nous suffiraient amplement au niveau du rendu de résultats (puisque'il n'y a pas d'insuffisance de sécrétion) – seules les valeurs fortes nous intéressent dans le diagnostic d'un phéochromocytome/paragangliome.

II - Limite de détection

Tout comme la limite de quantification, la limite de détection (LOD) est d'un intérêt limité dans l'interprétation des résultats puisqu'elle est forcément à des concentrations plus faibles que la LOQ. Ainsi, nous définirons la limite de détection comme étant égale à 0,3 fois la limite de quantification : $LOD = LOQ \times 0,3$. Ceci découle du fait que la LOD est définie comme étant égale à 3 fois l'écart-type d'un blanc analysé dix fois ($LOD = 3 \times \sigma$), et la limite de quantification comme étant égale à 10 fois l'écart-type d'un blanc analysé dix fois ($LOQ = 10 \times \sigma$).

Les limites de quantification et limites de détection sont présentées dans le tableau 8. Les limites de quantification ont été arrondies à la valeur entière supérieure.

µg/L	Dopamine	Norépinéphrine	Epinéphrine	3-Méthoxytyramine	Normétanéphrine	Métanéphrine
LOQ	3	3	3	3	7	3
LOD	0,9	0,9	0,9	0,9	2,1	0,9

Tableau 8 : Limites de quantification et limites de détection.

III - Linéarité

Il convient de déterminer s'il existe bien une relation linéaire entre le signal détecté par le spectromètre de masse, exprimé sous la forme d'aire sous la courbe, pour l'analyte et son standard interne et les concentrations obtenues.

Chaque point de gamme, G0, G1, G2, G3, G4, G5 et G6 – classés par concentrations croissantes en analytes – est dosé cinq fois, avec des objectifs de linéarité inférieurs à 2 fois l'écart-type. L'équation de la droite obtenue et le coefficient de corrélation r^2 sont calculés automatiquement par le logiciel Analyst® (figure 12 et annexes 6 à 8).

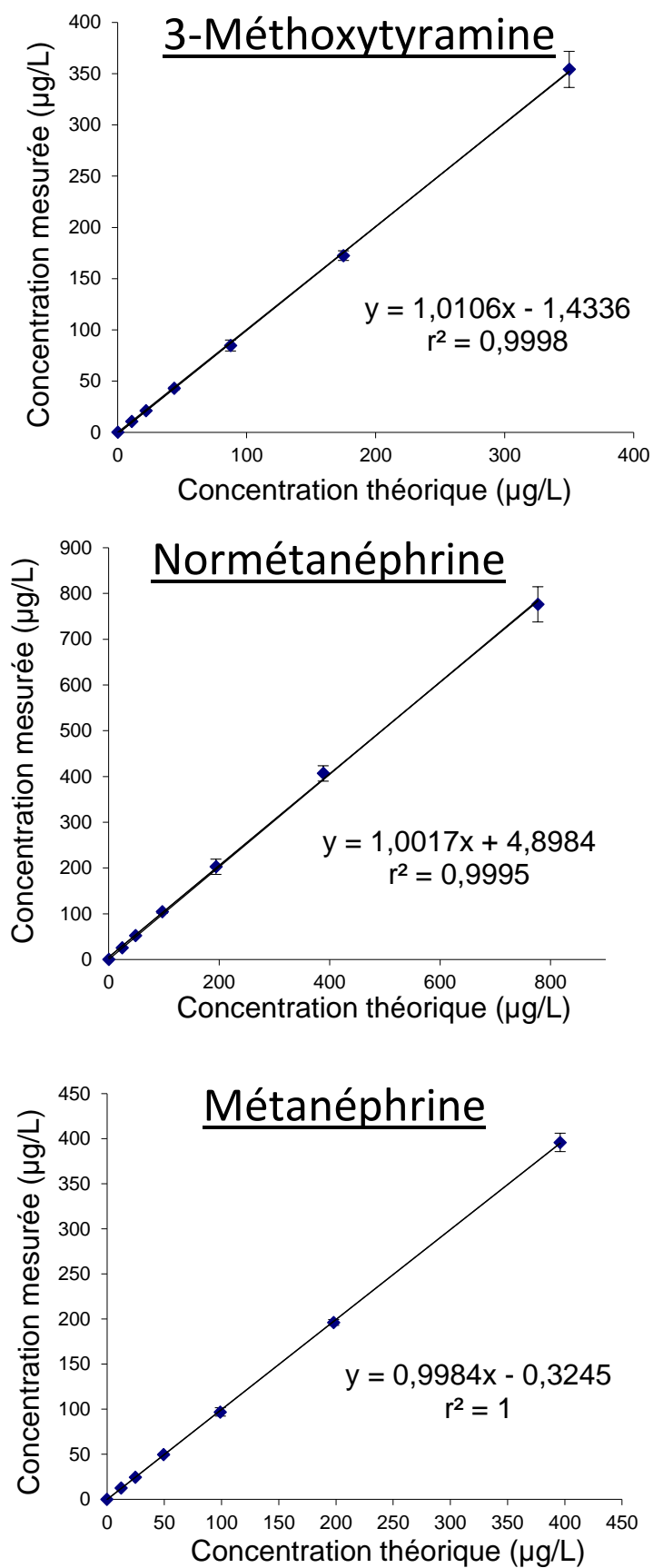


Figure 12 : Linéarité. Droites de calibration des dérivés méthoxylés urinaires.
Barres d'erreur à plus ou moins deux fois l'écart-type.

Les CV peuvent être importants pour G0 (il est difficile d'obtenir un CV satisfaisant pour une valeur aussi faible), mais pour un intervalle de plus ou moins 2 fois l'écart-type, les valeurs obtenues sont toutes bien alignées sur les droites de calibration, passant par ailleurs toutes par zéro. La figure 12 montre l'exemple de la 3-méthoxytyramine (pour les rares cas de phéochromocytome à dopamine), de la normétanéphrine et de la métanéphrine (par souci de lisibilité, nous nous intéresserons plus qu'à ces trois analytes sur lesquels repose le diagnostic de phéochromocytome). Les autres composés sont présentés en annexe 8. Il existe une parfaite corrélation entre les différents points pour chaque analyte d'intérêt, avec des coefficients de corrélation compris entre 0,9995 pour la normétanéphrine et 1 pour la dopamine et la métanéphrine. Ceci nous permet de conclure à une très bonne linéarité de notre méthode.

IV - Limite supérieure de linéarité

Enfin, pour déterminer la limite supérieure de linéarité, nous avons réalisé ce que nous appellerons des points G7 et G8, qui correspondent respectivement au point de gamme G6 concentré deux fois et concentré quatre fois. Nous les avons dosés et avons ensuite comparé les valeurs obtenues par rapport aux concentrations théoriques (tableaux 9 et 10).

µg/L	Dopamine		Norépinéphrine		Epinéphrine	
	G7	G8	G7	G8	G7	G8
Valeur cible	448,5	598	309	412	142,5	190
Valeur obtenue	445	584	365	606	140	186
CV (%)	0,55	1,68	11,75	26,95	1,25	1,50

Tableau 9 : Limites supérieures de linéarité (catécholamines).

µg/L	3-Méthoxytyramine		Normétanéphrine		Métanéphrine	
	G7	G8	G7	G8	G7	G8
Valeur cible	525	700	1165,5	1554	594	792
Valeur obtenue	515	675	1110	1420	595	785
CV (%)	1,36	2,57	3,45	3,45	0,12	0,63

Tableau 10 : Limites supérieures de linéarité (dérivés méthoxylés).

Les concentrations obtenues sont tout à fait satisfaisantes pour les points G7 et G8 pour chacun des analytes recherchés sauf pour la norépinéphrine, en particulier au point G8 où le coefficient de variation atteint presque les 27%. Au point G7, le CV est environ égal à 12%. Ainsi, nous décidons d'abandonner les points G7 et G8 et définissons le point G6 comme limite supérieure de linéarité, qui a été testée auparavant (cf *Linéarité* page 51) et qui nous satisfait pour les six analytes différents.

V - Domaine de mesure

Au final, tous ces résultats nous permettent de définir l'étendue de mesure, bornée par la limite de quantification dans les valeurs basses et la limite supérieure de linéarité dans les valeurs hautes, exprimées en µg/L, pour chaque paramètre, comme suit (tableau 11) :

Dopamine	Norépinéphrine	Epinéphrine	3-Méthoxytyramine	Normétanéphrine	Métanéphrine
[3,0 – 299]	[3,0 – 206]	[3,0 – 95]	[3,0 – 350]	[7,0 – 777]	[3,0 – 396]

Tableau 11 : Etendues de mesure (en µg/L) des catécholamines et dérivés méthoxylés urinaires.

f) Contaminations

Des phénomènes de contamination peuvent avoir lieu lors de l'utilisation de systèmes analytiques, en particulier au niveau des systèmes de pipetage des échantillons (contamination inter-échantillons) et de distribution des réactifs (contamination inter-réactifs) dans le cas de l'utilisation d'un distributeur automatique commun à tous les réactifs, par exemple. Ce dernier point ne nous concerne pas puisque la méthode développée ici est manuelle pour la préparation des échantillons. Nous n'avons donc étudié que la contamination inter-échantillons. Celle-ci pourrait se produire, dans notre cas, si le système chromatographique ne permet pas une élimination complète de l'échantillon à la fin du temps de *run*, pouvant conduire à des valeurs faussement élevées chez un échantillon de patient présentant des valeurs normales mais qui auraient été surestimées en raison d'un passage effectué juste après un contrôle fort ou un autre échantillon de patient ayant une forte concentration en analyte d'intérêt.

L'absence de contamination inter-échantillons est vérifiée en dosant trois fois consécutivement un échantillon de forte concentration (G6) (valeurs H1, H2 et H3, de moyenne mH), puis un échantillon de faible concentration (G1) également trois fois consécutivement (valeurs B1, B2 et B3). Cette séquence est répétée cinq fois afin d'obtenir les moyennes mB1 (moyenne des cinq valeurs B1) et mB3 (moyenne des cinq valeurs B3). Le niveau de contamination, exprimé en pourcentage (%), est calculé selon la formule suivante :

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

Le niveau de contamination doit être proche de 0%.

Les contaminations inter-échantillons que nous avons obtenues (tableau 12) sont proches de 0%, ce qui nous autorise à dire que la contamination inter-échantillons est négligeable dans notre méthode.

	Dopamine	Norépinéphrine	Epinéphrine	3-Méthoxytyramine	Normétanéphrine	Métanéphrine
Contamination (%)	0,014	0,052	0,002	0,015	0,067	0,047

Tableau 12 : Contaminations inter-échantillons (résultats bruts en annexe 9).

g) Effets matrice

Les liquides biologiques, comme les urines ou le sérum, de par leur nature complexe, sont susceptibles de contenir des composés qui vont co-éluer avec les analytes d'intérêt ou altérer leur ionisation (amplification ou suppression ionique). Ce phénomène peut compromettre la fiabilité des résultats. L'effet matrice est à la fois composé-dépendant et matrice-dépendant. Il peut être corrigé de manière adéquate en optimisant la préparation de l'échantillon et la séparation chromatographique. L'usage de standards internes deutérés, par exemple - comme c'est le cas ici -, et la définition de deux transitions pour chaque analyte – une dite quantitative, l'autre dite qualitative - sont indispensables pour garantir la fiabilité des résultats.

Pour que nous puissions qualifier notre méthode de « sélective » ou « spécifique », il faut qu'elle puisse permettre le dosage des analytes d'intérêt dans leur matrice urinaire. Les résultats ne doivent pas dépendre de substances « interférentes » qui pourraient altérer le signal de mesure et, en conséquence, entraîner des résultats erronés. L'objectif de la recherche des effets matrice est de vérifier l'absence d'influence de substances présentes dans les urines et dans la phase mobile – dans laquelle les extraits préparés sont repris - et potentiellement interférentes. Pour cela, nous avons réalisé un test de surcharge : nous avons choisi six urines d'aspect différent, non acidifiées – nous les avons sélectionnées sur la base de leurs concentrations en catécholamines et dérivés méthoxylés et avons choisi celles qui présentaient les concentrations les plus faibles - pour lesquelles nous avons réalisé deux niveaux de surcharge en leur ajoutant des volumes définis de solutions pures en analyte d'intérêt dilué dans du méthanol.

La surcharge basse correspond aux urines pour lesquelles nous avons ajouté 20 µg/L de chacun des analytes d'intérêt (sauf pour l'épinéphrine, ajout d'une concentration de 5 µg/L).

La surcharge haute correspond aux urines pour lesquelles nous avons ajouté 200 µg/L de chacun des analytes d'intérêt (sauf pour l'épinéphrine, ajout d'une concentration de 50 µg/L, par souci de rester dans l'étendue de mesure).

Puis, nous avons calculé le CV obtenu pour les six valeurs à chaque niveau de concentration et pour chaque analyte. Selon les recommandations de 2011 de l'Agence européenne des médicaments (*European Medicines Agency (EMA)*) (33), les effets matrice sont négligeables si ce CV est inférieur à 15%.

$\mu\text{g/L}$	n=6	Dopamine	Norépinéphrine	Epinéphrine
Surcharge basse	Moyenne	110	32	3,4
	CV (%)	12,9	11,3	12,0
Surcharge haute	Moyenne	268	163	30
	CV (%)	4,5	6,0	6,7

Tableau 13 : Effets matrice (catécholamines).

$\mu\text{g/L}$	n=6	3-Méthoxytyramine	Normétanéphrine	Métanéphrine
Surcharge basse	Moyenne	27	31	33
	CV (%)	6,3	4,2	4,1
Surcharge haute	Moyenne	164	222	227
	CV (%)	3,6	3,4	1,5

Tableau 14 : Effets matrice (dérivés méthoxylés).

Les CV calculés sont toujours inférieurs aux 15% recommandés (tableaux 13 et 14). Ainsi, les effets matrice sont négligeables dans notre méthode. Le milieu urinaire, et la phase mobile utilisée, ne semblent pas présenter de substances interférant significativement avec le dosage des catécholamines et des dérivés méthoxylés.

h) Comparaison de méthodes

La validation de méthode nécessite de comparer nos résultats à une méthode de référence. Nous avons donc choisi celle employée par le laboratoire Biomnis chez qui nous envoyions nos prélèvements jusqu'alors et qui utilise également une technique de LC-MS/MS. Les dosages ont été réalisés en double par le laboratoire Biomnis et au CHU pendant deux ans, ce qui nous a permis de comparer un peu plus d'une centaine de dosages pour chaque paramètre, catécholamines ou métanéphrines.

Par souci de simplicité, seuls les graphes (figures 13 et 14) concernant la 3-méthoxytyramine, la normétanéphrine et la métanéphrine, impliqués dans le diagnostic des phéochromocytomes, sont présentés dans cette partie. Ceux concernant les autres paramètres sont en annexes 10 à 18.

Les données sont présentées sous forme de régression linéaire de Passing-Bablok (graphe pour lequel les valeurs en ordonnée correspondent à celles de la méthode à valider Y_i et les valeurs en abscisse à celles de la méthode de référence X_i) et sous forme de graphe de concordance selon Bland-Altman (avec en ordonnée la différence entre les valeurs obtenues par les deux techniques ($X_i - Y_i$) et en abscisse les valeurs obtenues par la méthode de référence X_i). Dans ces graphes, seules les valeurs comprises dans l'étendue de mesure ont été conservées. Les valeurs inférieures à la limite de quantification ou supérieures à la limite de linéarité ont été exclues. En effet, des valeurs extrêmes pourraient influencer de façon importante les caractéristiques de la droite de régression en remettant en question le postulat d'une distribution normale des données nécessaire pour la régression linéaire (34).

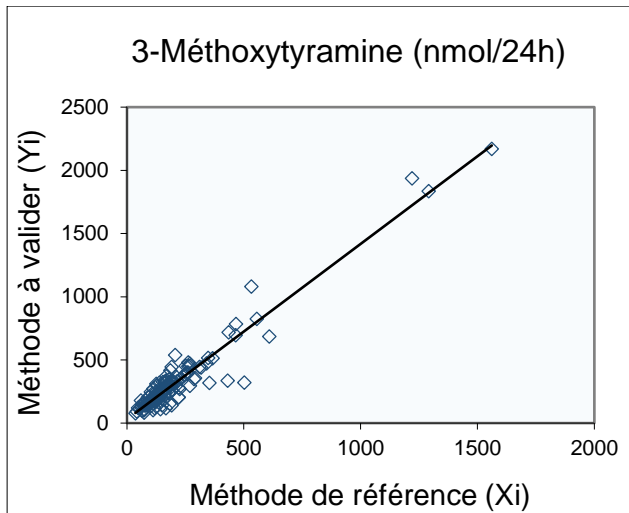
Pour les catécholamines, la comparaison de méthode a été effectuée en $\mu\text{g/L}$ et en $\mu\text{mol/mole}_{\text{créatinine}}$.

Pour les dérivés méthoxylés, en $\mu\text{g/L}$ et en nmol/24h .

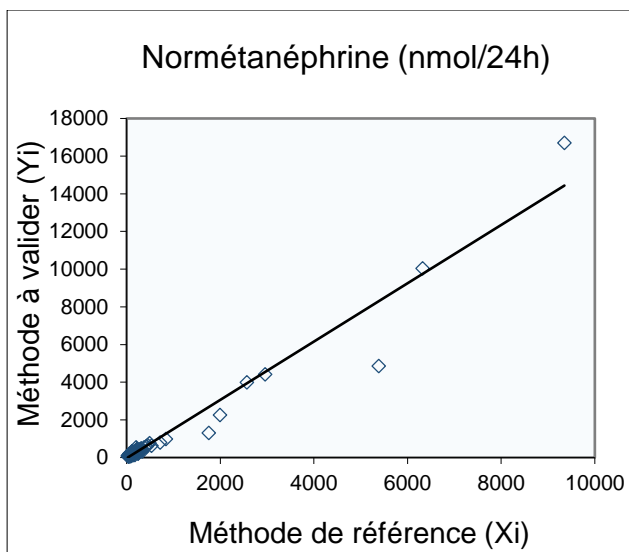
Il est important de noter que même si nous avons réalisé la validation de méthode en « concentrations » en $\mu\text{g/L}$, c'est bien en rapport ($\mu\text{mol/mole}_{\text{créatinine}}$) ou en « quantités » (nmol/24h) que les résultats sont rendus et que les valeurs de référence sont établies. Ainsi, une partie de ce sous-chapitre et du chapitre *Application clinique au CHU de Nantes* (page 106) ne seront centrés que sur ces unités, directement interprétables par rapport aux valeurs de référence.

I - Méthode de Passing-Bablok

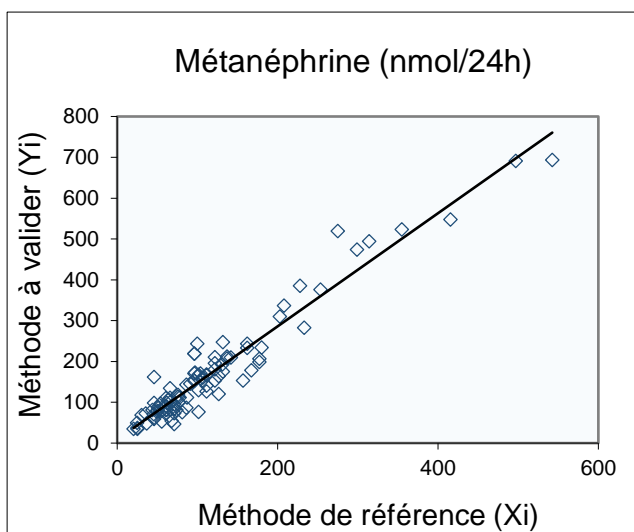
Les régressions linéaires selon la méthode de Passing-Bablok permettent de déterminer s'il existe une proportionnalité entre les deux techniques comparées (35). Le coefficient de corrélation (r^2 , issu du carré de r , le coefficient de Pearson qui évalue le degré de linéarité de la relation testée) est élevé pour les six analytes.



n	133
Equation de la droite	$y = 1,39x + 30,96$
r²	0,9605



n	117
Equation de la droite	$y = 1,55x - 35,8$
r²	0,9750



n	95
Equation de la droite	$y = 1,39x + 8,78$
r²	0,9640

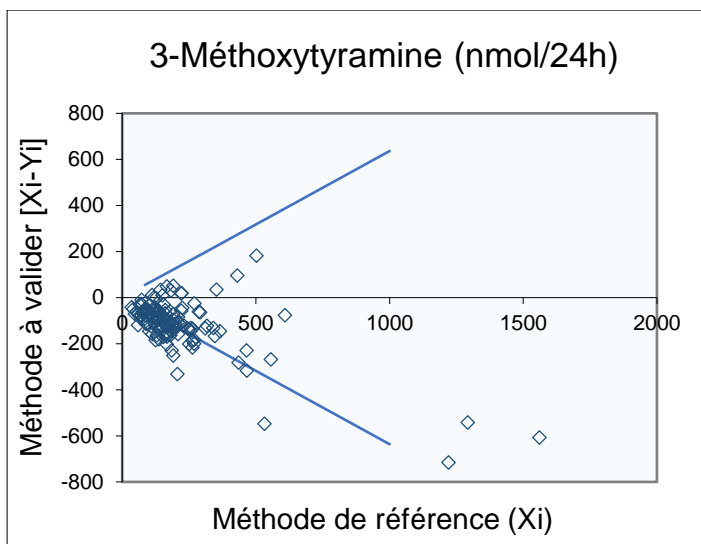
Figure 13 : Comparaison de méthodes : droites de régression de Passing-Bablok (dérivés méthoxylés).

C'est pour l'épinéphrine que le coefficient de corrélation est le plus faible (comparaison des concentrations en $\mu\text{g/L}$: $r^2 = 0,83$; comparaison des rapports en $\mu\text{mol/mole}_{\text{créatinine}}$: $r^2 = 0,88$). Ces coefficients, bien qu'ils soient satisfaisants, auraient pu être meilleurs si nous disposions d'un plus grand nombre d'échantillons compris dans le domaine de mesure de notre méthode. Pour la dopamine, le coefficient de corrélation est de 0,87 pour la comparaison des concentrations. En revanche, il passe à 0,96 pour la comparaison des quantités excrétées par 24h. Pour tous les autres composés, les coefficients de corrélation sont supérieurs à 0,95 à la fois en concentrations mais surtout en quantités, ce qui est tout à fait satisfaisant.

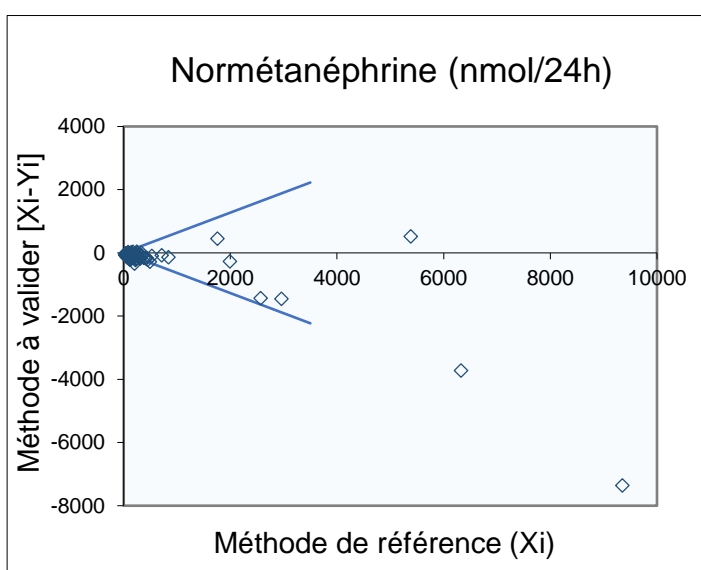
II - Méthode de Bland-Altman

Les graphiques selon la méthode de Bland-Altman permettent d'appréhender les biais entre nos résultats et ceux de Biomnis et de vérifier la concordance des deux méthodes (34). Le but est de savoir si les résultats que nous rendons sont proches ou bien différent significativement de la méthode de référence. En appréciant l'écart observé entre deux valeurs, nous pouvons en déduire le biais sur l'ensemble de la population.

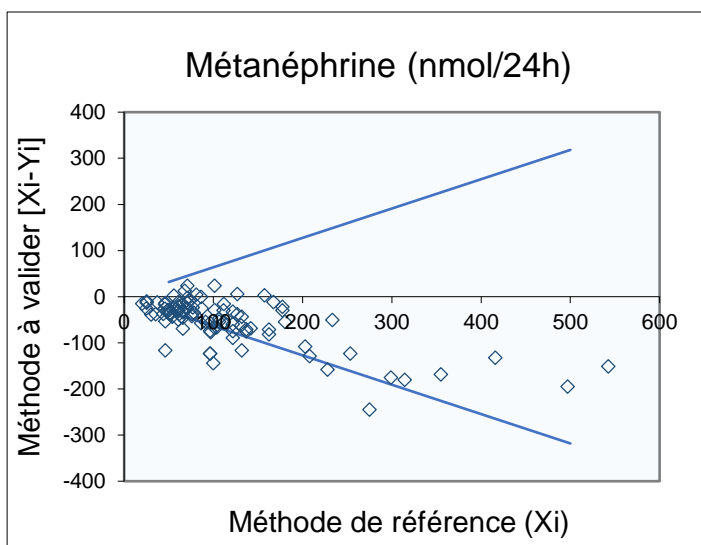
Les limites de concordance correspondent à deux écart-types par rapport à la moyenne et englobent l'intervalle dans lequel sont comprises 95% des différences. Sur les graphiques présentés, elles sont modélisées sous la forme de traits continus bleus (figure 14).



n	133
Biais moyen (%)	-111,64



n	117
Biais moyen (%)	-187,99



n	95
Biais moyen (%)	-53,58

Figure 14 : Comparaison de méthodes : graphiques de Bland-Altman (dérivés méthoxylés).

Plus les valeurs sont élevées, plus la différence entre les deux techniques est importante, comme en témoigne l'aspect en V couché du graphe de Bland-Altman pour les six composés. Cette caractéristique traduit une variation du biais avec la croissance des valeurs. C'est un renseignement très intéressant sur le plan clinique (34).

Le biais correspond à la moyenne des différences. Globalement, nous nous retrouvons souvent avec des biais négatifs, c'est-à-dire que nous avons tendance à rendre des résultats plus élevés que Biomnis.

En considérant les concentrations, hormis pour la dopamine, les biais sont faibles (allant de -2,97% pour l'épinéphrine (étendue de mesure étroite et, bien souvent, les valeurs rendues sont faibles) à -18,08% pour la normétanéphrine (étendue de mesure la plus large)). Ces résultats sont cohérents avec la remarque précédente : le biais augmente avec la concentration.

Concernant les valeurs rendues en $\mu\text{mol}/\text{mole}_{\text{créatinine}}$, hormis pour la dopamine, les biais sont faibles également (allant de -2,54% pour l'épinéphrine à -15,76% pour la norépinéphrine).

Concernant les valeurs rendues en $\text{nmol}/24\text{h}$, les biais sont de -111,64% pour la 3-méthoxytyramine, -187,99% pour la normétanéphrine et -53,58% pour la métanéphrine. Ces biais apparaissant de premier abord relativement importants sont en fait sans conséquence pour l'interprétation clinique, comme abordé dans les chapitres *Intervalles de référence* (page 61) et *Application clinique au CHU de Nantes* (page 106).

III - Cas particulier de la dopamine

Le dosage de la dopamine est principalement réservé au diagnostic du neuroblastome. Etant donné que ce sont les phéochromocytomes qui nous intéressent dans ce manuscrit de thèse, l'analyse des comparaisons pour la dopamine est effectuée en annexe 19.

i) Intervalles de référence

Des intervalles de référence pour les adultes ont été établis en recrutant des volontaires exempts de pathologie connue parmi le personnel du laboratoire. Pour chacun d'entre eux, un formulaire de consentement a été signé (annexe 2B). Les critères d'exclusion étaient toute pathologie connue, notamment l'hypertension artérielle et la prise de médicaments pouvant interférer avec le dosage (cf annexe 20 et *Interférences médicamenteuses* page 85). Un régime excluant les aliments riches en catécholamines (annexe 20) a été suivi pendant trois jours, le recueil des urines de 24 heures dans des pots dédiés a été effectué le troisième jour.

Pendant les 24 heures de recueil, toute activité physique intense, source de faux positifs (36), a été évitée. Les pots de recueil urinaire contenaient de l'acide chlorhydrique et étaient conservés à température ambiante jusqu'au retour au laboratoire. L'acide chlorhydrique empêche la dégradation de nos analytes d'intérêt dans les urines. Les informations sur les modalités entourant le recueil urinaire ont été transmises aux sujets participant à l'étude sous la forme d'une fiche d'information (annexe 2A).

Une fois revenues au laboratoire, la diurèse est notée dans un fichier Excel, les urines sont aliquotées en plusieurs fractions d'un millilitre chacune et sont conservées congelées à -20°C en attendant leur dosage.

Nous avons collecté 41 urines de volontaires sains adultes (âge > 19 ans). Nous avons par la suite réalisé les dosages (annexe 21).

Au regard du faible nombre de personnes recrutées, nous avons défini nos valeurs de référence selon Geffré *et al.* (30) grâce au logiciel Reference Value Advisor, outil complémentaire utilisable sous Excel, permettant l'établissement de valeurs de référence à partir d'un petit échantillon de valeurs.

Les valeurs de référence pour chaque catécholamine et dérivé méthyloxyé urinaire, chez les adultes, sont indiquées dans le tableau 15 suivant :

Analyte	Limite basse (nmol/24h)	Limite haute (nmol/24h)
Dopamine	609	3006
Norépinéphrine	90	673
Epinéphrine	3	65
3-Méthoxytyramine	73	439
Normétanéphrine	55	304
Métanéphrine	32	314

Tableau 15 : Intervalles de référence chez l'adulte définis pour chacun des six analytes grâce à Reference Value Advisor (n= 41 volontaires sains).

Les résultats de métanéphrine et normétanéphrine seront très en faveur d'un phéochromocytome ou de paragangliome, dès qu'ils présenteront une valeur supérieure à quatre fois les valeurs de référence (37) (38), en-dehors de toute interférence connue et dans un contexte clinique évocateur.

Ces valeurs de référence, tenant compte de la diurèse sur 24 heures, ne sont valables que pour les adultes. Nous ne pouvons pas les utiliser chez les enfants pour qui nous ne disposons souvent que d'une simple miction, et chez qui les valeurs diffèrent selon l'âge, nous obligeant à rendre des résultats exprimés en $\mu\text{mol}/\text{mole}_{\text{créatinine}}$. Nous n'avons, à ce jour, pas réalisé de valeurs de référence chez les enfants (jusqu'à 19 ans inclus). Pour eux, nous basons notre rendu de résultats et notre interprétation sur les valeurs de référence définies par l'équipe de Fraser Davidson *et al.* (39).

j) Stabilité

I - Stabilité des échantillons traités

La détermination du délai maximal pendant lequel un échantillon traité est stable permet de définir dans quel laps de temps une série de dosage peut être réanalysée dans un système de LC-MS/MS en cas de panne de l'appareillage. Au-delà de ce délai, l'ensemble de la manipulation devra être recommencée.

Pour tester la stabilité des échantillons une fois traités, 30 échantillons différents seront préparés et dosés purs au premier jour (J0) du test. Suite au passage dans le spectromètre de masse, les godets (*vials*) sont conservés à +4°C pendant une semaine. Des repassages de ces *vials* sur l'appareil de LC-MS/MS sont programmés au deuxième jour du test (J1), au troisième jour du test (J2) et à la fin de cette semaine à +4°C (J7). Puis, les *vials* sont conservées à -20°C avant d'être repassées à la fin du mois de test (J30) après un cycle de congélation-décongélation.

Tous les résultats obtenus pour chaque analyte et le standard interne correspondant, en aires sous la courbe et en concentrations, sont disponibles en annexes 22 à 27, et dans les tableaux 16 à 18 pour les concentrations de 3-méthoxytyramine, normétanéphrine et métanéphrine. Pour certains analytes, le nombre d'échantillons présentés est inférieur à 30. Cela est dû au fait que ces échantillons présentaient, à J0, des concentrations en analytes inférieures à la limite de quantification ou supérieures à la limite supérieure de linéarité pour l'analyte considéré.

Urine	3-Méthoxytyramine ($\mu\text{g/L}$)					CV (%)
	J0	J1	J2	J7	J30	
1	37	36	37	36	37	0,8
2	8	9	8	8	10	8,3
3	81	80	82	80	81	1,4
4	20	20	20	19	21	3,7
5	24	24	24	24	25	2,2
6	110	107	109	102	104	3,1
7	25	24	24	24	26	2,7
8	38	36	36	37	37	2,1
9	19	19	19	19	20	2,5
10	39	37	39	37	39	2,4
11	109	104	103	99	103	3,2
12	39	37	37	37	38	2,1
13	16	15	17	16	18	6,2
14	80	81	81	79	79	1,3
15	78	77	79	78	78	1,0
16	10	10	10	10	10	3,2
17	32	31	31	30	32	3,7
18	33	34	33	33	36	3,3
19	31	27	28	25	27	7,3
21	75	74	77	74	83	4,6
22	102	102	104	97	106	3,4
23	36	34	38	36	35	4,3
24	48	47	46	50	46	3,6
25	73	73	83	74	69	6,9
26	37	39	39	39	39	2,2
27	39	39	37	37	36	3,0
29	8	8	8	8	8	3,4
30	27	27	26	26	26	2,0

Tableau 16 : Stabilité des urines traitées. Concentrations en 3-méthoxytyramine aux temps J0, J1, J2, J7 et J30.

Urine	Normétanéphrine (µg/L)					CV (%)
	J0	J1	J2	J7	J30	
1	17	18	17	16	19	4,4
2	11	11	10	9	11	6,2
3	46	45	48	44	49	4,6
5	10	10	10	10	10	2,5
6	59	58	55	60	65	6,0
7	9	9	8	9	10	5,9
8	21	22	22	21	23	4,6
9	20	21	20	19	21	3,8
10	15	15	15	15	16	3,1
11	111	121	114	107	116	4,7
12	15	15	14	14	16	4,3
13	16	16	16	16	17	1,4
14	16	16	16	15	11	15,0
15	18	20	20	19	20	4,8
16	8	8	7	8	8	6,5
17	54	57	55	55	59	3,4
18	11	11	10	10	10	4,3
19	14	15	14	15	15	3,5
20	261	232	220	225	232	6,8
21	21	20	20	21	22	3,9
22	102	102	99	106	112	5,0
23	23	23	22	22	23	2,2
24	25	27	25	26	29	5,3
25	20	18	20	20	22	7,3
26	17	16	16	15	15	4,5
27	11	12	11	11	12	3,7
28	358	328	310	319	332	5,5
30	14	15	14	15	15	5,8

Tableau 17 : Stabilité des urines traitées. Concentrations en normétanéphrine aux temps J0, J1, J2, J7 et J30.

Urine	Métanéphrine ($\mu\text{g/L}$)					CV (%)
	J0	J1	J2	J7	J30	
3	55	55	55	55	55	0,3
4	3	3	3	3	3	2,3
5	6	6	6	6	6	1,5
6	50	51	50	51	51	0,9
7	4	3	4	4	4	4,4
9	13	13	13	13	14	1,9
10	17	17	17	17	18	1,9
11	51	50	51	51	52	1,1
12	16	16	16	16	16	1,0
13	4	4	4	4	4	3,8
14	15	15	15	16	16	1,4
15	9	9	9	9	9	1,3
16	4	4	4	4	4	2,9
17	26	26	26	27	27	1,6
18	12	12	12	12	12	1,6
20	35	35	35	36	36	1,4
21	47	47	47	48	48	0,7
22	25	24	24	25	25	1,2
23	14	14	14	14	14	1,7
24	21	20	21	21	21	1,2
25	18	18	18	18	18	0,9
26	17	17	17	17	17	1,4
27	15	15	15	16	16	1,7
28	45	45	45	45	46	1,1
29	3	3	3	3	3	2,3
30	6	6	7	6	6	3,8

Tableau 18 : Stabilité des urines traitées. Concentrations en métanéphrine aux temps J0, J1, J2, J7 et J30.

Les échantillons traités sont considérés comme stables si le CV entre la concentration cible (J0) et la concentration mesurée est inférieur à 20%. Tous les CV sont inférieurs à 20%. Ceci nous permet de conclure que les échantillons, une fois qu'ils ont été préparés et disposés en *vials*, sont stables 7 jours à +4°C et 30 jours à -20°C et peuvent donc être conservés dans ces conditions de temps et de température.

II - Stabilité des échantillons urinaires natifs

Afin d'envisager l'utilisation de cette technique en routine au laboratoire, à une fréquence hebdomadaire, nous souhaitons tester la stabilité des catécholamines et de leurs dérivés méthoxylés dans le milieu urinaire. En effet, il faut que ces analytes soient correctement conservés dans les urines en attendant les dosages, et dans le cas où des vérifications ultérieures seraient nécessaires.

Nous disposons de cinq urines différentes obtenues auprès de cinq volontaires sains par une simple miction. Ces urines sont surchargées en catécholamines et dérivés méthoxylés, à cinq concentrations différentes, grâce à l'ajout d'un certain volume du contrôle fort (contrôle maison, cf *Matériel et méthode* page 40), puis les dosages sont réalisés le lendemain (J0). Ces urines sont ensuite conservées à +4°C pendant 14 jours, puis à -20°C. Des redosages sont faits à J2, J7, J14 et J30 (tableaux 19 à 21 et annexes 28 à 32, l'épinéphrine n'est pas présentée en raison d'un problème persistant antérieur à cet essai).

Pour chaque urine et pour chacun des analytes, les valeurs de l'échantillon dosé pur (celles de l'échantillon dilué au dixième si les valeurs du pur ne sont pas comprises dans les valeurs de la gamme) non grisées dans les tableaux sont alors comparées entre elles aux différents temps. Il est convenu de ne pas tenir compte des valeurs aberrantes (valeurs surlignées en jaune ou en orange – les valeurs surlignées en jaune correspondent à celles qui ont un impact direct sur la concentration finale de l'analyte, les valeurs surlignées en orange n'ont pas d'impact direct sur la concentration en analytes mais sont à l'origine d'un coefficient de variation trop élevé, comme il le sera expliqué plus tard, et sont donc également exclues des calculs) dans l'interprétation, qui résultent sans doute d'une erreur ponctuelle réalisée lors du traitement des échantillons.

En comparant les tableaux des aires des échantillons d'urines par rapport aux tableaux des aires de l'étalon interne pour chaque tube analytique, on remarque que certaines aires, trop faibles par rapport aux valeurs attendues pour certains échantillons (valeurs surlignées en orange), sont corrélées à une diminution de l'étalon interne correspondant. Ceci est sans doute dû à un souci technique au cours du traitement des échantillons. Pour autant, ceci n'a pas d'impact sur la concentration obtenue au final (tableaux 19 à 21 et annexes 28 à 32).

	3-Méthoxytyramine ($\mu\text{g/L}$)					CV (%)
	J0	J2	J7	J14	J30	
Urine 1	190	184	180	178	199	4,6
Urine 1 1/10 ^{ème}	18	17,5	17,2	16,5	19,9	
Urine 2	245	237	235	234	274	6,9
Urine 2 1/10 ^{ème}	24,1	23	22,8	21,8	25,9	
Urine 3	300	286	285	275	313	5,1
Urine 3 1/10 ^{ème}	28,3	27,1	26,9	26,1	31,3	
Urine 4	363	338	332	341	372	4,7
Urine 4 1/10 ^{ème}	34,4	33,8	33	32,4	36,5	
Urine 5	415	401	389	391	430	5,1
Urine 5 1/10 ^{ème}	39,1	40,1	38,2	36,7	42	

Tableau 19 : Stabilité des urines natives. Concentrations en 3-méthoxytyramine pour chacune des cinq urines dosées pures et diluées au dixième et à chacun des différents temps.

	Normétanéphrine ($\mu\text{g/L}$)					CV (%)
	J0	J2	J7	J14	J30	
Urine 1	524	500	473	469	510	4,8
Urine 1 1/10 ^{ème}	51,4	50	47,1	45,9	50,9	
Urine 2	635	644	616	598	670	4,3
Urine 2 1/10 ^{ème}	65,5	64,9	62,8	62,7	71,2	
Urine 3	806	741	747	736	768	5,3
Urine 3 1/10 ^{ème}	85,4	82,5	76,8	77,7	86,1	
Urine 4	954	891	890	850	914	3,7
Urine 4 1/10 ^{ème}	98	95,2	91,5	95,5	101	
Urine 5	1140	1020	996	955	1060	3,5
Urine 5 1/10 ^{ème}	116	112	107	110	116	

Tableau 20 : Stabilité des urines natives. Concentrations en normétanéphrine pour chacune des cinq urines dosées pures et diluées au dixième et à chacun des différents temps.

	Métanéphrine (µg/L)					CV (%)
	J0	J2	J7	J14	J30	
Urine 1	227	224	221	218	227	1,8
Urine 1 1/10 ^{ème}	22,3	21,9	22,3	20,7	21,6	
Urine 2	319	300	311	310	307	2,2
Urine 2 1/10 ^{ème}	30,4	29,8	30	29,7	29,6	
Urine 3	354	370	367	349	376	3,1
Urine 3 1/10 ^{ème}	36,5	36,7	35	34,3	35,2	
Urine 4	477	438	457	432	463	1,6
Urine 4 1/10 ^{ème}	43,5	41,9	43,5	42,7	43,3	
Urine 5	523	501	524	498	505	2,3
Urine 5 1/10 ^{ème}	48,2	50,2	49	49,8	51,2	

Tableau 21 : Stabilité des urines natives. Concentrations en métanéphrine pour chacune des cinq urines dosées pures et diluées au dixième et à chacun des différents temps.

Les CV obtenus sont tous inférieurs à 20%. Nous concluons alors à une bonne stabilité des catécholamines et des dérivés méthoxylés dans le temps, sur la période et dans les conditions de conservation testées.

Urinothèque de marqueurs tumoraux :

Les catécholamines et dérivés méthoxylés urinaires servent au diagnostic de tumeurs comme le phéochromocytome ou le neuroblastome. Ils sont donc considérés comme des marqueurs tumoraux. A ce titre, comme stipulé dans l'annexe C de l'Arrêté du 26 novembre 1999 relatif à la bonne exécution des analyses de biologie médicale (40), ils doivent donc faire l'objet d'une conservation à une température de -18°C d'une durée légale minimale d'un an.

Nous avons prouvé que les analytes d'intérêt restaient stables dans les échantillons urinaires sur une période d'un mois. Pour savoir si c'est encore le cas sur une période plus importante, nous avons récupéré des échantillons de patients que nous conservions à -20°C et nous les avons redosés afin de comparer les résultats aux valeurs obtenues initialement (tableaux 22 à 24 et annexe 33). Nous avons, parmi ces échantillons, volontairement sélectionné des urines qui présentaient des valeurs très élevées pour certains composés.

Légende des tableaux 22, 23 et 24 :

t_0 = premier dosage réalisé sur les urines des patients,

t = temps écoulé entre la date de prélèvement et le redosage,

 coefficient de variation supérieur à 20%.

3-Méthoxytyramine ($\mu\text{g/L}$)			
t	t_0	t	CV (%)
1 an et 2 mois	22,1	18,9	11,0
1 an et 1 mois	73,1	59,7	14,3
1 an	70,5	61,9	9,2
10 mois	38,2	35,5	5,2
9 mois et demi	30,4	36	11,9
9 mois	64,3	63,6	0,8
7 mois	22,9	22,5	1,3
7 mois	32,5	28,6	9,0
6 mois et demi	1960	1950	0,4
6 mois	185	219	11,9

Tableau 22 : Concentrations en 3-méthoxytyramine pour dix échantillons urinaires dosés initialement et à un temps t .

Normétanéphrine ($\mu\text{g/L}$)			
t	t_0	t	CV (%)
1 an et 2 mois	29,4	25,2	10,9
1 an et 1 mois	64,8	51,7	15,9
1 an	44,9	41,5	5,6
10 mois	72,7	61,4	11,9
9 mois et demi	26,5	23,1	9,7
9 mois	100	95,3	3,4
7 mois	36,3	35,3	2,0
7 mois	70,8	63,9	7,2
6 mois et demi	56,2	49,7	8,7
6 mois	1290	1470	9,2

Tableau 23 : Concentrations en normétanéphrine pour dix échantillons urinaires dosés initialement et à un temps t .

t	Métanéphrine (µg/L)		
	t ₀	t	CV (%)
1 an et 2 mois	87,4	87,2	0,2
1 an et 1 mois	51,4	45	9,4
1 an	38,4	36,7	3,2
10 mois	20,8	19,5	4,6
9 mois et demi	59,2	61,4	2,6
9 mois	33	34,1	2,3
7 mois	79,4	86	5,6
7 mois	124	127	1,7
6 mois et demi	28,2	26,2	5,2
6 mois	1060	1450	22,0

Tableau 24 : Concentrations en métanéphrine pour dix échantillons urinaires dosés initialement et à un temps t.

Nous remarquons que, de manière générale, les valeurs varient peu entre le premier et le second dosage. Seuls trois échantillons urinaires ont des concentrations différant de plus de 20% par rapport au dosage initial (CV surlignés en jaune).

Après normalisation par rapport à la diurèse ou par rapport à la créatinine, seul le résultat de la dopamine revient dans l'intervalle de référence après redosage à 14 mois, alors qu'il était à 1,2N, le délai de conservation légale étant de 12 mois.

Nous ne disposons que de peu d'échantillons urinaires pour réaliser cette étude et nous avons sélectionné, dans notre urinothèque, que ceux qui nous paraissaient les plus pertinents. Nous n'avons donc testé qu'un petit nombre d'échantillons (dix pour les catécholamines, et dix pour les dérivés méthoxylés), mais nous remarquons déjà des variations à 5 ou 6 mois de conservation à -20°C . Il serait intéressant de refaire cette étude sur un nombre d'échantillons plus importants. Cela nous permettrait de décider de manière plus éclairée si nous devons adapter les conditions de conservation pour nos échantillons urinaires : température de conservation plus basse, temps de conservation plus restreint...

III - Stabilité des réactifs

Puisque, parmi les réactifs, seul le complexant présenterait un véritable intérêt de ne pas toujours être préparé extemporanément – en raison de sa préparation qui doit être anticipée la veille -, il s'agit du seul réactif pour lequel nous avons testé la stabilité au cours du temps.

Stabilité du complexant :

La constitution de la solution de complexant étant fastidieuse, l'objet de cette partie est de déterminer combien de temps il est possible de conserver la solution une fois constituée. Les résultats obtenus nous ont permis de conclure à une stabilité du complexant un mois à +4°C (annexe 34).

Au final, le tableau 25 résume les durées au cours desquelles il est possible de conserver échantillons et réactifs.

	Durée de conservation	
	+ 4°C	- 20 °C
Echantillons traités	7 jours	1 mois
Echantillons natifs	14 jours	1 mois
Complexant	1 mois	NA

Tableau 25 : Durées de conservation possibles des échantillons et réactifs.

k) Linéarité : validité des dilutions

Nous avons repris, de manière rétrospective, différents échantillons de patients techniqués sur une période s'étendant du 16 mai 2017 jusqu'au 04 septembre 2018 (236 échantillons). Chaque échantillon était envoyé chez notre sous-traitant, mais nous les avons, en parallèle, dosés purs, dilués au dixième et dilués au vingtième pour affiner la comparaison de méthode.

Après avoir pris compte du facteur de dilution dans nos calculs, nous avons comparé les trois valeurs obtenues entre elles. Seules les valeurs comprises dans l'étendue de mesure sont comparables – c'est-à-dire qu'il en faut au minimum deux dans l'étendue de mesure sur les trois valeurs obtenues pour un échantillon -, et ce seront donc les seules présentées ici. Les CV calculés nous permettent alors de savoir si diluer peut entraîner une différence significative entre le résultat attendu et le résultat obtenu. Le seuil de significativité a été fixé à 20% (tableaux 26 à 28 et annexes 35 à 37).

Légende des tableaux 26, 27 et 28 :

: valeur inférieure à la limite de quantification
 : valeur supérieure à l'étendue de mesure

N° éch	Etendue de mesure :	3-Méthoxytyramine (µg/L)		N° éch	Etendue de mesure :	3-Méthoxytyramine (µg/L)	
		[3 – 350]	CV (%)			[3 – 350]	CV (%)
1	Pur	627	2,4	13	Pur	122	7,3
	1/10 ^{ème}	612			110		
	1/20 ^{ème}	592			98,2		
2	Pur	271	2,3	14	Pur	268	6,8
	1/10 ^{ème}	268			240		
	1/20 ^{ème}	280			238		
3	Pur	105	1,3	15	Pur	271	3,7
	1/10 ^{ème}	107			255		
	1/20 ^{ème}	137,2			254		
4	Pur	353	0,2	16	Pur	2020	3,5
	1/10 ^{ème}	373			1960		
	1/20 ^{ème}	372			1866		
5	Pur	1040	3,0	17	Pur	977	2,4
	1/10 ^{ème}	1060			1130		
	1/20 ^{ème}	1016			1092		
6	Pur	825	0,8	18	Pur	2270	0,7
	1/10 ^{ème}	1040			2060		
	1/20 ^{ème}	1052			2040		
7	Pur	290	18,6	19	Pur	219	17,4
	1/10 ^{ème}	204			162		
	1/20 ^{ème}	226			226		
8	Pur	157	1,4	20	Pur	208	12,6
	1/10 ^{ème}	154			174		
	1/20 ^{ème}	154			IT		
9	Pur	146	4,5	21	Pur	185	8,1
	1/10 ^{ème}	137			165		
	1/20 ^{ème}	138,4			168,4		
10	Pur	203	3,9	22	Pur	169	3,4
	1/10 ^{ème}	189			161		
	1/20 ^{ème}	202			IT		
11	Pur	89	13,0	23	Pur	204	0,7
	1/10 ^{ème}	107			206		
	1/20 ^{ème}	91,2			197,4		
12	Pur	129	1,1	24	Pur	94,4	18,0
	1/10 ^{ème}	131			122		
	1/20 ^{ème}	125,8			119,8		

Tableau 26 : Dilutions : concentrations en 3-méthoxytyramine et CV.

		Normétanéphrine ($\mu\text{g/L}$)	
N° éch	Etendue de mesure :	[7 – 777]	CV (%)
1	Pur	1010	1,3
	1/10 ^{ème}	1020	
	1/20 ^{ème}	1002	
2	Pur	823	5,6
	1/10 ^{ème}	876	
	1/20 ^{ème}	948	
3	Pur	404	1,4
	1/10 ^{ème}	412	
	1/20 ^{ème}	430	
4	Pur	334	6,3
	1/10 ^{ème}	365	
	1/20 ^{ème}	IT	
5	Pur	1360	3,1
	1/10 ^{ème}	1290	
	1/20 ^{ème}	1348	
6	Pur	377	4,7
	1/10 ^{ème}	353	
	1/20 ^{ème}	352	
7	Pur	465	2,2
	1/10 ^{ème}	480	
	1/20 ^{ème}	444	

Tableau 27 : Dilutions : concentrations en normétanéphrine et CV.

		Métanéphrine ($\mu\text{g/L}$)	
N° éch	Etendue de mesure :	[3 – 396]	CV (%)
1	Pur	1410	0,5
	1/10 ^{ème}	1650	
	1/20 ^{ème}	1662	
2	Pur	124	0,6
	1/10 ^{ème}	123	
	1/20 ^{ème}	112,4	
3	Pur	1110	2,8
	1/10 ^{ème}	1060	
	1/20 ^{ème}	1102	

Tableau 28 : Dilutions : concentrations en métanéphrine et CV.

Les CV sont toujours inférieurs à 20% pour chacun des six paramètres, excepté pour la dopamine.

Concernant la dopamine, 8 sur les 188 échantillons dosés ont un CV supérieur à 20%. Cela représente 4% des échantillons. Parmi ces 8 échantillons, 5 restaient dans des valeurs franchement normales (après conversion en nmol/24h ou en $\mu\text{mol}/\text{mole}_{\text{créatinine}}$). 3 avaient des valeurs franchement élevées. Pour celles-ci, de même, il n'y avait aucun doute quant à l'interprétation finale, les valeurs restant dans tous les cas comprises entre 2N et 4N (il y aurait, en fait, 2 échantillons pour lesquels les valeurs ne seraient pas décidées entre être comprises entre 2N et 4N ou supérieures à 4N. Pour ces échantillons, un redosage pour vérification peut tout à fait être envisagé ; et le contexte doit être étudié de plus près). 2 échantillons sur les 188 ont des valeurs un peu limites. Toutefois, elles ne sont pas incohérentes entre elles. En effet, nous n'observons jamais le cas où une valeur est située dans l'intervalle de référence et une autre est supérieure à quatre fois la limite supérieure de l'intervalle de référence, par exemple. Ainsi, nous pouvons être satisfaits des résultats de ce test.

Enfin, il est à noter que pour la dopamine, nous avons 8 valeurs très pathologiques qui ne se situent pas dans l'étendue de mesure même après dilutions au vingtième. Nous ne pouvons pas les comparer, et elles ne sont donc pas présentées.

Nous pouvons aussi critiquer le nombre d'échantillons dont nous disposons. En effet, au final, parmi les 236 échantillons de départ, nous n'avons pu en garder que 3 pour la métanéphrine et l'épinéphrine, 7 pour la normétanéphrine et 8 pour la norépinéphrine, ce qui est peu. Mais pour ces quatre paramètres, il faut noter que la très grande majorité de nos échantillons avaient des valeurs inférieures à la limite de quantification pour au moins deux valeurs si ce n'est pour les trois dont nous disposons pour chaque échantillon. Il était donc difficile d'obtenir des échantillons correspondant à nos attentes.

Malgré ces quelques détails, nous pouvons tout de même conclure que les dilutions n'ont pas d'influence significative sur les valeurs obtenues. Il s'agit ici d'un bon point puisque, dans les cas où les valeurs sont élevées, les valeurs obtenues sur les dilutions peuvent non seulement nous servir de contrôle – ainsi nous sommes en mesure de vérifier cette valeur forte sur un tube différent du pur, ce qui permet de s'affranchir des erreurs humaines lors du traitement des échantillons – mais permettent aussi de s'assurer de l'exactitude de la valeur pour envisager un suivi dans le temps de la cinétique de celle-ci, en vue ou suite à un traitement.

III – Influence du pH urinaire

1 – Objectif

Nous avons voulu savoir si le pH urinaire influe sur le dosage de nos catécholamines et de leurs dérivés méthoxylés par notre technique. De nombreuses urines arrivent chaque jour au laboratoire et sont aliquotées telles quelles en attendant d'être analysées, sans que leur pH ne soit pris en considération. Jusqu'ici, nous acceptions toutes les urines qui nous étaient envoyées, et nous rendions des résultats sous réserve dans des cas de pH atteignant des valeurs extrêmes autant acides que basiques. Mais la question de la dégradation des analytes recherchés se pose – notre objectif est d'éviter à tout prix de rendre des valeurs faussement négatives ou faussement positives (41) (42). C'est pourquoi tester l'influence du pH urinaire sur le rendu de résultats des catécholamines et des dérivés méthoxylés urinaires nous importait. Suite à cela, nous pourrions émettre des commentaires, ou bien refuser de traiter certaines urines qui présentent des valeurs de pH incompatibles avec un bon rendu de résultats biologiques.

2 – Matériel et méthode

1) Recueil urinaire

Nous avons récupéré, dans un pot de recueil urinaire non acidifié, une miction d'un volontaire sain qui avait consommé du bicarbonate de soude dilué dans de l'eau pendant deux jours précédant la miction. Cette urine de base présente alors un pH égal à 8 lors du recueil.

2) Préparation des échantillons

La figure 15 montre la démarche mise en œuvre pour préparer les échantillons dont nous avons besoin. Une partie de l'urine de base est conservée telle quelle. Une autre partie est acidifiée jusqu'à un pH égal à 5 grâce à de l'acide chlorhydrique. Puis, on réalise des surcharges, à deux niveaux différents (Niv 1, la surcharge niveau faible et Niv 2, la surcharge niveau fort) en catécholamines et dérivés méthoxylés, par l'ajout d'un certain volume de contrôle fort « maison » (cf *Matériel et méthode* page 40). Une partie de l'urine, qu'elle soit à un pH égal à 8 ou à un pH égal à 5, reste non surchargée, ce qui nous permettra de connaître

les concentrations de base en catécholamines et dérivés méthoxylés. Les urines surchargées ou non subissent alors des acidifications progressives, par ajout d'acide chlorhydrique HCl.

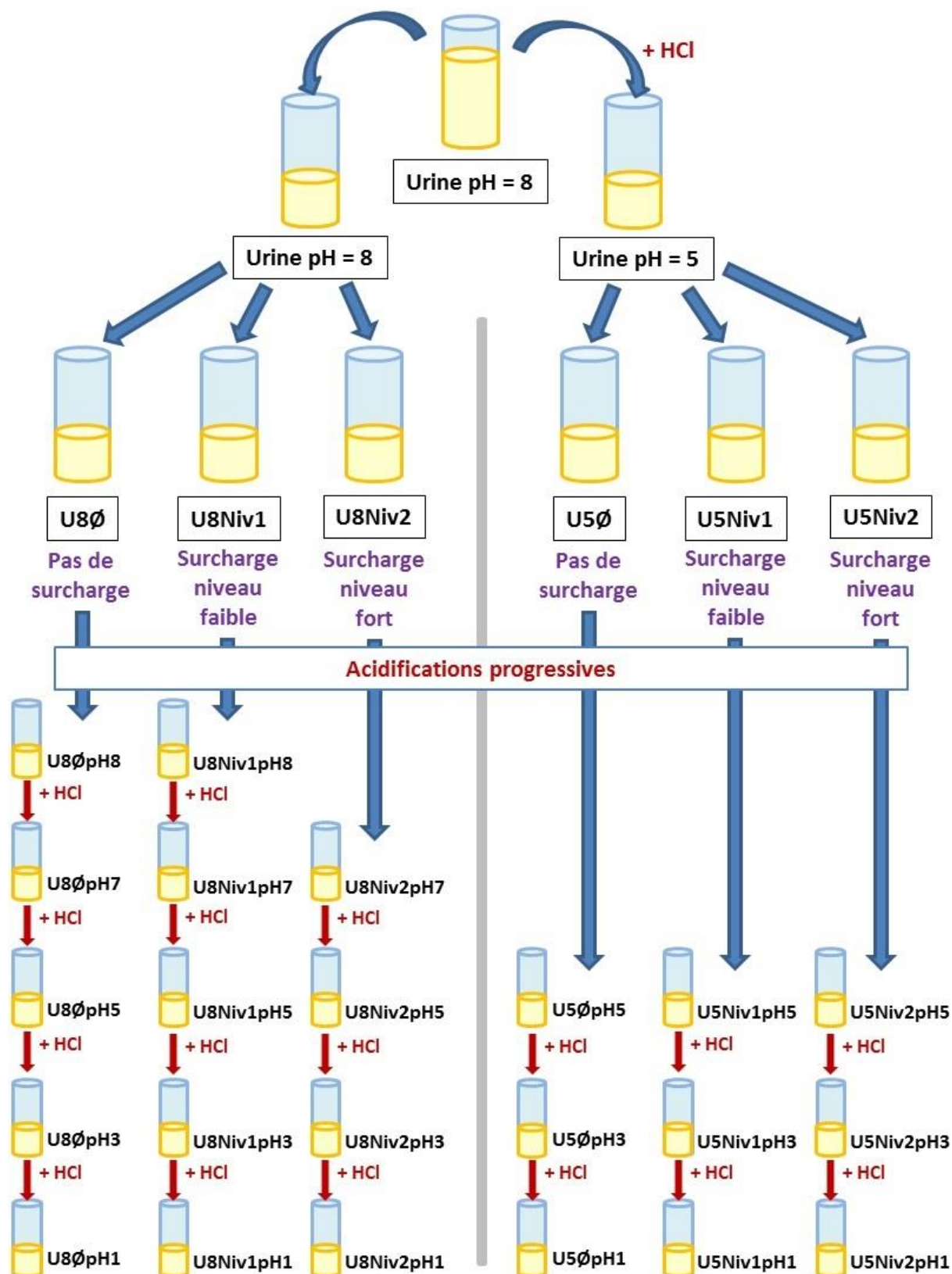


Figure 15 : Préparation des échantillons pour le test de l'influence du pH urinaire.

Tous ces échantillons sont laissés 24 heures à +4°C. Le dosage des catécholamines et des dérivés méthoxylés est réalisé le jour suivant les ajouts et les acidifications pour permettre aux réactions chimiques de se mettre en place et de mimer les conditions dans lesquelles ces analytes évoluent selon la prise en charge des urines, c'est-à-dire dans le cas où elles ne sont pas directement acidifiées lors de leur réception au laboratoire, conservant ainsi leur pH de base à réception.

3 – Résultats

Les résultats sont reportés dans les tableaux 29 à 31 pour la 3-méthoxytyramine, la normétanéphrine et la métanéphrine, et en annexes 38 et 39 pour les autres composés (épinéphrine non présentée).

Les moyennes et les CV sont calculés pour chacun des cinq analytes et pour chacun des six échantillons d'urine que nous avons de base avant de réaliser des acidifications progressives de ces urines. Les CV corrigés correspondent aux coefficients de variation calculés sans tenir compte des valeurs dites aberrantes (surlignées en orange).

	Nom de l'échantillon	3-Méthoxytyramine ($\mu\text{g/L}$)	
U5 \emptyset	U5 \emptyset pH5	4,1	CV (%) = 1,4 Moyenne = 4,2
	U5 \emptyset pH3	4,2	
	U5 \emptyset pH1	4,3	
U5Niv1	U5Niv1pH5	116	CV (%) = 1,0 Moyenne = 115
	U5Niv1pH3	114	
	U5Niv1pH1	114	
U5Niv2	U5Niv2pH5	291	CV (%) = 0,7 Moyenne = 293
	U5Niv2pH3	295	
	U5Niv2pH1	292	
U8 \emptyset	U8 \emptyset pH8	4,9	CV (%) = 3,4 Moyenne = 4,8
	U8 \emptyset pH7	4,9	
	U8 \emptyset pH5	4,8	
	U8 \emptyset pH3	4,7	
	U8 \emptyset pH1	4,5	
U8Niv1	U8Niv1pH8	112	CV (%) = 4,8 Moyenne = 113
	U8Niv1pH7	116	
	U8Niv1pH5	106	
	U8Niv1pH3	110	
	U8Niv1pH1	120	
U8Niv2	U8Niv2pH7	291	CV (%) = 5,8 Moyenne = 276
	U8Niv2pH5	285	
	U8Niv2pH3	272	
	U8Niv2pH1	255	

Comparaison urines pH=5 vs urines pH=8
Urines non surchargées : CV (%) = 8,8
Urines surcharge faible : CV (%) = 1,2
Urines surcharge forte : CV (%) = 4,2

Comparaison des valeurs entre les urines recueillies à pH égal à 5 et celles à pH égal à 8 pour les différents niveaux de surcharge.

Tableau 29 : 3-Méthoxytyramine : résultats du test de l'influence du pH urinaire.

	Nom de l'échantillon	Normétanéphrine (µg/L)	
U5∅	U5∅pH5	7,3	CV (%) = 6,3 Moyenne = 6,9
	U5∅pH3	6,5	
	U5∅pH1	7,0	
U5Niv1	U5Niv1pH5	350	CV (%) = 0,7 Moyenne = 353
	U5Niv1pH3	354	
	U5Niv1pH1	354	
U5Niv2	U5Niv2pH5	830	CV (%) = 2,2 Moyenne = 831
	U5Niv2pH3	850	
	U5Niv2pH1	814	
U8∅	U8∅pH8	7,9	CV (%) = 6,0 Moyenne = 7,5
	U8∅pH7	7,6	
	U8∅pH5	6,7	
	U8∅pH3	7,4	
	U8∅pH1	7,7	
U8Niv1	U8Niv1pH8	340	CV (%) = 4,1 Moyenne = 332
	U8Niv1pH7	346	
	U8Niv1pH5	311	
	U8Niv1pH3	334	
	U8Niv1pH1	328	
U8Niv2	U8Niv2pH7	823	CV (%) = 3,3 Moyenne = 821
	U8Niv2pH5	806	
	U8Niv2pH3	858	
	U8Niv2pH1	797	

Comparaison urines pH=5 vs urines pH=8
Urines non surchargées : CV (%) = 5,5
Urines surcharge faible : CV (%) = 4,3
Urines surcharge forte : CV (%) = 0,9

Comparaison des valeurs entre les urines recueillies à pH égal à 5 et celles à pH égal à 8 pour les différents niveaux de surcharge.

Tableau 30 : Normétanéphrine : résultats du test de l'influence du pH urinaire.

	Nom de l'échantillon	Métanéphrine ($\mu\text{g/L}$)	
U5 \emptyset	U5 \emptyset pH5	7,0	CV (%) = 4,6 Moyenne = 7,0
	U5 \emptyset pH3	6,7	
	U5 \emptyset pH1	7,3	
U5Niv1	U5Niv1pH5	141	CV (%) = 0,7 Moyenne = 142
	U5Niv1pH3	142	
	U5Niv1pH1	143	
U5Niv2	U5Niv2pH5	351	CV (%) = 2,0 Moyenne = 347
	U5Niv2pH3	351	
	U5Niv2pH1	339	
U8 \emptyset	U8 \emptyset pH8	7,8	CV (%) = 3,0 Moyenne = 7,5
	U8 \emptyset pH7	7,5	
	U8 \emptyset pH5	7,4	
	U8 \emptyset pH3	7,3	
	U8 \emptyset pH1	7,6	
U8Niv1	U8Niv1pH8	143	CV (%) = 6,1 Moyenne = 134
	U8Niv1pH7	138	
	U8Niv1pH5	122	
	U8Niv1pH3	131	
	U8Niv1pH1	138	
U8Niv2	U8Niv2pH7	341	CV (%) = 2,5 Moyenne = 347
	U8Niv2pH5	356	
	U8Niv2pH3	352	
	U8Niv2pH1	338	

Comparaison urines pH=5 vs urines pH=8
Urines non surchargées: CV (%) = 5,4
Urines surchargées niveau 1: CV (%) = 3,9
Urines surchargées niveau 2: CV (%) = 0,1

Comparaison des valeurs entre les urines recueillies à pH égal à 5 et celles à pH égal à 8 pour les différents niveaux de surcharge.

Tableau 31 : Métanéphrine : résultats du test de l'influence du pH urinaire.

Les valeurs dites « aberrantes » surlignées en orange apparaissent pour un pH égal à 7 ou à 8. Seules les catécholamines sont concernées. Ce sont des valeurs qui sont sous-estimées par rapport à celles que nous obtenons à un pH acide, comme l'indique le faible rendement qui a été calculé à partir de cette valeur et en prenant en tant que dénominateur la moyenne des autres valeurs obtenues à des pH plus acides. Ainsi, dans ce cas, les CV initialement élevés ont pu être corrigés en excluant ces valeurs sous-estimées de nos calculs.

L'objectif du calcul du CV est de montrer qu'il existe peu de différences entre les valeurs obtenues pour chacun des cinq analytes pour des pH compris entre 1 et 5 pour les catécholamines, et pour des pH compris entre 1 et 7 pour les dérivés méthoxylés, suggérant ainsi que les cinq analytes restent tous stables pour des pH compris entre 1 et 5.

Dans un second temps, les CV des moyennes entre les urines ayant un pH égal à 8 à l'origine et celles ayant un pH égal à 5, pour les urines non surchargées et surchargées à un niveau faible ou fort en catécholamines et dérivés méthoxylés, sont ensuite calculés. Ceci est possible du fait que ces urines à pH égal à 8 ou à pH égal à 5 proviennent de la même personne et de la même miction. Ces CV ne tiennent pas compte non plus des valeurs qui ont pu être sous-estimées. Ces CV sont tous inférieurs à 10%. Nous démontrons alors que si nous recueillons aléatoirement des urines chez des patients et que celles-ci sont acides ou bien même faiblement basiques (un pH urinaire supérieur à 8 étant rare), tant que ces urines – en particulier celles qui possèdent un pH basique – sont acidifiées immédiatement après le recueil, il n'y a pas d'impact observé sur les concentrations obtenues par rapport aux valeurs réelles attendues.

Ceci doit donc encourager à une acidification des urines jusqu'à un pH compris entre 1 et 5.

4 – Discussion

Au total, nous remarquons qu'il existe, pour certains composés – les catécholamines, que sont la norépinéphrine et la dopamine, et vraisemblablement l'épinéphrine également –, une influence du pH urinaire sur les valeurs obtenues. Il semble qu'un pH basique, strictement supérieur à 5, joue sur la concentration en catécholamines dans les urines en sous-estimant les valeurs réelles. Ceci est dû à une dégradation rapide des catécholamines, qui est un phénomène bien connu (43) lorsque les urines sont laissées à température ambiante ou à une température de +4°C sans qu'il y ait eu d'acidification suite au recueil urinaire. Concernant les dérivés méthoxylés des catécholamines que sont la métanéphrine, la normétanéphrine et la 3-méthoxytyramine, il ne semble pas y avoir d'influence du pH aux valeurs testées, c'est-à-dire pour un pH compris entre 8 et 1.

Des publications préconisent d'obtenir un pH compris entre 2 et 4 (41) (42) pour que tous ces composés soient correctement conservés, mais notre analyse présentée ici montre qu'il n'y a pas de variation significative entre les valeurs de concentrations des catécholamines et de leurs dérivés méthoxylés pour des pH compris entre 1 et 5. Ainsi, un pH égal à 5 serait suffisant pour conserver les échantillons urinaires, et un pH égal à 1 resterait acceptable puisqu'il n'y a pas de dégradation observée des analytes ou d'hydrolyse potentielle de formes conjuguées. Dans le cas où les urines du recueil sont basiques, c'est-à-dire avec un pH supérieur à 5, il faut préconiser une acidification dès réception de ces urines pour que les catécholamines, en particulier, ne soient pas dégradées avant que le dosage ne soit réalisé. En pratique au laboratoire, si nous nous apercevons que nous devons réaliser ces dosages sur des urines ayant un pH inférieur à 1 ou supérieur à 5, nous acceptons quand même ces urines et rendons les résultats sous réserve (puisque en soi, si les valeurs sont très élevées, peu importe le pH, le diagnostic sera tout de même fait sans erreur).

Cependant, nous avons effectué nos dosages le lendemain de l'acidification. Notre conclusion est donc valable pour des urines dosées le jour suivant leur réception au laboratoire. De plus, les échantillons ont été conservés à +4°C avant dosage alors qu'en pratique, les patients conservent les flacons de recueil à température ambiante. Il serait probablement judicieux de réaliser cette étude de nouveau, à la fois sur une période plus longue mais aussi sur un plus grand nombre d'urines, et après conservation des urines à température ambiante.

Par ailleurs, nous pouvons nous interroger sur la dégradation de ces catécholamines dans les urines. Quel est le mécanisme ? Quel(s) composé(s) naissent de cette dégradation ? Et qu'en est-il des formes conjuguées (qui représentent 90% des catécholamines et des dérivés méthoxylés totaux dans les urines), sont-elles stables ? A quel pH ? Ce sont autant de questions qui, pour l'instant, restent en suspens et qui mériteraient de s'attarder davantage dessus.

IV – Interférences alimentaires et médicamenteuses

1 – Interférences dues au stress

Certaines pathologies impliquant l'activation du système nerveux sympathique peuvent être responsables de pseudo-phéochromocytomes associés à des taux élevés de catécholamines sanguins et urinaires, mimant alors partiellement les signes biologiques du phéochromocytome et pouvant être à l'origine d'une hypertonie sympathique. Ces situations cliniques sont résumées dans le tableau 32. Parmi ces pathologies, nous pouvons noter celles qui touchent le système nerveux central, comme la migraine, ou encore celles qui constituent une réponse physiologique à une affection extra-neurologique comme l'insuffisance coronarienne et/ou cardiaque, fréquentes dans la population générale. Enfin, Lefebvre souligne que l'hyperthyroïdie est responsable d'une potentialisation des effets des catécholamines due à une élévation du taux d'hormones thyroïdiennes dans l'organisme (44).

<p><i>Anxiété</i> <i>Déshydratation extra-cellulaire majeure</i> <i>Migraine</i> <i>Apnées du sommeil de type obstructif</i> <i>Encéphalopathie hypertensive</i> <i>Tumeurs et hémorragies intra-cérébrales</i> <i>Compression médullaire</i> <i>Syndrome de Guillain-Barré</i> <i>Insuffisance coronarienne et cardiaque</i> <i>Hyperthyroïdie</i></p>
--

Tableau 32 : Circonstances cliniques associées à une hypertonie sympathique (44).

Par ailleurs, il a été montré qu'un exercice physique pouvait être responsable d'une augmentation des taux circulants de métanéphrine et normétanéphrine de 60 à 230% (45) selon le degré d'intensité de l'activité physique. Et ces taux ne reviennent pas à la normale en 30 minutes de repos (période correspondant à cinq fois la demi-vie des catécholamines) (46).

2 – Interférences médicamenteuses

De nombreux médicaments sont susceptibles d'interférer avec le dosage des catécholamines et dérivés méthoxylés urinaires, soit indirectement en entraînant, par un mécanisme pharmacodynamique, une augmentation de la concentration sanguine puis urinaire des composés, soit directement du fait de la structure du médicament qui est proche de celles de nos composés d'intérêt et qui peut donc entraîner soit une surestimation des valeurs obtenues, soit des interférences sur le chromatogramme pouvant rendre difficile la quantification du composé d'intérêt. On différenciera donc les médicaments à l'origine d'interférences pharmacodynamiques de ceux à l'origine d'interférences analytiques.

1) Interférences pharmacodynamiques

Les molécules responsables d'interférences pharmacodynamiques entraînent une modification de la sécrétion ou du catabolisme des catécholamines (tableau 33). En résulte une augmentation des taux sanguins ou urinaires des catécholamines et de leurs dérivés méthoxylés. Le patient présente alors de véritables signes cliniques d'hyperadrénergisme, ce qui aboutit à un tableau de pseudo-phéochromocytome médicamenteux (figure 16). La normalisation du bilan hormonal après arrêt du traitement permet d'éliminer le diagnostic de phéochromocytome (47).

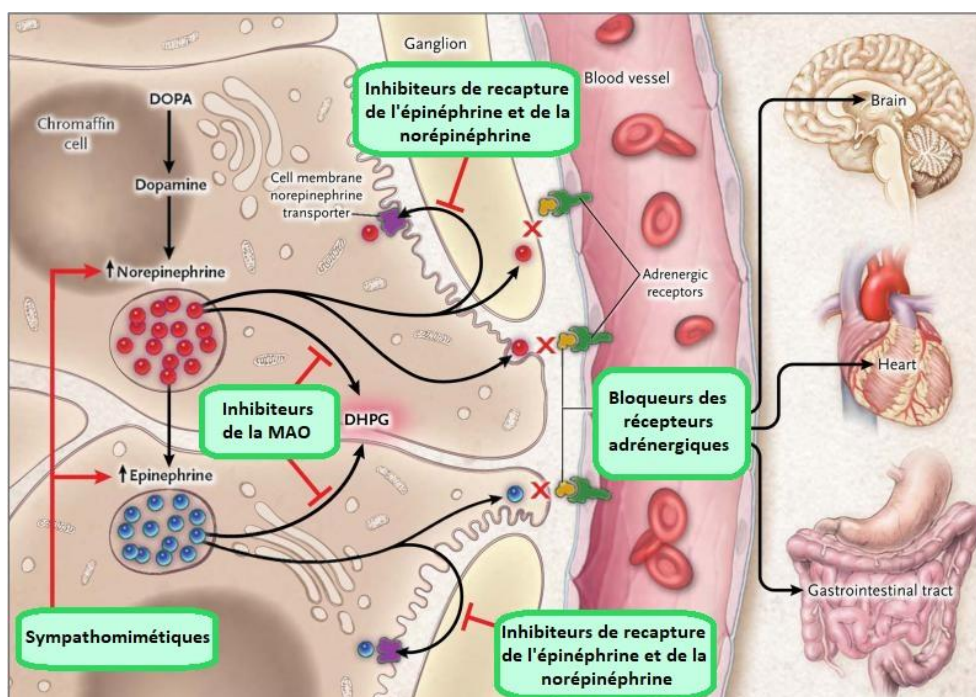


Figure 16 : Mécanismes d'interférences pharmacologiques avec les catécholamines et les dérivés méthoxylés urinaires. D'après (47).

Nous différencions les sympathomimétiques directs (qui sont des agonistes des récepteurs adrénergiques périphériques et qui sont directement responsables des signes cliniques d'hyperadrénergisme) des sympathomimétiques indirects (qui activent le système sympathique et la production de catécholamines par stimulation des neurones sympathiques centraux ou par augmentation du relargage des catécholamines par les terminaisons sympathiques périphériques).

Ainsi, tandis que les vasoconstricteurs comme la phényléthanolamine, la phénylpropylamine, la phényléphrine ou l'éphédrine et la pseudoéphédrine (utilisés comme décongestionnants nasaux), la midodrine (utilisée en traitement de l'hypotension orthostatique sévère), ou l'ecstasy (dans le cadre d'une toxicomanie) vont être responsables d'effets directs sur le système sympathique, les amphétamines, cocaïne et β -agonistes des récepteurs adrénergiques tels que la terbutaline, le salmétérol, le salbutamol ou l'éphédrine auront des effets indirects en augmentant les concentrations des catécholamines dans le sang, puis dans les urines. Les inhibiteurs de la MAO bloquent leur dégradation en dihydroxyphénylglycol (DHPG), en résulte alors une augmentation des concentrations et de la biodisponibilité des catécholamines. Il en va de même pour les inhibiteurs de la COMT qui sont responsables d'une augmentation des taux de catécholamines aux dépens de leurs dérivés méthoxylés. Certaines drogues et médicaments sont responsables d'une inhibition de la recapture des catécholamines au niveau de l'espace synaptique. Parmi ces derniers, nous notons les inhibiteurs de recapture de la sérotonine et de la noradrénaline, comme la venlafaxine (47) et les antidépresseurs tricycliques. La prise de catécholamines exogènes, comme l'adrénaline et la noradrénaline, sont également responsables de pseudo-phéochromocytomes médicamenteux et faussent évidemment nos résultats biologiques.

La lévodopa (L-DOPA) utilisée dans le traitement de la maladie de Parkinson, bien qu'elle ne soit dans ce cas pas responsable d'un tableau de pseudo-phéochromocytome clinique, peut également interférer sur nos dosages en raison de son analogie avec la dopamine (48). Nous pouvons supposer qu'il en soit de même pour les inhibiteurs de DOPA-décarboxylase que sont le bensérazide ou la carbidopa, bien souvent administrés conjointement à la L-DOPA, puisqu'ils empêchent sa dégradation périphérique.

Enfin, les bloqueurs des récepteurs α -adrénergiques et les bloqueurs des récepteurs β -adrénergiques (figure 16) diminuent les effets des catécholamines sur les organes cibles. Ces derniers sont utilisés en cas de besoin dans le but de traiter un pseudo-phéochromocytome médicamenteux.

Ces interférences pharmacodynamiques sont bien connues et il apparaît difficile de s'en affranchir puisque leur mécanisme d'interférences intervient *in vivo*. Il convient donc de tenir

compte de leur présence éventuelle dans les traitements du patient afin d'interpréter correctement les résultats obtenus lors du dosage des catécholamines et des dérivés méthoxylés urinaires.

Classe pharmacologique	Molécules
Sympathomimétiques indirects	Cocaïne Amphétamines, anorexigènes β -agonistes (terbutaline, salmétérol, salbutamol, éphédrine, pseudoéphédrine)
Sympathomimétiques directs	Ecstasy Vasoconstricteurs : phényléthanolamine, phénylpropylamine, phényléphrine, éphédrine, pseudoéphédrine, midodrine
Inhibiteurs du catabolisme des catécholamines	Inhibiteurs de la monoamine-oxydase (IMAO) : - non sélectifs : iproniazide - IMAOs-A : toloxatone, moclobémide - IMAOs-B : sélégiline Inhibiteurs de la catéchol-O-méthyl transférase (ICOMT) : entacapone
Inhibiteurs de la recapture des catécholamines	Antidépresseurs tricycliques Inhibiteurs du transporteur de la noradrénaline : venlafaxine Amphétamines, anorexigènes
Catécholamines exogènes	Adrénaline, noradrénaline L-DOPA

Tableau 33 : Principales classes pharmacologiques impliquées dans la physiopathologie des pseudo-phéochromocytomes médicamenteux. D'après (44).

Dans les cas où les concentrations en catécholamines et dérivés méthoxylés urinaires sont faussées du fait de la prise de certains médicaments dont l'arrêt même provisoire serait délétère pour le patient, il faut envisager le dosage de la chromogranine A. En effet, un taux normal de chromogranine A permet d'éliminer le diagnostic puisque sa concentration ne sera pas augmentée dans ces cas-là. Attention cependant à rester vigilant quant aux contextes d'hypergastrinémie, par exemple par prise d'inhibiteurs de la pompe à protons, ou d'insuffisance rénale qui sont à l'origine d'une augmentation du taux de chromogranine A (49). Le test de suppression par la clonidine est un autre outil qui peut s'avérer utile en cas de valeurs supérieures aux valeurs de référence mais inférieures à quatre fois la limite supérieure de l'intervalle de référence (4N). La clonidine est un agoniste des récepteurs α_2 -adrénergiques et inhibe le relargage neuronal de norépinéphrine chez les patients faux positifs, c'est-à-dire qui n'ont pas de phéochromocytome ou paragangliome. En revanche, la clonidine ne permet pas de freiner cette sécrétion chez les patients porteurs d'une tumeur sécrétante.

2) Interférences analytiques

Avant le développement de la spectrométrie de masse, la méthode la plus utilisée en pratique courante pour le dosage des catécholamines et méthanéphrines urinaires était la chromatographie liquide haute performance avec détection électrochimique (HPLC-ECD). Cette méthode avait l'inconvénient de présenter d'assez nombreuses interférences analytiques. Dans la littérature, les exemples sont nombreux et sont le fait d'une analogie de structure avec les molécules à doser. En effet, des médicaments d'usage courant, comme le paracétamol (50), pouvaient interférer avec le dosage et donner des résultats moyennement voire franchement élevés pour ces molécules. Un article rapporte une élévation isolée de la normétanéphrine urinaire chez une patiente traitée par sulfasalazine, médicament utilisé pour le traitement de la polyarthrite rhumatoïde (51). Ceci était expliqué par le fait que la sulfasalazine, constituée en partie par une molécule d'acide 5-amino-salicylique (5-ASA ou mésalazine), était métabolisée par la flore intestinale et que ce métabolite présent dans les urines interférait avec la normétanéphrine lors du dosage par HPLC-ECD. Une autre publication fait état d'une interférence de la rifampicine avec la norépinéphrine, en raison de son temps de rétention similaire à cette dernière, conduisant à une fausse élévation du taux de norépinéphrine (52). Il a pu être démontré qu'il s'agissait bien de faux positifs quand les valeurs de norépinéphrine se sont normalisées en préparant les échantillons avec une méthode utilisant de l'aluminium, ou en les analysant par LC-MS/MS. L'amoxicilline, un autre antibiotique, était également responsable d'interférence analytique avec la normétanéphrine (53). D'autres molécules ont montré de potentielles interférences analytiques. C'est le cas de certains β -bloquants comme le labétalol (54), utilisé chez la femme enceinte, ou le sotalol (55). D'autres antihypertenseurs tels que l'acébutolol (56), l'urapidil (57) ou le triamtérène (58), un diurétique, ont aussi été documentés comme des substances interférentes potentielles. L' α -métyldopa, la buspirone et la mésalamine ont aussi démontré de telles interférences, ainsi que les sympathomimétiques directs (37). Le tableau 34 récapitule les différentes molécules capables d'interférer en HPLC-ECD.

<p style="text-align: center;"> <i>Paracétamol</i> <i>Labétalol</i> <i>Sotalol</i> <i>Acébutolol</i> <i>Triamtérène</i> <i>Urapidil</i> <i>Buspirone</i> <i>Sulfasalazine</i> <i>Mésalamine</i> <i>Amoxicilline</i> <i>Rifampicine</i> </p> <p style="text-align: center;"> <i>Sympathomimétiques directs (phényléphrine, dobutamine, isoprénaline, salbutamol, terbutaline, éphédrine, phénylpropylamine)</i> </p>

Tableau 34 : Principaux médicaments responsables d'interférences analytiques par fausse élévation des catécholamines et dérivés méthoxylés urinaires par technique de dosage par HPLC-ECD.

La revue de la littérature montre que ces interférences analytiques ne sont pas présentes avec la LC-MS/MS, celle-ci permettant d'éviter les interférences purement chromatographiques par analogie de structure. Il n'est alors plus nécessaire d'interrompre l'administration de médicaments, tel que le paracétamol (59). Clark *et al.* (60) ont testé un grand nombre de composés potentiellement interférents et les biais retrouvés entre les concentrations basales pour la métanéphrine et la normétanéphrine et les concentrations en présence des composés additionnels étaient tous inférieurs ou égaux à 6%, indiquant qu'il n'y avait pas d'interférence avec les molécules testées.

Bien que ces interférences soient donc moins problématiques lors de l'utilisation de la spectrométrie de masse, il faut rester vigilant car les interférences analytiques peuvent apparaître sous diverses autres formes. Cela concerne : 1. La suppression ou amplification ionique (*ion suppression or enhancement*) ; 2. Les réactions croisées entre ions (*ionic cross talk*) ; 3. La fragmentation intra-source (*in source fragmentation*) ; et 4. Les interférences isobariques (*isobaric interferences*) (61).

a) Suppression ou amplification ionique

La suppression ou amplification du signal ionique est due aux effets matrices, c'est-à-dire à l'impact global que peuvent avoir les constituants du liquide une fois évaporés, provenant donc à la fois des solvants et de l'échantillon, sur l'isolement et l'ionisation des analytes. On parle de suppression ionique quand l'ionisation observée chez un analyte dans une matrice

complexe est significativement diminuée par rapport à celle du même analyte dans un solvant pur. L'amplification ionique, à l'inverse, décrit l'augmentation de l'ionisation de l'analyte dans une matrice complexe par rapport à des matrices dites pures, neutres ou inertes. Il est bon de savoir que les solvants généralement utilisés en HPLC, tels que le méthanol, l'acétonitrile et l'eau, peuvent aussi interagir avec les analytes durant leur ionisation, en raison de leurs propres propriétés chimiques et des impuretés éventuellement présentes. A ce titre, il n'existe pas d'analyse utilisant la LC-MS/MS qui soit totalement dépourvue d'effets matrice. Les facteurs responsables de ces effets sont les sels et les petites molécules hydrophiles (composants de la phase mobile), capables de fournir des ions, ainsi que les tensio-actifs, composés qui affectent la formation des gouttelettes. De même les constituants de l'échantillon qui éluent tardivement, comme les phospholipides, peuvent être responsables de suppression ionique. Le choix du standard interne est également important. Il sert de référence durant les phases de l'analyse, permettant notamment de corriger de façon relative un écart à la linéarité. Ajouté en quantité connue et unique dans tous les échantillons, il faut qu'il puisse co-éluer avec l'analyte d'intérêt, et donc posséder des propriétés physico-chimiques très similaires tout en faisant en sorte que nous puissions bien les différencier, d'où généralement l'échange d'atomes d'hydrogène ^1H contre des atomes de deutérium ^2H dans l'élaboration des standards internes. Idéalement, il faudrait qu'au minimum trois atomes soient interchangeables. Enfin, ces effets matrice peuvent tout à fait être spécifiques d'un échantillon de patient donné (en cas de médication particulière ou du fait d'autres xénobiotiques). Dans ce cas, l'aire sous la courbe du standard interne prend toute son importance puisque c'est ainsi que nous pourrions détecter un effet sur l'ionisation (diminution ou augmentation). Comme il n'existe pas de moyen de savoir si cet effet a un rôle sur l'ionisation du composé d'intérêt – et dans ce cas, si le composé et le standard interne sont affectés de la même façon -, cela nous amène généralement à rendre la quantification ininterprétable. Nous pourrions éventuellement essayer de passer outre en diluant l'échantillon, mais il faudrait déjà que la concentration initiale de l'analyte soit suffisamment élevée.

Dans le cas précis du dosage des catécholamines et de leurs dérivés méthoxylés urinaires, certains médicaments ont été rapportés comme responsables de tels effets matrice en diminuant le signal ionique de l'analyte et/ou du standard interne. C'est le cas de la cimétidine, l'éphédrine, la pseudo-éphédrine et le labétalol pour lesquels nous pouvons observer une diminution des aires sous la courbe de l'ordre de 40 à 50% (36). C'est également le cas pour des drogues comme l'ecstasy, les métamphétamines. L'annexe 40 issu de l'article cité précédemment (36) montre qu'une large gamme de composés a été testée pour ces interférences analytiques, et que seules les molécules présentées ci-dessus ont démontré des effets potentiels (les composés inscrits *Not found* dans les colonnes *Full scan* et *MRM* n'étant

tout simplement pas détectés ; pour les autres, les temps de rétention t_R et les m/z des ions fils observés ont été retranscrits et comparés à ceux de la méthanéprine et de la norméthanéprine en gras, l'interférence d'ordre quantitatif (*quant*) ou qualitatif (*qual*) est mentionnée entre parenthèses). Il faut donc rester vigilant dans l'interprétation de nos résultats lorsque nous savons que le patient a ingéré ou a possiblement ingéré une de ces drogues ou médications, d'autant que nous utilisons les mêmes transitions quantitatives pour la méthanéprine-D3 (standard interne de la méthanéprine, comportant trois atomes de deutérium ^2H), la norméthanéprine et la norméthanéprine-D3 que celles indiquées dans l'article. Dans ce cas, il faut valider notre dosage sur la transition qualitative (T2). Nous utilisons une transition quantitative différente pour la méthanéprine (m/z 180 \rightarrow 165). Pour la norméthanéprine, notre transition qualitative (m/z 166 \rightarrow 106) diffère aussi de celle mentionnée dans cette publication.

Afin de minimiser les effets matrice, Vogeser *et al.* (61) proposent la stratégie suivante :

Il faut tenir compte et détecter les effets matrice dans le développement de méthode. C'est ce que nous avons fait dans le test *Effets matrice* (page 55).

Il faut apporter un soin tout particulier à la préparation de l'échantillon et à la séparation chromatographique mises en place.

Il ne sera pas toujours possible d'éviter ces effets matrice sur l'ionisation des analytes, c'est pourquoi il faut privilégier les standards internes les plus appropriés et faire le choix de conserver au moins une transition supplémentaire (T2), qui pourra nous aider dans le cas où des problèmes sont observés sur la transition principale (T1).

Enfin – mais ceci est moins de notre ressort -, les développeurs de spectromètres de masse en tandem devraient pencher leurs efforts sur la réduction de ces effets pour les nouveaux appareils. Les modes orthogonaux de sélection d'ion ne séparent les ions interférents des ions de l'analyte seulement avant leur détection, et donc après la formation des ions, ce qui ne peut pas prévenir l'apparition d'effets matrice sur l'ionisation des composés.

b) Réactions croisées entre ions

Ces réactions croisées peuvent survenir quand plusieurs transitions de masse aboutissant au même ion fils sont acquises. Si la cellule de collision n'est pas parfaitement vidée durant le très court délai qui sépare l'acquisition de deux transitions, des signaux non souhaités seront enregistrés sur le chromatogramme de la transition suivante. C'est un phénomène dont nous devons nous méfier, en particulier quand plusieurs métabolites différents d'une même

molécule produisent les mêmes ions fils (61). Nous avons testé ce type d'interférences dans le chapitre *Contaminations* (page 54).

c) Fragmentation intra-source

Dans le cas où des liaisons insuffisamment résistantes au processus d'ionisation sont présentes au sein des molécules, celles-ci peuvent être dégradées avant même d'entrer dans le spectromètre de masse. C'est plus souvent le cas et c'est particulièrement gênant si des métabolites conjugués (conjugués glucuronide, conjugués sulfate...) sont présents dans l'échantillon du patient, pouvant alors générer, par fragmentation, l'analyte d'intérêt *in vitro*. Des erreurs analytiques apparaissent également quand l'analyte d'intérêt co-élue avec son métabolite conjugué, les deux donnant les mêmes ions fils après fragmentation. Il n'est pas possible de faire la distinction entre les deux une fois que les ions ont été générés. Ce risque d'erreur est majoré quand la sélectivité du système chromatographique n'est pas suffisante et ne permet pas de bien séparer l'analyte d'intérêt de ses métabolites avant la fragmentation. Cette interférence peut être détectée durant le développement de méthode par réalisation de *runs* chromatographiques plus longs. Des pics additionnels peuvent apparaître sur le chromatogramme à la transition choisie. Si ces pics sont observés, il faut améliorer le traitement des échantillons et la séparation chromatographique de façon à ce que l'analyte d'intérêt et les molécules interférentes soient bien séparés (61).

Voici des exemples d'interférences par réactions croisées entre ions ou fragmentation intra-source :

Le phénomène de réactions croisées entre ions a été décrit pour des méthodes dans lesquelles la chromatographie ne permettait pas de s'affranchir de métabolites O-méthylés et où la fragmentation résultait en la formation d'ions mimant la 3-méthoxytyramine, ce qui menait à une surestimation des concentrations de celle-ci. Concernant la 3-méthoxytyramine, un problème plus important résultait de la co-élution de cet analyte avec la 3-O-méthylidopa, un des plus importants métabolites de la L-DOPA, présente dans le plasma à des concentrations plus de trois fois supérieures à la 3-méthoxytyramine elle-même, entraînant alors aussi sa surestimation. Ce problème ne peut être évité qu'en optimisant la séparation chromatographique. D'autres interférences ont été décrites, concernant la normétanéphrine et la 4-hydroxy-3-méthoxymétamphétamine, métabolite de la 3,4-méthylènedioxymétamphétamine (MDMA), drogue récréative. L'isoprénaline et l'isoétharine,

agonistes des récepteurs β -adrénergiques, sont d'autres substances capables d'interférer avec la normétanéphrine et la métanéphrine.

d) Interférences isobariques

Pour finir, les molécules isobariques sont soit des isomères de la même molécule, soit des molécules complètement différentes mais qui partagent la même masse moléculaire. Pour des analyses en masse simple (LC-MS, GC-MS...), ce phénomène est bien connu. En LC-MS/MS en revanche, la probabilité qu'un analyte ou son standard interne partage la même masse pour l'ion père et pour l'ion fils est bien plus faible. Cependant, puisque la spectrométrie de masse est basée sur un ratio masse sur charge (m/z), des interférences isobariques peuvent avoir lieu si une molécule possède plusieurs groupements ionisables pouvant gagner des protons H^+ (exemple : amines), divisant par le nombre de ceux-ci le m/z , qui peut, en conclusion, revenir identique à un autre rapport pour une molécule totalement différente (61). Pour éviter ces interférences potentielles, l'acquisition de différentes transitions de masse pour le composé d'intérêt et son standard interne peut s'avérer utile. Ces transitions donneront lieu à des ions dits quantitatifs et d'autres ions dits qualitatifs. L'utilisation de ces deux transitions est recommandée par les sociétés savantes, comme la Commission européenne avec la publication du document guide SANTE/11813/2017 (62). Pour la même transition, différentes conditions de fragmentation (énergies de collision) peuvent aussi servir à éviter ce problème (63).

e) Problématique de l'épinéphrine

Pour un de nos composés, l'épinéphrine, nous avons deux pics bien séparés sur le chromatogramme et le pic interférent ne nous a pas posé de problème pendant toute la durée de la validation de méthode. Cependant, au fur et à mesure, nous avons remarqué un rapprochement puis un chevauchement des deux pics (figure 17), ce qui fait que, depuis, la quantification de l'épinéphrine n'est plus possible. L'épinéphrine pourrait être soumise à une fragmentation intra-source. Des interférences isobariques peuvent aussi théoriquement avoir lieu entre l'épinéphrine et la normétanéphrine qui partagent la même masse moléculaire (183 g/mol) (64). Et, en effet, de nombreux indices nous portent à croire que le pic interférent sur le chromatogramme de l'épinéphrine serait bien de la normétanéphrine. Tout d'abord, leurs temps de rétention sont sensiblement les mêmes. Puis, si nous nous intéressons aux rapports m/z de ces deux composés, nous nous rendons compte que la différence entre les ions parents de l'épinéphrine (m/z 184) et de la normétanéphrine (m/z 166) correspond à une perte d'eau

H₂O (m/z 18) (il est de principe d'éviter le plus possible les transitions avec perte d'eau dans la mise au point de méthode, moins spécifiques et découlant d'énergies faibles, ne faisant gagner que très peu d'informations supplémentaires sur la structure du composé (65)). Or, deux des trois transitions retenues pour l'épinéphrine sont m/z 184 \rightarrow 166. Le problème est que nous n'avons pas pu faire autrement dans le choix de ces transitions, puisque nous devons également tenir compte du rapport signal-sur-bruit. Ainsi, épinéphrine et normétanéphrine ont les mêmes m/z pour certains ions fils, voire petits fils. Comme il n'y avait pas de souci lors de la validation de méthode, nous avons suspecté, dans un premier temps, un vieillissement prématuré de la colonne. C'est pourquoi nous l'avons changée, nous en avons testé d'autres, mais le résultat reste le même.

Au final, nous avons actuellement un problème d'interférence sur l'épinéphrine et améliorer la séparation chromatographique serait le seul moyen de s'en débarrasser. La piste majeure qui se présente à nous serait de passer, pour la phase mobile, d'une méthode en mode isocratique vers une méthode en mode gradient, ce qui permettrait aussi de moins encrasser la colonne. Les autres facteurs sur lesquels nous pouvons jouer sont le choix de la colonne et la composition de la phase mobile. Tout ceci nécessitera, en revanche, que nous refassions complètement la validation de méthode.

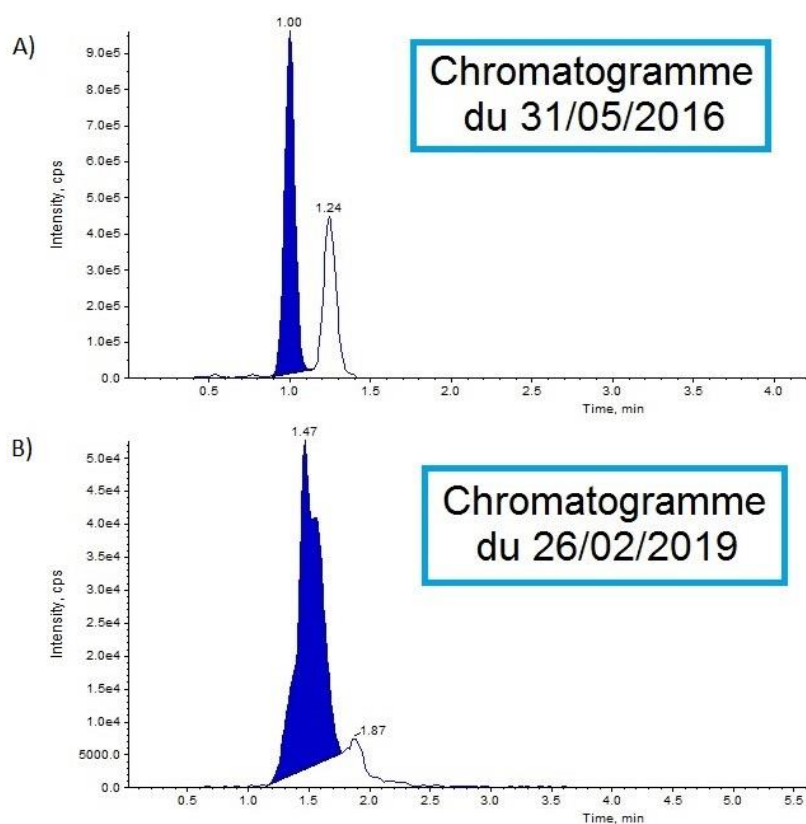


Figure 17 : Chromatogrammes de l'épinéphrine (point de gamme n°6). A) Lors de la validation de méthode (05/2016). B) Récemment (02/2019).

Au final, le tableau 35 récapitule les différentes molécules pouvant être à l'origine d'interférences analytiques, ainsi que les solutions proposées pour y remédier.

	Interférences analytiques		
	Suppression/amplification ionique	Réactions croisées entre ions/Fragmentation intra-source	Interférences isobariques
Substances interférentes potentielles	<i>Cimétidine Ephédrine Pseudoéphédrine Labétalol Ecstasy Métamphétamines</i>	<i>O-méthyl dopa Isoprénaline Isoétharine MDMA</i>	<i>Epinéphrine Normétanéphrine</i>
Solutions proposées	<i>Préparation de l'échantillon et système chromatographique optimisés Standard interne approprié Développement novateur des appareils de spectrométrie de masse</i>	<i>Système chromatographique optimisé</i>	<i>Acquisition de différentes transitions pour le composé d'intérêt et son standard interne Conditions de fragmentation</i>

Tableau 35 : Drogues et médicaments pouvant être responsables d'interférences analytiques dans le dosage des catécholamines et des dérivés méthoxylés urinaires.

Les contextes les plus à risque d'interférences sont donc la fragmentation intra-source de métabolites conjugués, les composés de la matrice qui partagent la même transition de masse que l'analyte d'intérêt, et l'impact des effets matrice sur l'analyte et son standard interne. Toutes ces interférences analytiques sont théoriquement évitables par l'optimisation de la résolution du système chromatographique, l'utilisation de différentes transitions dites quantitatives ou qualitatives pour un même composé et la fragmentation multiple où l'ion fils obtenu à partir de l'ion père dans la cellule de collision produit à son tour un ion fils de deuxième génération. Il faudra alors bien prendre en compte tous ces paramètres lors de la mise au point des dosages, et l'apparition d'interférences analytiques pourra être évitée.

En résumé, la LC-MS/MS présente l'avantage de s'affranchir des interférences analytiques connues jusqu'à présent en technique HPLC-ECD. Les interférences analytiques peuvent apparaître sous des formes différentes mais si la méthode est correctement développée, les molécules connues pour interférer ne devraient pas poser de réels problèmes. Cependant, elle n'empêche pas les interférences pharmacodynamiques, sur lesquelles il faut donc rester prudent lors de l'interprétation des résultats obtenus.

3 – Interférences alimentaires

De nombreux aliments, comme les fruits et les fruits à coque, contenant des quantités considérables d'amines biogènes, sont susceptibles d'entraîner des faux positifs par notre technique de dosage. Leur consommation peut aboutir, dans l'organisme, non seulement à une élévation des catécholamines en elles-mêmes, mais aussi à leurs formes sulfatées, voire méthoxylées, bien que dans une moindre mesure pour ces dernières (66) (67). C'est pour éviter cela qu'un régime alimentaire doit être mis en place avant le recueil urinaire, en excluant de l'alimentation du patient certains aliments et en limitant la consommation de thé et de café dans les trois jours précédant le recueil.

1) Objectif

Les recommandations générales envers l'alimentation précédant le recueil urinaire ont déjà été décrites en annexe 2 et ce sont avec celles-ci qu'il nous a été permis d'établir nos intervalles de référence chez des sujets sains, comme vu dans le chapitre *Intervalles de référence* (page 61). En pratique, nous avons donc décidé de tester les interférences alimentaires afin de savoir si respecter un régime alimentaire restrictif est vraiment indispensable pour l'interprétation des résultats biologiques.

L'objectif de l'étude est de déterminer dans quelle mesure des aliments riches en catécholamines et consommés avant le recueil urinaire peuvent interférer avec notre technique de dosage. Les valeurs fortes, pouvant faire suspecter un phéochromocytome, seront donc intéressantes à analyser.

2) Choix des aliments à considérer

Selon les données de la littérature, les aliments responsables de faux positifs sont : les bananes, les tomates, les avocats, les fromages à pâte cuite (gruyère...), le chocolat, les ananas, les kiwis, les prunes, les agrumes (oranges...), la vanille, le thé, le café, les haricots, les produits fermentés, le melon, les pommes, les fraises, les mollusques (66) (67) (68) (69) (70).

Certains aliments, comme les prunes, qui contiennent principalement des flavonols – la rutine ou quercétine 3-O-rutinoside étant celui d'intérêt -, absorbés au niveau du côlon, puis métabolisés au niveau du foie en acide homovanillique (HVA) avant d'être excrétés dans les urines sous la forme d'acide 3-hydroxyphénylacétique (68), nous intéressent un peu moins quant au dosage des catécholamines et des dérivés méthoxylés. C'est pourquoi nous avons

jugé non indispensable de tester l'influence d'une consommation de prunes sur les dosages. C'est aussi le cas pour les pommes, les asperges et les fruits rouges.

Par ailleurs, d'autres aliments, qui contiennent bien des catécholamines dans leur composition, ne seront également pas testés. En effet, ceux-ci n'en contiennent qu'en faibles quantités ou bien sont des aliments qui ne sont pas consommés en proportions considérables. Il s'agit des haricots, des produits fermentés, des melons, des pommes, des fraises, des mollusques, etc...

Au total, les aliments testés seront donc les suivants : les agrumes, les kiwis, la vanille, les bananes, les fromages à pâte cuite (gruyère), les tomates, les avocats, les fruits à coque (noix), le chocolat, le café et le thé.

3) Interférences alimentaires : consommation d'un aliment isolé

a) Matériel et méthode

I – Détermination des proportions d'aliments à ingérer

Chez nos volontaires sains, nous avons mis en place un régime alimentaire qui consistait en l'ingestion d'un aliment en quantité possiblement interférente, tout en évitant la consommation des autres aliments connus également pour entraîner des interférences. Ces quantités ont été décidées selon la teneur en catécholamines présente dans ces aliments, comme nous pouvons le voir dans les tableaux 36 et 37.

Aliment	Dopamine (µg/g)	Norépinéphrine (µg/g)	Epinéphrine (µg/g)	Flavonol (mg/g ou mL)	Tyramine (µg/g)	Masse / Volume
Bananes	2,94	1,61	0,07			150 g
Chocolat				0,25		200 g
Fruits secs (noix)	0,03	0,004	0,005			20 g
Agrumes (oranges)	0,004	0,006	0,078			200 g
Avocats	0,012	0,001	0,011			200 g
Tomates	0,078	0,015	0,004			70-200 g
Prunes				0,07		30 g
Kiwis	0,007	/	0,016			100 g
Ananas	0,022	/	0,018			1800 g
Fromages *					0-1200	150 g
Thé (vert-noir)				0,05-0,09		20 mL

* Fromages à pâte cuite :

Cheddar → 72 – 953 µg de tyramine / g

Gruyère → 11 – 1184 µg de tyramine / g

Gouda → 0 – 20 µg de tyramine / g

Tableau 36 : Taux en composés aminés dans les aliments interférents par gramme de nourriture.

Aliment	Dopamine (µg)	Norépinéphrine (µg)	Epinéphrine (µg)	Flavonol (mg)	Tyramine (g)
Bananes	441	241,5	10,5		
Chocolat				50	
Fruits secs (noix)	0,6	0,08	0,1		
Agrumes (oranges)	0,8	1,2	15,6		
Avocats	2,4	0,2	2,2		
Tomates	5,46-15,6	1,05-3	0,28-0,8		
Prunes				2,1	
Kiwis	0,7	/	1,6		
Ananas	39,6	/	32,4		
Fromages					0-180
Thé				1-1,8	

Tableau 37 : Taux en composés aminés pour une unité en aliment interférent.

Ainsi, en connaissant les limites de positivité pour chacun de nos composés (tableau 38), nous avons pu estimer les quantités minimales d'aliment à ingérer par jour.

Composé	Valeur limite de positivité (µg/L)
Dopamine	299
Norépinéphrine	206
Épinéphrine	95
3-Méthoxytyramine	350
Normétanéphrine	777
Métanéphrine	396

Tableau 38 : Seuil limite de positivité dans les urines pour chacune des catécholamines et leurs dérivés méthoxylés.

Aliment	Quantité
Bananes	environ 3/ jour
Chocolat	environ 2 tablettes / jour + aliments en contenant
Fruits secs (noix)	environ 20 / jour
Agrumes (oranges)	3 / jour + 1L de jus d'orange
Avocats	environ 5 / jour
Tomates	environ 3-4 / jour
Kiwis	environ 5-6 / jour
Ananas	1 / jour + 1L de jus d'ananas
Fromage (gruyère)	150-200 g de gruyère / jour
Vanille	<i>non défini</i>
Thé	environ 5 / jour
Café	environ 5 / jour

Tableau 39 : Quantités minimales d'aliment à ingérer pour observer une interférence.

II – Recrutement

Douze volontaires sains ont participé à l'étude. Il a été attribué à chacun d'entre eux un aliment à consommer en quantités minimales comme définies dans le tableau 39. Il leur a aussi été remis une fiche de recueil et d'information et une fiche d'entrée à l'étude détaillant la marche à suivre et les informations nécessaires, pour que l'objet de l'étude soit bien compris par les participants (annexe 41).

Selon le protocole mis en place et adapté plus particulièrement de l'étude de Combet *et al.* (68), chaque volontaire a fait l'objet de deux recueils urinaires des 24 heures. Le premier coïncidait avec une éviction totale de tous les aliments décrits plus haut. Le second correspondait au régime mis en place pour l'aliment désiré, comme décrit dans le tableau 39. Les recueils ont été réalisés dans des flacons dédiés pour urines de 24 heures.

III – Conservation des échantillons urinaires

Après recueil, les urines ont été aliquotées en cinq aliquotes de deux millilitres puis conservées à -80°C jusqu'à leur analyse. Chaque échantillon urinaire fera ensuite l'objet d'un dosage selon la méthode décrite en annexe 1.

b) Résultats

Le tableau 40 présente les résultats en nmol/24h. Les résultats en concentrations sont à titre indicatif disponibles en annexe 42. Café et thé ont été testés plus tard, d'où l'absence de valeurs pour l'épinéphrine.

nmol/24h ; CV en %	Agrumes	Kiwis	Vanille	Bananes	Ananas	Gruyère	Tomates	Avocats	Noix	Chocolat	Café	Thé	
Dopamine	Qav	1580	2080	2397	1637	1252	3611	1575	1355	783	1508	1287	1684
	Qap	1681	2225	2330	3648	1105	3408	1339	1523	1515	1616	1206	1645
	CV	4,4	4,8	2,0	53,8	8,8	4,1	11,5	8,2	45,0	4,9	4,6	1,7
Norépinéphrine	Qav	222	149	220	117	87	282	422	215	124	268	277	130
	Qap	238	228	256	265	94	513	468	265	204	236	267	176
	CV	4,8	29,6	10,6	54,8	5,6	41,2	7,3	14,8	34,6	9,0	2,5	21,3
Epinéphrine	Qav	34	NA	NA	NA	NA	98	NA	NA	34	31		
	Qap	60	NA	NA	26	31	NA	28	NA	49	NA		
	CV	38,7	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	25,2	NA		
3-Méthoxytyramine	Qav	225	349	251	266	178	352	269	188	110	233	190	214
	Qap	242	376	301	711	178	525	185	221	247	229	152	232
	CV	5,3	5,3	12,8	64,5	0,0	27,9	26,1	11,3	54,3	1,3	15,6	5,8
Normétanéphrine	Qav	123	133	162	89	83	186	218	164	90	206	199	106
	Qap	121	172	176	152	90	281	214	191	169	204	211	142
	CV	1,3	18,3	5,7	36,9	6,4	28,8	1,5	10,9	42,7	0,5	4,2	20,9
Méтанéphrine	Qav	179	175	70	67	131	324	91	142	87	165	152	172
	Qap	197	222	78	191	131	354	88	160	168	132	185	193
	CV	6,8	16,7	7,6	67,9	0,4	6,3	2,4	8,4	44,9	15,3	13,7	7,9

Tableau 40 : Quantité en catécholamines et dérivés méthoxylés avant (Qav) et après (Qap) régime riche en l'aliment considéré.





Il existe bien des variations après consommation d'un aliment riche en catécholamines (exemple : CV à 67,9% pour la métanéphrine, à 36,9% pour la normétanéphrine après consommation de bananes).

Les chromatogrammes obtenus, pour chaque aliment, avant et après ingestion (annexes 43 à 54) montrent qu'il n'y a pas d'interférence qualitative avec les aliments ingérés. En effet, nous n'observons pas de pic additionnel. Lorsqu'il y a interférence, elle est d'ordre quantitatif, du fait de l'apport exogène en catécholamines contenues dans ces aliments.

Afin de déterminer si la prise alimentaire modifie l'interprétation biologique, nous présentons les résultats obtenus en fonction des valeurs de référence du laboratoire (tableau 41). L'intervalle que nous qualifions d'acceptable correspond à l'intervalle compris entre une et quatre fois la limite haute de l'intervalle de référence. En effet, il est décrit que des valeurs supérieures à 4N ont une très forte valeur prédictive positive, proche de 100% (37) (38) dans le diagnostic du phéochromocytome. En revanche, pour une valeur comprise entre 2N et 4N, où la valeur prédictive positive n'est que de 30%, il faut considérer la présence d'éventuels interférents, et envisager de refaire le recueil urinaire dans le but d'écarter un doute existant. L'objectif ici est donc de voir si les aliments, qui sont connus comme interférents, sont capables d'interférer jusqu'à dépasser plus de quatre fois les valeurs de référence, ce qui pourrait nous conduire à conclure à un phéochromocytome alors qu'il n'en est rien.

A titre indicatif, une étude similaire a été réalisée pour le dosage des HVA et VMA urinaires (technique LC-MS/MS également), composés pouvant être augmentés au côté de la dopamine en cas de neuroblastome. Les résultats de cette autre étude sont disponibles en annexe 55.

Pour que les choses apparaissent de façon plus claire, nous utiliserons les codes couleurs suivants pour les tableaux 41 et 42 :

	: valeur comprise dans l'intervalle de référence
	: valeur comprise entre la limite supérieure de l'intervalle de référence et 2N
	: valeur comprise entre 2N et 4N
	: valeur supérieure à 4N

nmol/24h		Agrumes	Kiwis	Vanille	Bananes	Ananas	Gruyère	Tomates	Avocats	Noix	Chocolat	Café	Thé
Dopamine	Qap	1681	2225	2330	3647	1105	3408	1339	1523	1515	1616	1206	1645
	VN	[609 ; 3006]											
	2N-4N]6012 ; 12024]											
	> 4N]12024 ; +∞[
	Acc ?	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Norépinéphrine	Qap	238	228	256	265	94	513	468	265	204	236	267	176
	VN	[90 ; 673]											
	2N-4N]1346 ; 2692]											
	> 4N]2692 ; +∞[
	Acc ?	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Epinéphrine	Qap	60	NA	NA	26	31	NA	28	NA	49	NA		
	VN	[65 ; 260]											
	2N-4N]520 ; 1040]											
	> 4N]1040 ; +∞[
	Acc ?	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		
3-méthoxytyramine	Qap	242	376	301	711	178	525	185	221	247	229	152	232
	VN	[73 ; 439]											
	2N-4N]878 ; 1756]											
	> 4N]1756 ; +∞[
	Acc ?	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Normétanéphrine	Qap	121	172	176	152	90	281	214	191	169	204	211	142
	VN]55 ; 304]											
	2N-4N]608 ; 1216]											
	> 4N]1216 ; +∞[
	Acc ?	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Métanéphrine	Qap	197	222	78	191	131	354	88	160	168	132	185	193
	VN	[32 ; 314]											
	2N-4N]628 ; 1256]											
	> 4N]1256 ; +∞[
	Acc ?	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Tableau 41 : Quantité en catécholamines et dérivés méthoxylés urinaires après régime riche en l'aliment considéré.

Estimation de l'acceptabilité (Acc ?) de l'interférence rencontrée (O = interférence acceptable, N = interférence non acceptable) par rapport aux valeurs de référence (VN) et à des intervalles compris entre 2N et 4N (2N-4N) ou supérieurs à 4N (> 4N).

Les valeurs restent toujours inférieures à 2N (dopamine : 1,2N et 3-méthoxytyramine : 1,6N après consommation de bananes / dopamine : 1,1N 3-méthoxytyramine : 1,2N et métanéphrine : 1,1N après consommation de gruyère), donc en deçà du seuil à partir duquel un phéochromocytome peut être suspecté (annexe 56) (46).

4) Interférences alimentaires : régime varié et riche en aliments contenant des catécholamines

Après avoir étudié les interférences analytiques obtenues avec chaque aliment séparément, nous avons jugé utile de déterminer si les résultats obtenus restent dans l'intervalle acceptable dans le cadre d'un régime alimentaire varié composé d'aliments riches en catécholamines.

a) Matériel et méthode

I – Recrutement

Nous avons recruté dix volontaires sains auxquels nous avons distribué des *Fiches de recueil et d'information* (annexe 57) les informant de l'objectif de l'étude et de la marche à suivre avant, pendant et après le recueil. Ces fiches indiquaient les aliments à consommer en nombre d'unités et par jour. Nous avons voulu coller le plus possible à ce qui pourrait être consommé de manière « normale » par un individu. Nous conseillions aux participants de l'étude de ne pas changer leurs habitudes alimentaires (si certaines personnes avaient des habitudes alimentaires particulières comme manger beaucoup de chocolat ou boire de nombreux thés ou cafés chaque jour, celles-ci étaient conservées) mais d'y introduire les aliments d'intérêt en proportions indiquées pendant trois jours – le troisième jour étant le jour du recueil -, le but étant d'observer les effets d'une alimentation habituelle sur le dosage des catécholamines et de leurs dérivés méthoxylés.

Il ne s'agissait pas ici de voir les différences par rapport aux concentrations de base chez ces participants (c'est pourquoi nous ne leur avons demandé qu'un simple recueil des urines de 24 heures, et non deux comme dans le test précédent), mais bien de savoir si un régime alimentaire varié peut être source d'interférences en entraînant des fausses positivités.

II – Conservation des échantillons urinaires

Une fois le recueil réalisé, les urines de chaque participant sont aliquotées en cinq aliquotes de deux millilitres et conservées à -20°C jusqu'à leur analyse. Puis, les urines sont dosées selon le protocole en annexe 1.

b) Résultats

Pour des raisons de souci technique persistant concernant l'épinéphrine, celle-ci ne sera malheureusement pas présentée dans les résultats (tableau 42).

Les chiffres de 1 à 10 représentent les dix urines de nos dix volontaires sains.

nmol/24h		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Dopamine	Qap	1235	1994	1665	602	1890	676	1355	1614	1251	1727
	VN	[609 ; 3006]									
	2N-4N]6012 ; 12024]									
	> 4N]12024 ; +∞[
	Acc ?	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Norépinéphrine	Qap	182	241	357	144	269	72	273	301	242	281
	VN	[90 ; 673]									
	2N-4N]1346 ; 2692]									
	> 4N]2692 ; +∞[
	Acc ?	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
3-méthoxytyramine	Qap	182	176	233	95	247	111	178	202	197	297
	VN	[73 ; 439]									
	2N-4N]878 ; 1756]									
	> 4N]1756 ; +∞[
	Acc ?	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Normétanéphrine	Qap	100	126	219	88	191	59	175	173	159	193
	VN]55 ; 304]									
	2N-4N]608 ; 1216]									
	> 4N]1216 ; +∞[
	Acc ?	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Métanéphrine	Qap	148	54	225	54	207	84	141	146	140	159,
	VN	[32 ; 314]									
	2N-4N]628 ; 1256]									
	> 4N]1256 ; +∞[
	Acc ?	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Tableau 42 : Quantité en catécholamines et dérivés méthoxylés urinaires après régime varié en aliments riches en catécholamines.

Estimation de l'acceptabilité (Acc ?) de l'interférence rencontrée (O = interférence acceptable ; N = interférence non acceptable) par rapport aux valeurs de référence (VN) et à des intervalles compris entre 2N et 4N (2N-4N) ou supérieurs à 4N (> 4N).

Aucun de nos paramètres n'est impacté par ce régime riche en aliments contenant des catécholamines. En effet, pour chaque volontaire ayant participé à cette étude, nous remarquons que les valeurs obtenues ne dépassent jamais les valeurs de référence.

5) Discussion

Mis à part un article de 1976 de Weetman *et al.* (technique spectrophotométrique) (71) qui rapporte qu'il ne serait pas nécessaire de respecter un régime alimentaire particulier pendant trois jours pour doser les VMA, HVA, métanéphrines et catécholamines libres dans le cadre du diagnostic d'un neuroblastome chez l'enfant puisque sans grande influence, il n'a pas été retrouvé de publication plus récente qui remette en cause l'intérêt du régime alimentaire. C'est dans ce cadre que notre étude a vu le jour.

Il va de soi qu'il faille rester prudent quant à la conclusion que nous allons tirer de cette étude puisque certains aliments comme les prunes, les haricots, les fruits de mer ou les pommes de terre n'ont pas été testés. L'acide cinnamique, issu de la cannelle et utilisé dans l'industrie du parfum et comme exhausteur de goût et pouvant entraîner une augmentation des taux de catécholamines et dérivés méthoxylés urinaires (49) n'a pas non plus été testé.

Cependant, et malgré le fait qu'il serait intéressant de réitérer ce test sur un plus grand nombre de personnes, nos résultats indiquent déjà qu'un régime spécifique, excluant ou limitant tout aliment contenant des catécholamines en certaines quantités, avant de réaliser le recueil urinaire, ne serait pas nécessaire.

Aussi, nous pouvons donc imaginer, en premier lieu, de réaliser le recueil chez le patient sans contrainte spécifique. Si les résultats obtenus sont compris dans les valeurs de référence ou inférieurs à 2N, nous pouvons éliminer le diagnostic d'un phéochromocytome sécrétant. En revanche, si les valeurs sont plus élevées, renouveler le dosage, dans un second temps, sur de nouvelles urines recueillies après que le patient ait suivi un régime dépourvu de catécholamines, s'avérerait nécessaire pour confirmer ou infirmer le diagnostic. Etant donné la grande proportion de résultats négatifs, la démarche que nous proposons serait tout à fait justifiée et d'un intérêt pratique par rapport aux contraintes techniques et de délai de rendu de résultats qui entourent les modalités de ce recueil urinaire.

Pour des raisons évidentes de gain de temps dans la prise en charge des patients, c'est déjà ce qui est réalisé dans le service d'endocrinologie au CHU de Nantes. De manière empirique, il n'existait déjà pas de réelle influence du régime alimentaire sur l'interprétation des résultats obtenus. Mais lorsqu'un doute se faisait sentir, le service d'endocrinologie faisait réaliser un second dosage sur un second recueil, cette fois-ci en respectant les règles de restriction alimentaire, afin de lever ou de confirmer le doute initial. Nos résultats viennent alors confirmer et valider les pratiques existantes.

V – Application clinique au CHU de Nantes

Ce chapitre a pour but de compléter les données analytiques présentées dans le chapitre *Comparaison de méthodes* (page 56), en y apportant une interprétation clinique.

La comparaison des résultats que nous avons obtenus, inhérente au diagnostic et au suivi des phéochromocytomes, est présentée dans le tableau 43. Celle inhérente au diagnostic et au suivi des neuroblastomes est présentée en annexe 58.

1 – Diagnostic et suivi des phéochromocytomes : comparaison aux résultats obtenus par Biomnis

Le tableau 43 récapitule les résultats que nous avons obtenus et ceux du laboratoire Biomnis en tenant compte des valeurs de référence de chaque laboratoire. Cela nous permet, d'une part, d'appréhender comment nous nous situons par rapport à Biomnis (notre interprétation clinique est-elle identique ?), et d'autre part, de confronter ces valeurs à la clinique (cohérence avec le diagnostic de phéochromocytome, ou neuroblastome chez l'enfant).

Cela nous permet également de se rendre compte du nombre de diagnostics de phéochromocytomes/paragangliomes et neuroblastomes réalisés via les dosages urinaires.

Ce chapitre ne présente que les analyses de comparaison effectuées sur l'année 2018.

Les résultats sont présentés de la manière suivante :

Pour les dérivés méthoxylés (tableau 43), nous ne présentons que des valeurs obtenues chez des adultes pour lesquelles nous disposons d'urines des 24 heures. L'unité est donc en nmol/24h. Pour les catécholamines (annexe 58), nous ne présentons que des valeurs obtenues chez des enfants, leurs âges sont précisés. L'unité est donc en $\mu\text{mol}/\text{mole}_{\text{créatinine}}$.

Concernant les adultes, les valeurs de référence du laboratoire Biomnis proviennent de la littérature (72) jusqu'au 15/02/2018. A partir du 15/02/2018, les valeurs de référence qu'ils utilisent sont celles qu'ils ont établies, voici pourquoi nous observons un changement dans les valeurs de référence dans le tableau à partir de cette date. Nous concernant, les valeurs de référence pour les dérivés méthoxylés urinaires sont celles que nous avons établies (page 61). Pour les enfants, les valeurs de référence sont issues de la littérature (39) à la fois pour nous et pour Biomnis.

nmol /24h	3-Méthoxytyramine		Normétanéphrine		Métanéphrine		Clinique
	CHU Nantes VN : 73-439	Biomnis VN : 88-320 jusqu'à n°14 inclus puis 69-315	CHU Nantes VN : 55-304	Biomnis VN : 44-213 jusqu'à n°14 inclus puis 40-240	CHU Nantes VN : 32- 314	Biomnis VN : 40-228 jusqu'à n°14 inclus puis 29-143	
1	115	54	140	82	386	228	phéochromocytome
2	100	72	85	60	<3	<4	corticosurréalome
3	252	150	135	55	114	76	Ø phéochromocytome
4	209	96	130	44	135	66	Ø phéochromocytome
5	227	120	<7	IT	<3	46	Ø phéochromocytome
6	230	132	210	137	110	61	Ø phéochromocytome
7	249	150	268	120	73	36	métastases adénocarcinome du rectum
8	97	66	120	104	<3	<4	adénome cortisolique bénin
9	322	168	<7	38	143	86	Ø phéochromocytome
10	134	90	107	66	38	25	Ø phéochromocytome
11	179	60	97	66	<3	<4	hyperplasie surrénalienne macronodulaire bilatérale non sécrétante bénigne
12	201	120	147	87	<3	61	hyperaldostéronisme primaire
13	473	341	331	235	<3	71	suivi phéochromocytome non sécrétant (01/2018)
14	415	185	336	126	248	132	Ø phéochromocytome
15	319	179	185	109	90	61	Ø phéochromocytome
16	337	167	139	60	<3	36	hématome intra-surrénalien
17	203	90	<7	49	<3	41	Ø phéochromocytome
18	469	269	278	186	146	91	Ø phéochromocytome
19	380	245	221	147	175	132	hyperaldostéronisme primaire
20	78	36	76	38	35	20	Ø phéochromocytome
21	318	138	125	76	168	112	Ø phéochromocytome
22	247	102	177	137	73	71	Ø phéochromocytome
23	168	90	113	98	35	25	Ø phéochromocytome
24	333	197	196	147	234	162	Ø phéochromocytome
25	401	257	245	147	154	107	Ø phéochromocytome
26	230	132	108	77	<3	41	corticosurréalome
27	453	269	410	284	244	162	Ø phéochromocytome
28	144	66	134	66	111	66	suivi de paragangliome (été 2015)
29	<3	48	<7	<4	<3	<4	Ø phéochromocytome
30	291	179	259	131	170	96	Ø phéochromocytome
31	273	144	211	82	<3	<4	Ø phéochromocytome
32	331	185	575	409	153	96	Ø phéochromocytome

nmol /24h	3-Méthoxytyramine		Normétanéphrine		Métanéphrine		Clinique
	CHU Nantes VN : 73-439	Biomnis VN : 88-320 jusqu'à n°14 inclus puis 69-315	CHU Nantes VN : 55-304	Biomnis VN : 44-213 jusqu'à n°14 inclus puis 40-240	CHU Nantes VN : 32-314	Biomnis VN : 40-228 jusqu'à n°14 inclus puis 29-143	
33	97	IT	97	33	<3	<4	paragangliome non sécrétant
34	287	191	229	109	474	299	∅ phéochromocytome
35	449	263	322	131	<3	61	∅ phéochromocytome
36	187	132	<7	38	<3	51	∅ phéochromocytome
37	204	129	123	100	72	61	∅ phéochromocytome
38	171	120	231	164	548	416	phéochromocytome
39	255	161	128	137	82	66	∅ phéochromocytome
40	538	206	764	494	234	180	∅ phéochromocytome
41	86	<3	<7	<4	53	56	∅ phéochromocytome
42	513	366	<7	<4	112	87	∅ phéochromocytome
43	178	120	258	153	523	355	phéochromocytome
44	129	126	171	131	<3	71	∅ phéochromocytome
45	219	138	197	60	100	66	∅ phéochromocytome
46	214	144	425	278	692	497	phéochromocytome
47	16997	10048	445	224	207	137	∅ phéochromocytome
48	445	311	188	142	210	142	∅ phéochromocytome
49	11827	8325	388	328	181	122	∅ phéochromocytome
50	14168	8840	412	224	168	101	∅ phéochromocytome
51	279	221	109	82	84	71	∅ phéochromocytome
52	230	162	196	164	71	46	∅ phéochromocytome
53	239	156	127	76	79	51	∅ phéochromocytome
54	1936	1220	12322	>7650	9405	>4267	phéochromocytome

Tableau 43 : Comparaison des valeurs des dérivés méthoxylés urinaires chez l'adulte entre notre laboratoire et celui de Biomnis et comparaison au contexte clinique. Données de l'année 2018.

Ech : numéro attribué à un échantillon urinaire / VN : valeurs de référence / ∅ : symbole signifiant « absence de »

Suivis de tumeur : date du diagnostic indiquée entre parenthèses.
Si diagnostic différentiel mis en évidence, il est mentionné.

- : valeur supérieure à 4N évoquant le diagnostic d'un phéochromocytome/paragangliome
- : valeur douteuse comprise entre 2N et 4N
- : valeur comprise entre la limite supérieure de l'intervalle de référence et 2N
- : valeur comprise dans l'intervalle de référence

Concernant les catécholamines urinaires, nous sommes toujours assez cohérents avec le laboratoire Biomnis (annexe 58). Il n'y a jamais d'écart suffisamment marquant entre les deux techniques. Quand Biomnis rend des valeurs fortement élevées, nous rendons des valeurs fortement élevées également. Quand Biomnis rend des valeurs dans les limites des valeurs de référence, nous rendons des valeurs dans les limites des valeurs de référence également, ou alors juste au-dessus. Quand l'un de nous rend des valeurs douteuses entre 2N et 4N, l'autre rend des valeurs également douteuses ou bien à la limite du seuil à 2N (urines 5 et 37). Et même si le biais observé pour la dopamine (annexe 19) semble, de premier abord, important, il ne change rien à la conclusion qui en est tirée, ce qui justifie le fait que nous nous permettons de continuer à utiliser les mêmes valeurs de référence décrites dans l'article de Fraser Davidson *et al.* (39).

Nous confirmons aussi que quelle que soit la conclusion (diagnostic de neuroblastome ou non), l'épinéphrine et la norépinéphrine ne sont jamais augmentées (annexe 58) et sont toujours situées dans les intervalles de référence. C'est bien la dopamine uniquement (parmi les catécholamines), en plus des dérivés méthoxylés terminaux urinaires que sont l'HVA et le VMA, qui nous permettra d'orienter le diagnostic vers un neuroblastome sécrétant.

En 2018, deux diagnostics de neuroblastome ont été effectués (urines 7 et 10 pour le premier, urine 39 pour le second). Sur ces deux neuroblastomes, l'un est non différencié et non sécrétant (urines 7 et 10) – catécholamines (dopamine en particulier) dans l'intervalle de référence, le diagnostic est fait sur les résultats d'anatomo-pathologie et de génétique – et l'autre est un neuroblastome classique (urine 39), sécrétant, avec des valeurs de dopamine supérieures à 4N (5 à 6 fois les valeurs de référence) autant chez nous que chez Biomnis.

A chaque fois qu'un neuroblastome a été exclu (sur un faisceau d'arguments clinique, biologique, anatomo-pathologique et d'imagerie), les valeurs de dopamine restaient toujours dans les valeurs de référence.

Pour les cas où les valeurs de dopamine étaient douteuses – c'est-à-dire entre 2N et 4N – ou légèrement au-dessus des valeurs de référence (urines 5, 14, 37, 43 et 44), il s'agissait de suivis de neuroblastomes diagnostiqués il y a plusieurs années ou plusieurs mois et donc pris en charge depuis. Tous les suivis ne sont pas dans ce cas, la plupart présentent des résultats compris dans les valeurs de référence.

Concernant les dérivés méthoxylés urinaires (tableau 43), comme pour les catécholamines urinaires, nos résultats sont presque parfaitement superposables à ceux obtenus par le laboratoire Biomnis. Quand nos valeurs sont supérieures à 4N, celles de Biomnis le sont

également – il y a un échantillon seulement où il y a une légère différence pour la 3-méthoxytyramine (urine 54), avec Biomnis qui retrouve une valeur douteuse alors que nous retrouvons une valeur supérieure à 4N (diagnostic de phéochromocytome confirmé). Quand nos valeurs sont situées entre 2N et 4N, elles le sont également pour Biomnis. Et dans les cas où Biomnis rend des résultats entre 2N et 4N et que ce n'est pas exactement notre cas, nous rendons en fait des résultats à la limite du seuil à 2N. Ce cas particulier concerne deux patients, l'un d'entre eux possède un phéochromocytome avéré (urines 38 et 43 : métanéphrine rendue deux fois à 1,7N au CHU, et à 2,9N et 2,5N par Biomnis), l'autre patient ne présentait pas de phéochromocytome (urine 34 : métanéphrine rendue à 1,5N au CHU et 2,1N par Biomnis). Ceci ne remet pas en question la conclusion obtenue sur les interférences alimentaires puisque les interférences observées n'atteignaient pas le seuil de 1,5N pour les métanéphrines. Enfin, quand l'un d'entre nous rend des valeurs comprises dans son intervalle de référence ou juste au-dessus – tout en restant inférieures à 2N -, l'autre rend des résultats également compris dans son intervalle de référence ou juste au-dessus. Certaines valeurs apparaissent être à la limite du seuil de positivité et c'est pourquoi il arrive parfois qu'elles passent juste au-dessus pour l'un tandis qu'elles restent dans l'intervalle de référence pour l'autre.

Durant l'année 2018, il y a eu quatre diagnostics de phéochromocytome (urine 1 pour le premier, urines 38 et 43 pour le second, urine 46 pour le troisième et urine 54 pour le dernier) et un diagnostic de paragangliome non sécrétant (urine 33). Deux personnes faisaient également l'objet d'un suivi, l'un pour un phéochromocytome non sécrétant (urine 13) et l'autre pour un paragangliome (urine 28) diagnostiqués antérieurement à cette année.

Parmi les quatre diagnostics de phéochromocytome, il y en a un dont le diagnostic a été fait en ville (urine 1) avec des valeurs à plus de 25 fois les valeurs de référence pour la métanéphrine. Or, quand nous avons reçu ses urines, il n'y avait rien qui pouvait nous faire penser, d'un point de vue biologique, à un phéochromocytome. Les valeurs des dérivés méthoxylés urinaires étaient normales. Une explication donnée par les cliniciens est que le recueil était probablement incomplet dans notre cas et lorsqu'un contrôle a été réalisé un mois plus tard, ce n'était toujours pas des urines de 24 heures qui avaient été prélevées. Il n'y avait donc pas possibilité, malheureusement, de vérifier les valeurs obtenues en ville.

Deux patients pour lesquels nous avons diagnostiqué un phéochromocytome présentaient des valeurs douteuses pour la métanéphrine – à la fois chez nous et chez Biomnis pour l'un (urine 46), seulement chez Biomnis pour l'autre et à deux reprises (urines 38 et 43 ; nos valeurs étaient égales à 1,7N). Cependant, pour ces deux patients, ce sont l'imagerie et l'anatomopathologie qui ont permis de poser définitivement le diagnostic.

Le quatrième phéochromocytome diagnostiqué ne posait pas de problème puisque les valeurs obtenues (urine 54) sont franchement élevées parmi tous les dérivés méthoxylés.

Enfin, il est à noter qu'un patient, pour lequel il y a eu plusieurs recueils urinaires (urines 47, 49 et 50), était sous traitement par L-DOPA, ce qui explique ses taux anormalement élevés en 3-méthoxytyramine (le métabolite de la L-DOPA interférant avec ce composé) (64) alors qu'il n'existait aucun autre critère pour un phéochromocytome.

2 – Rétrospectives sur les deux années de dosage en « routine » au CHU de Nantes

La figure 18 (dérivés méthoxylés) et l'annexe 59 (catécholamines) ont pour but de faire une synthèse des résultats trouvés jusque là chez des patients tout venant, adultes, pour lesquels des dosages de catécholamines et de dérivés méthoxylés urinaires ont été réalisés. Les valeurs y sont rapportées à la diurèse, exprimées en nmol/24h, et les intervalles de référence pour chacun des six composés sont symbolisés par des traits épais noirs.

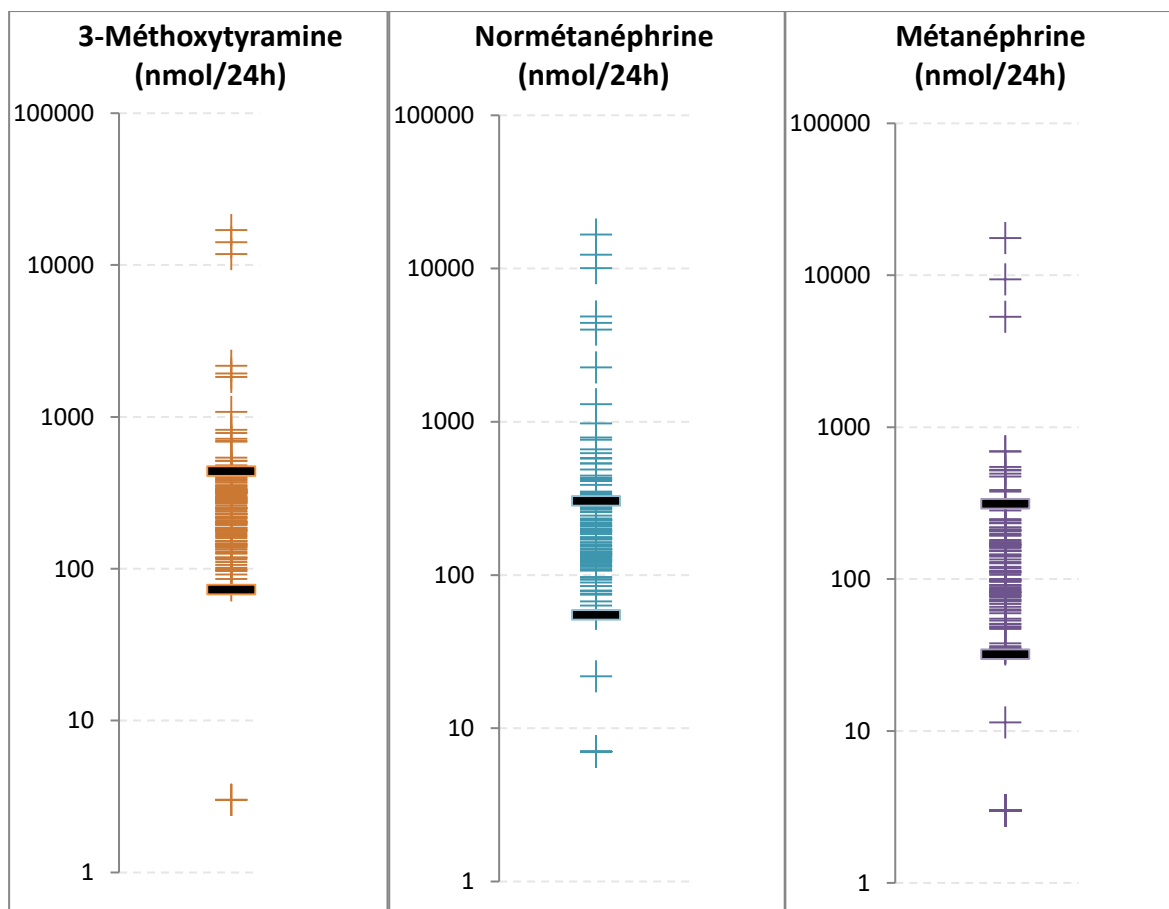


Figure 18 : Dérivés méthoxylés urinaires : résultats patients de 2016 à septembre 2018 (échelle logarithmique). Intervalles de référence bornés par les traits épais noirs.

Comme nous pouvons l'apprécier sur ces graphiques, il existe de nombreux cas pour lesquels les valeurs sont supérieures aux intervalles de référence. C'est particulièrement vrai pour les dérivés méthoxylés. Souvent, les valeurs se situent juste au-dessus de la limite supérieure de l'intervalle de référence et il n'est pas rapporté d'autre argument en faveur d'un phéochromocytome ou d'un paragangliome. Mais les dérivés méthoxylés, pour quelques cas, sont significativement élevés (supérieurs à 2N ou 4N) voire très élevés. Ces cas coïncident quasiment toujours avec la découverte d'un phéochromocytome ou d'un paragangliome, avec le suivi d'une de ces tumeurs (souvent récidivante ou métastatique dans ce cas de figure), ou avec la prise d'un traitement interférent (en particulier la L-DOPA). De rares cas douteux – c'est-à-dire situés entre 2N et 4N – (3 cas) ne sont pas associés à ces différentes étiologies et il n'y a pas eu de pathologie particulière diagnostiquée en aval.

De manière générale, à chaque fois que les valeurs des dosages sont douteuses ou significativement positives, ce n'est pas sans raison. Il existe une étroite corrélation avec l'étiologie retrouvée.

Depuis la mise en routine des dosages de catécholamines et de dérivés méthoxylés urinaires au laboratoire d'hormonologie du CHU de Nantes – c'est-à-dire sur la période qui s'étend entre le 01 mai 2017 et le 31 janvier 2019 – nous dénombrons d'une part :

- Les tumeurs avérées ayant bénéficié d'un ou plusieurs dosages des dérivés méthoxylés urinaires, chez l'adulte :
 - 12 diagnostics de phéochromocytomes (dont 1 phéochromocytome non sécrétant),
 - 3 diagnostics de paragangliomes (dont 2 non sécrétants).

Les 15 patients concernés représentent 19 dosages réalisés, certains d'entre eux ayant effectué plusieurs recueils urinaires.

- Les tumeurs avérées ayant bénéficié d'un ou plusieurs dosages des catécholamines urinaires chez l'enfant :
 - 6 diagnostics de neuroblastomes (dont 3 indifférenciés ou non sécrétants).

Les 6 patients concernés représentent 7 dosages réalisés, l'un d'entre eux ayant bénéficié de deux dosages.

Nous ne pouvons pas donner le nombre exact de diagnostics de phéochromocytomes/paragangliomes ou neuroblastomes, car, malheureusement, il existe certains cas dans lesquels ces dosages n'ont pas été réalisés car le recueil urinaire impossible. Une découverte tardive de la masse tumorale et une évolutivité de la maladie de manière fulminante entraînant à court terme le décès du patient est un exemple parmi d'autres dont nous avons fait l'expérience.

D'autre part, certaines tumeurs sont non sécrétantes. Ceci implique que le diagnostic doit être fait par l'intermédiaire d'autres techniques (imagerie, anatomo-pathologie, génétique), le dosage des catécholamines et des dérivés méthoxylés urinaires étant non contributif car dans les valeurs de référence.

Ainsi, depuis la mise en routine des dosages, en ne tenant compte que des dosages contributifs et ne concernant que les dérivés méthoxylés urinaires chez l'adulte, 11 dosages (valeurs douteuses ou supérieures à 4N) ont contribué au diagnostic d'un phéochromocytome ou d'un paragangliome.

Concernant les catécholamines urinaires chez l'enfant, nous avons obtenu 3 valeurs douteuses ou supérieures à 4N associées à un neuroblastome avéré.

Les résultats que nous avons obtenus au CHU de Nantes montrent que notre technique est très bien adaptée à l'utilisation en routine du dosage des catécholamines et des dérivés méthoxylés urinaires. Dans un premier temps, elle est tout à fait comparable à la méthode de référence utilisée par le laboratoire chez qui nous sous-traitions nos échantillons. Nous retrouvons sensiblement les mêmes résultats. Et dans un second temps, elle concorde bien avec les aspects cliniques et les étiologies retrouvées quand les résultats sont anormaux. Cela en fait donc une technique fiable sur laquelle nous pouvons compter en vue de confirmer ou d'infirmer un diagnostic de phéochromocytome ou de paragangliome sécrétant.

Conclusion

La mise au point du dosage simultané des catécholamines et dérivés méthoxylés urinaires par technique de LC-MS/MS nous a permis 1) De doser en routine les marqueurs de phéochromocytome/paragangliome et de neuroblastome dans la même série de dosage, 2) De ré-internaliser le dosage de ces paramètres d'urgence, jusqu'ici sous-traités, et 3) De rendre les résultats de façon hebdomadaire, voire en urgence.

Les différents paramètres de la validation de méthode sont respectés. La comparaison à la méthode de référence nous a posé quelques petits soucis car, même si notre méthode était bien corrélée à celle de référence, il existait des biais pour certains composés. Nous avons répondu à cette problématique en définissant nos propres valeurs de référence chez l'adulte pour les dérivés méthoxylés urinaires, et en analysant chaque cas précisément chez les enfants pour les catécholamines urinaires. Pour ce dernier point, nous avons montré que les biais retrouvés pour le composé concerné, la dopamine, étaient finalement négligeables et que nous pouvions continuer à utiliser les intervalles de référence définis dans la littérature pour interpréter les résultats des catécholamines urinaires. Dans un second temps, nous nous sommes intéressés à l'aspect pré-analytique de l'échantillon, avec des problématiques soulevées autour des valeurs de pH urinaires optimales pour éviter toute dégradation ou toute surestimation des différents analytes lors des dosages et qui permettent une bonne conservation des urines dans le temps. Nous en avons conclu que des valeurs de pH situées entre 1 et 5 suffisaient amplement à atteindre notre objectif. Par ailleurs, nous souhaitions vérifier l'intérêt d'un régime alimentaire strict préalable au recueil des urines des 24 heures. Est-il véritablement nécessaire de respecter ces restrictions alimentaires qui représentent non seulement une contrainte réelle pour le patient mais aussi un retard au diagnostic non négligeable ? L'étude que nous avons menée prouve que ce régime alimentaire n'est pas indispensable. En effet, nous n'avons jamais observé d'augmentation significativement importante en catécholamines et en dérivés méthoxylés dans les urines. Ainsi, considérant ces résultats, nous suggérons une alternative aux recommandations actuelles qui entourent le recueil urinaire en vue d'un dosage des catécholamines et des dérivés méthoxylés urinaires, qui est de ne pas effectuer, dans un premier temps, d'exclusion alimentaire spécifique avant le recueil. C'est seulement dans le cas où nous observerions des valeurs augmentées qu'un second recueil après respect d'un régime alimentaire strict s'avérerait alors utile pour conclure définitivement ou non à la présence d'un phéochromocytome/paragangliome.

Les premiers dosages effectués en routine au laboratoire de biochimie-hormonologie au CHU de Nantes sont tout à fait satisfaisants et, déjà, des premiers diagnostics de phéochromocytome ont pu être confirmés grâce à notre méthode. Les phéochromocytomes ou paragangliomes et les neuroblastomes représentent des pathologies qui peuvent être potentiellement et rapidement fatales pour les patients, d'où la nécessité d'une réactivité importante du laboratoire qui peut être amené à les doser en urgence. D'autre part, cette méthode s'aligne parfaitement sur les enjeux actuels, avec la place importante qu'occupe et que continuera à occuper de plus en plus la spectrométrie de masse, permettant un rendu de résultats relativement rapide (moins de 24 heures si nécessaire) et fiable.

Pour faciliter encore davantage le diagnostic et le suivi des patients, notre objectif est maintenant de mettre au point le dosage des métanéphrines plasmatiques, ce qui nécessite la mise en place d'un appareil de LC-MS/MS plus sensible encore que celui que nous utilisons actuellement.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. Burnichon N, Favier J. PHÉOCHROMOCYTOMES ET PARAGANGLIOMES : ASPECTS RÉCENTS. :20.
2. Rouaix-Emery N, Tierny-Fontalirand C, Cardot-Bauters C, Carnaille B, Wemeau J-L, d'Herbomez M. [Biological diagnosis of pheochromocytoma in 2014]. *Ann Biol Clin (Paris)*. févr 2014;72(1):7-13.
3. d'Herbomez M, Rouaix N, Bauters C, Wémeau J-L. [Biological diagnosis of pheochromocytomas and paragangliomas]. *Presse Med*. juin 2009;38(6):927-34.
4. 6. Neurotransmetteurs - Aphysionado [Internet]. [cité 17 avr 2019]. Disponible sur: <https://sites.google.com/site/aphysionado/home/cellsnv/PA/neurotransmetteurs>
5. Udenfriend S. B. Tyrosine Hydroxylase. *Pharmacol Rev*. 1 mars 1966;18(1):43-51.
6. Jakobsen AM, Andersson P, Saglik G, Andersson E, Kölby L, Erickson JD, et al. Differential expression of vesicular monoamine transporter (VMAT) 1 and 2 in gastrointestinal endocrine tumours. *J Pathol*. nov 2001;195(4):463-72.
7. Brown WJ, Barajas L, Waisman J, De Quattro V. Ultrastructural and biochemical correlates of adrenal and extra-adrenal pheochromocytoma. *Cancer*. mars 1972;29(3):744-59.
8. Henry JP, Sagné C, Bedet C, Gasnier B. The vesicular monoamine transporter: from chromaffin granule to brain. *Neurochem Int*. mars 1998;32(3):227-46.
9. O'Connor DT, Wu H, Gill BM, Rozansky DJ, Tang K, Mahata SK, et al. Hormone storage vesicle proteins. Transcriptional basis of the widespread neuroendocrine expression of chromogranin A, and evidence of its diverse biological actions, intracellular and extracellular. *Ann N Y Acad Sci*. 15 sept 1994;733:36-45.
10. Eisenhofer G. The role of neuronal and extraneuronal plasma membrane transporters in the inactivation of peripheral catecholamines. *Pharmacol Ther*. juill 2001;91(1):35-62.
11. Eisenhofer G, Goldstein DS, Kopin IJ, Crout JR. Pheochromocytoma: rediscovery as a catecholamine-metabolizing tumor. *Endocr Pathol*. 2003;14(3):193-212.
12. Candito M, Billaud E, Chauffert M, Cottet-Emard J-M, Desmoulin D, Garnier J-P, et al. Diagnostic biochimique du phéochromocytome et du neuroblastome. *Annales de Biologie Clinique*. 4 févr 2002;60(1):15-36.
13. Juszczak K, Drewa T. Adrenergic crisis due to pheochromocytoma – practical aspects. A short review. *Cent European J Urol*. 2014;67(2):153-5.
14. Lenders JWM, Eisenhofer G, Mannelli M, Pacak K. Phaeochromocytoma. *Lancet*. 20 août 2005;366(9486):665-75.
15. Eisenhofer G, Keiser H, Friberg P, Mezey E, Huynh TT, Hiremagalur B, et al. Plasma metanephrines are markers of pheochromocytoma produced by catechol-O-methyltransferase within tumors. *J Clin Endocrinol Metab*. juin 1998;83(6):2175-85.

16. Lenders JWM, Pacak K, Walther MM, Linehan WM, Mannelli M, Friberg P, et al. Biochemical diagnosis of pheochromocytoma: which test is best? *JAMA*. 20 mars 2002;287(11):1427-34.
17. de Jong WHA, Eisenhofer G, Post WJ, Muskiet FAJ, de Vries EGE, Kema IP. Dietary influences on plasma and urinary metanephrines: implications for diagnosis of catecholamine-producing tumors. *J Clin Endocrinol Metab*. août 2009;94(8):2841-9.
18. Plouin P-F, Gimenez-Roqueplo A-P. Pheochromocytomas and secreting paragangliomas. *Orphanet J Rare Dis*. 8 déc 2006;1:49.
19. Richard S, Graff J, Lindau J, Resche F. Von Hippel-Lindau disease. *The Lancet*. 10 avr 2004;363(9416):1231-4.
20. Rustin P, Munnich A, Rötig A. Succinate dehydrogenase and human diseases: new insights into a well-known enzyme. *Eur J Hum Genet*. mai 2002;10(5):289-91.
21. Gottlieb E, Tomlinson IPM. Mitochondrial tumour suppressors: a genetic and biochemical update. *Nat Rev Cancer*. nov 2005;5(11):857-66.
22. Burnichon N, Cascón A, Schiavi F, Morales NP, Comino-Méndez I, Abermil N, et al. MAX mutations cause hereditary and sporadic pheochromocytoma and paraganglioma. *Clin Cancer Res*. 15 mai 2012;18(10):2828-37.
23. Undiagnosed Pheochromocytoma Complicated with Perioperative Hemodynamic Crisis and Multiple Organ Failure | IntechOpen [Internet]. [cité 27 mars 2019]. Disponible sur: <https://www.intechopen.com/books/pheochromocytoma-a-new-view-of-the-old-problem/undiagnosed-pheochromocytoma-complicated-with-perioperative-hemodynamic-crisis-and-multiple-organ-fa>
24. chromatographie sur colonne | physique-appliquee.net [Internet]. [cité 26 mars 2019]. Disponible sur: http://www.physique-appliquee.net/banque_images/picture.php?/537
25. ATEM - Chimie - ATEM - Chromatographie - Phase Liquide - Université Lille 1 [Internet]. [cité 26 mars 2019]. Disponible sur: <http://atechimie.univ-lille1.fr/Chromatographie-Phase-Liquide/>
26. Ionization Source Technology Overview - FR [Internet]. [cité 26 mars 2019]. Disponible sur: <https://www.thermofisher.com/fr/fr/home/industrial/mass-spectrometry/mass-spectrometry-learning-center/mass-spectrometry-technology-overview/ionization-source-technology-overview.html>
27. Targeted proteomics - SRM/MRM [Internet]. [cité 26 mars 2019]. Disponible sur: <http://www.inf.fu-berlin.de/lehre/WS14/ProteomicsWS14/LUS/lu6a/345/index.html>
28. Accueil | COFRAC - Comité français d'accréditation [Internet]. [cité 21 avr 2019]. Disponible sur: https://tools.cofrac.fr/fr/documentation/index.php?fol_id=63
29. Diniz MER, Vilhena LS, Paulo BP, Barbosa TCC, Mateo EC, Diniz MER, et al. Simultaneous Determination of Catecholamines and Metanephrines in Urine by Liquid Chromatography Electrospray Ionization Tandem Mass Spectrometry: Successful Clinical Application. *Journal of the Brazilian Chemical Society*. août 2015;26(8):1684-91.

30. Geffré A, Concordet D, Braun J-P, Trumel C. Reference Value Advisor: a new freeware set of macroinstructions to calculate reference intervals with Microsoft Excel. *Vet Clin Pathol*. mars 2011;40(1):107-12.
31. (PDF) Analyses de biologie médicale : spécifications et normes d'acceptabilité à l'usage de la validation de techniques [Internet]. ResearchGate. [cité 27 mars 2019]. Disponible sur: https://www.researchgate.net/publication/279493447_Analyses_de_biologie_medicale_specifications_et_normes_d'acceptabilite_a_l'usage_de_la_validation_de_techniques
32. FDA/CDER/"Beers D. Analytical Procedures and Methods Validation for Drugs and Biologics. 2015;18.
33. (PDF) The EMA Bioanalytical Method Validation Guideline: process, history, discussions and evaluation of its content. [Internet]. ResearchGate. [cité 27 mars 2019]. Disponible sur: https://www.researchgate.net/publication/268146686_The_EMA_Bioanalytical_Method_Validation_Guideline_process_history_discussions_and_evaluation_of_its_content
34. Grenier B, Dubreuil M, Journois D. Comparaison de deux méthodes de mesure d'une même grandeur : méthode de Bland et Altman. *Annales Françaises d'Anesthésie et de Réanimation*. 1 févr 2000;19(2):128-35.
35. Schoonjans F. A note on Passing-Bablok regression. [Internet]. MedCalc. [cité 29 mars 2019]. Disponible sur: <https://www.medcalc.org/manual/note-passingbablok.php>
36. Petteys BJ, Graham KS, Parnás ML, Holt C, Frank EL. Performance characteristics of an LC-MS/MS method for the determination of plasma metanephrines. *Clin Chim Acta*. 9 oct 2012;413(19-20):1459-65.
37. Rouaix-Emery N, Tierny-Fontalirand C, Cardot-Bauters C, Carnaille B, Wemeau J-L, d'Herbomez M. Le diagnostic biologique de phéochromocytome en 2014. *Annales de Biologie Clinique*. 1 janv 2014;72(1):7-13.
38. Eisenhofer G, Goldstein DS, Walther MM, Friberg P, Lenders JWM, Keiser HR, et al. Biochemical diagnosis of pheochromocytoma: how to distinguish true- from false-positive test results. *J Clin Endocrinol Metab*. juin 2003;88(6):2656-66.
39. Davidson DF, Hammond PJ, Murphy D, Carachi R. Age-related medical decision limits for urinary free (unconjugated) metadrenalines, catecholamines and metabolites in random urine specimens from children. *Ann Clin Biochem*. juill 2011;48(Pt 4):358-66.
40. Arrêté du 26 novembre 1999 relatif à la bonne exécution des analyses de biologie médicale.
41. Roberts NB, Higgins G, Sargazi M. A study on the stability of urinary free catecholamines and free methyl-derivatives at different pH, temperature and time of storage. *Clin Chem Lab Med*. 2010;48(1):81-7.
42. Willemsen JJ, Ross HA, Lenders JWM, Sweep FCGJ. Stability of urinary fractionated metanephrines and catecholamines during collection, shipment, and storage of samples. *Clin Chem*. févr 2007;53(2):268-72.
43. Chan EC, Wee PY, Ho PC. Evaluation of degradation of urinary catecholamines and metanephrines and deconjugation of their sulfoconjugates using stability-indicating reversed-

- phase ion-pair HPLC with electrochemical detection. *J Pharm Biomed Anal.* avr 2000;22(3):515-26.
44. Lefebvre H. Les pseudo-phéochromocytomes médicamenteux. *Médecine thérapeutique / Endocrinologie.* 19 sept 2002;4(3):149-55.
 45. Bracken RM, Linnane DM, Brooks S. Plasma catecholamine and nephrine responses to brief intermittent maximal intensity exercise. *Amino Acids.* févr 2009;36(2):209-17.
 46. Dobri GA, Bravo E, Hamrahian AH. Pheochromocytoma: pitfalls in the biochemical evaluation. *Expert Rev Endocrinol Metab.* mars 2014;9(2):123-35.
 47. Neary NM, King KS, Pacak K. Drugs and pheochromocytoma--don't be fooled by every elevated metanephrine. *N Engl J Med.* 9 juin 2011;364(23):2268-70.
 48. Davidson DF, Grosset K, Grosset D. Parkinson's disease: the effect of L-dopa therapy on urinary free catecholamines and metabolites. *Annals of Clinical Biochemistry.* 1 juill 2007;44(4):364-8.
 49. d'Herbomez M, Forzy G, Bauters C, Tierny C, Pigny P, Carnaille B, et al. An analysis of the biochemical diagnosis of 66 pheochromocytomas. *Eur J Endocrinol.* mai 2007;156(5):569-75.
 50. Davidson FD. Paracetamol-associated interference in an HPLC-ECD assay for urinary free metadrenalines and catecholamines. *Ann Clin Biochem.* juill 2004;41(Pt 4):316-20.
 51. Rimareix F, Grunenwald S, Vezzosi D, Bennet A, Caron P. Élévation isolée des normétanéphrines urinaires par interférence médicamenteuse avec la sulfasalazine. *La Presse Médicale.* juin 2012;41(6):664-6.
 52. Kim H-K, Ko D-H, Jeong T-D, Lee S-H, Lee W, Lee S-Y, et al. Rifampicin Interference in the Measurement of Urinary Catecholamines by High-Performance Liquid Chromatography. *Ann Clin Lab Sci.* 2015;45(3):356-9.
 53. Barco S, Alpigiani MG, Ghiggeri GM, Talio M, Maffia A, Tripodi G, et al. Amoxicillin-associated interference in an HPLC-EC assay for urinary fractionated metanephrines: potential pitfall in pheochromocytoma biochemical diagnosis. *Clin Biochem.* oct 2014;47(15):119-21.
 54. Feldman JM. Falsely elevated urinary excretion of catecholamines and metanephrines in patients receiving labetalol therapy. *J Clin Pharmacol.* avr 1987;27(4):288-92.
 55. Savory DJ. Interference by Sotalol with the Pisano method for urinary metanephrines. *Ann Clin Biochem.* sept 1984;21 (Pt 5):446.
 56. Jauzac P, Sylla C, Valdiguie P, Couste-Blazy L. Elimination of interference by acebutolol and its metabolites in determinations of urinary metanephrines. *Clin Chem.* mai 1982;28(5):1243-4.
 57. Corcuff J-B, Chardon L, El Hajji Ridah I, Brossaud J. Urinary sampling for 5HIAA and metanephrines determination: revisiting the recommendations. *Endocr Connect.* 31 mai 2017;6(6):R87-98.
 58. Madiedo G, Smurawa B. Interference by triamterene with assay for metanephrine. *Clin Chem.* mai 1980;26(6):782.

59. Taylor RL, Singh RJ. Validation of liquid chromatography-tandem mass spectrometry method for analysis of urinary conjugated metanephrine and normetanephrine for screening of pheochromocytoma. *Clin Chem.* mars 2002;48(3):533-9.
60. Clark ZD, Frank EL. Urinary metanephrines by liquid chromatography tandem mass spectrometry: Using multiple quantification methods to minimize interferences in a high throughput method. *Journal of Chromatography B.* 1 déc 2011;879(31):3673-80.
61. Vogeser M, Seger C. Pitfalls associated with the use of liquid chromatography-tandem mass spectrometry in the clinical laboratory. *Clin Chem.* août 2010;56(8):1234-44.
62. EURL | Residues of Pesticides | Method Validation & Quality Control Procedures for Pesticide Residues Analysis in Food & Feed [Internet]. [cité 21 avr 2019]. Disponible sur: <http://www.eurl-pesticides.eu/docs/public/tmpl/article.asp?CntID=727>
63. Kushnir MM, Rockwood AL, Nelson GJ, Yue B, Urry FM. Assessing analytical specificity in quantitative analysis using tandem mass spectrometry. *Clin Biochem.* avr 2005;38(4):319-27.
64. Eisenhofer G, Peitzsch M, McWhinney BC. Impact of LC-MS/MS on the laboratory diagnosis of catecholamine-producing tumors. *TrAC Trends in Analytical Chemistry.* 1 nov 2016;84:106-16.
65. Lagerstedt SA, O’Kane DJ, Singh RJ. Measurement of Plasma Free Metanephrine and Normetanephrine by Liquid Chromatography–Tandem Mass Spectrometry for Diagnosis of Pheochromocytoma. *Clinical Chemistry.* 1 mars 2004;50(3):603-11.
66. de Jong WHA, Eisenhofer G, Post WJ, Muskiet FAJ, de Vries EGE, Kema IP. Dietary influences on plasma and urinary metanephrines: implications for diagnosis of catecholamine-producing tumors. *J Clin Endocrinol Metab.* août 2009;94(8):2841-9.
67. de Jong WHA, Post WJ, Kerstens MN, de Vries EGE, Kema IP. Elevated urinary free and deconjugated catecholamines after consumption of a catecholamine-rich diet. *J Clin Endocrinol Metab.* juin 2010;95(6):2851-5.
68. Combet E, Lean MEJ, Boyle JG, Crozier A, Davidson DF. Dietary flavonols contribute to false-positive elevation of homovanillic acid, a marker of catecholamine-secreting tumors. *Clin Chim Acta.* 14 janv 2011;412(1-2):165-9.
69. Heinemann G, Schievelbein H, Eberhagen D, Rahlfs V. [The influence of different diets and smoking on the clinical chemical diagnosis of pheochromocytoma, neuroblastoma, and carcinoid syndrome (author’s transl)]. *Klin Wochenschr.* 15 oct 1981;59(20):1165-73.
70. Kema IP, Schellings AM, Meiborg G, Hoppenbrouwers CJ, Muskiet FA. Influence of a serotonin- and dopamine-rich diet on platelet serotonin content and urinary excretion of biogenic amines and their metabolites. *Clin Chem.* sept 1992;38(9):1730-6.
71. Weetman RM, Rider PS, Oei TO, Hempel JS, Baehner RL. Effect of diet on urinary excretion of VMA, HVA, metanephrine, and total free catecholamine in normal preschool children. *The Journal of Pediatrics.* 1 janv 1976;88(1):46-50.
72. Peitzsch M, Pelzel D, Glöckner S, Prejbisz A, Fassnacht M, Beuschlein F, et al. Simultaneous liquid chromatography tandem mass spectrometric determination of urinary free metanephrines and catecholamines, with comparisons of free and deconjugated metabolites. *Clinica Chimica Acta.* 15 mars 2013;418:50-8.

Annexe 1 : Mode opératoire : dosage des catécholamines et des dérivés méthoxylés libres urinaires par LC-MS/MS.

 CENTRE HOSPITALIER UNIVERSITAIRE DE NANTES	MODE OPERATOIRE	Diffusion par : PHU 07 - Biologie - BIOCHIMIE	9250-MO-289
	Dosage des Catécholamines urinaires et des dérivés méthoxylés	Processus : *Métier BiologieAnalytiqueRéalisation de l'analyse et validation technique	Page 1 / 6

Table des matières

1. Objectifs.....	1
2. Domaine d'application	1
3. Description.....	1
3.1 Reconstitution des réactifs.....	1
3.1.1 Préparation du complexant :	2
3.1.2 Reconstitution des calibrateurs :	2
3.1.3 Reconstitution des contrôles internes :	2
3.1.4 Préparation des Standards Internes Deutérés (0.1g/L) :	2
3.1.5 Préparation des phases mobiles :	3
3.2 Mode opératoire – préparation.....	3
3.2.1 Préambule, prétraitement des échantillons et renseignements importants :	3
3.2.2 Préparation des solutions d'étalons internes (deutérés) :	3
3.2.3 Préparation de la gamme de calibration :	4
3.2.4 Traitement de l'ensemble des tubes (gamme-contrôles-échantillons) :	4
3.3 Passage sur la LC-MS-MS	4
3.3.1 Paramétrage :	4
3.3.2 Amorçage, équilibré :	4
3.3.3 Rinçage :	4
3.4 Résultats	5

1. OBJECTIFS

Réalisation du dosage des catécholamines (Dopamine, Adrénaline et Noradrénaline) et dérivés méthoxylés urinaires (3 méthoxytyramine, méthanéphrine et norméthanéphrine) par LC-MS-MS.

2. DOMAINE D'APPLICATION

Le(s) secteur(s) concerné(s) est (sont) :
PHU 07 - Biologie\Biochimie\Hormonologie.

3. DESCRIPTION

Les colonnes sont stockées à température ambiante dans un tiroir sous paillasse de la pièce de LC-MS/MS.

3.1 Reconstitution des réactifs

La traçabilité de chaque réactif/CQI/Cal/deutééré et colonne est à faire dans les tableaux Excel situé dans le dossier <W:\BIOLOGIE\Biochimie\BIOCHIMIE\RIA\CatU+DMU - LC MSMS\Technique\Traçabilité CatU\Réactifs>

REDACTEUR(S)	VERIFICATEUR(S)	APPROBATEUR(S)	Date d'application
Lucie DE OLIVEIRA (Technicien de laboratoire - PHU 07 - Biologie\Biochimie\Hormonologie)	Botum kalyane BACH (Biologiste - PHU 07 - Biologie\Biochimie)	Nolwenn GRAVELINE (Biologiste - PHU 07 - Biologie\Biochimie)	07/03/2019

3.1.1 Préparation du complexant :

Produits : Poudre de 2-Aminoéthyl-diphenylborinate (conservation à -20°C, congélateur : 7180-RI-237C)
Eau ultra pure Véolia
Méthanol Fluka pour HPLC LC-MS grade VWR (à prendre en pharmacie)
Hydroxyde d'ammonium 5% (5mL de NH₄OH 30%(tiroir à solvants labo) + 25mL d'H₂O ultra pure)

Préparation :

- J -1 de la technique : Dans un bécher de 250mL, 400 mg de 2-Aminoéthyl-diphenylborinate + 20mL de MeOH + 180mL H₂O ultra pure.

Protéger de la lumière en l'enveloppant totalement avec de l'alu. Ne pas utiliser de parafilm.

Poudre de 2-Aminoéthyl-diphenylborinate très peu soluble, **mettre à agiter toute la nuit pour dissolution.**

- J 0 : Ajuster le pH de la solution à pH 9.5 avec de l'hydroxyde d'ammonium 5% (pHmètre de pharmacologie)

Stabilité, conservation : 1 mois à l'abri de la lumière, à 4°C (réfrigérateur 7180-RI-230R).

Vérifier le pH avant chaque utilisation (papier pH).

3.1.2 Reconstitution des calibrateurs :

Produits : Solution de calibration Biogenic Amines Biorad (conservation à +4°C, réfrigérateur 7180-RI-230R)
Solution d'HCl 6N (dilution au 1/2 de la solution pure = 12N, armoire à acides pièce réactifs Biochimie)
Solution d'HCl 0.05N (417µL de HCl 6N dans 50mL d'H₂O ultra pure)

Préparation : Avant la reconstitution, laisser le calibrateur pendant 10min à T° ambiante. Reprendre un flacon par 10mL d'HCl 0.05N. Temps de reprise : 10 min tout en remuant occasionnellement. Réaliser 8 aliquots de 1,2mL dans des tubes en verre.

Stabilité, conservation : 2 mois-20°C (congélateur : 7180-RI-237C)

3.1.3 Reconstitution des contrôles internes :

Produits : Contrôles Biorad (2 niveaux)
Solution d'HCl 0.05 N

Préparation : Reprendre les contrôles par 10 mL d'HCl 0.05N. Temps de reprise : 15 min, puis réaliser des aliquots de 1mL dans des tubes en verres.

Stabilité, conservation : 2 mois-20°C (congélateur : 7180-RI-237C)

Commandes effectuées pour 1 an (9250-MO-287). Penser à anticiper la période probatoire chaque fin d'année.

3.1.4 Préparation des Standards Internes Deutérés (0.1g/L) :

Produits : D3-Epinéphrine
D6-Norépinéphrine
D4-Dopamine
D3-Métanéphrine
D3-Normétanéphrine
D4-3-Méthoxy Thyramine

- Transférer les ampoules dans des vials en verre.
- Coller l'étiquette de l'ampoule sur le vial.

- Remplir le tableau de traçabilité (date d'ouverture et de fin). **Chemin du fichier Excel:** [RIA/Catu+DMU-LC MSMS/Technique/Traçabilité/Réactifs/Deutérés CATECHO U.xlsx](#)
- A conserver à -80°C

3.1.5 Préparation des phases mobiles :

Produits : H2O ultra pure Véolia

Méthanol Fluka pour HPLC LC-MS grade VWR (à prendre en pharmaco)

Acide formique 0.1% (Armoire à acides N°18 en Pharmaco)

Phase mobile : (Utilisation d'une fiole) **Aucune filtration nécessaire.**

Pour 500mL : - 490mL d'H2O ultra pure

- 10mL de méthanol

- 1.2mL d'acide formique

Pour 250mL : - 245mL d'H2O ultra pure

- 5mL de méthanol

- 0.65mL d'acide formique

Solution de rinçage post run : Eau / MeOH (50 :50)

Stabilité, conservation : phase mobile 1 semaine à 4°C (réfrigérateur 7180-RI-230R) – rinçage 3 mois à T° ambiante.

3.2 Mode opératoire – préparation

Sortir les réactifs du réfrigérateur et du congélateur au moins 30min avant pour les ramener à T° ambiante. Mettre le complexant à agiter.

Pour lancer la technique, décongeler : - 2 tubes de calibrateurs

- 2 aliquots de contrôle B1

- 1 aliquot de contrôle B2 à diluer au 1/3 (**ajouter 2mL d'HCl 0.05N une fois décongelé**).

3.2.1 Préambule, prétraitement des échantillons et renseignements importants :

Les urines du patient sont recueillies sur 24h, puis acidifiées à réception. Pour l'interprétation de la technique, il est important de connaître la diurèse, le pH après acidification et le taux de créatinine urinaire.

Générer la feuille de travail sur DxLab : Document de travail → Générer feuilles → sélectionner 3592-CATECHO U → puis générer (roue à droite)

Créer sur ValDeb [9250-MO-005 Val Deb Séries: gestion des feuilles de travail](#)

3.2.2 Préparation des solutions d'étalons internes (deutérés) :

Sortir les vials de deutérés 15 à 20 min avant la préparation.

Utiliser un tube de 15mL en verre et mettre le volume de deutérés nécessaire.

Volumes à adapter en fonction du nombre de tubes à doser (gamme + contrôles + patients) → se reporter au tableau ci-dessous (en µL).

Analytes	Nb total de tubes			
	15	20	30	40
Norépinéphrine D6	100	150	200	250
Epinéphrine D6	10	15	20	25
Normétanéphrine D3	20	30	40	50
Dopamine D4	40	60	80	100
Métanéphrine D3	20	30	40	50
3-Méthoxy Thyramine D4	20	30	40	50
Méthanol	1790	2685	3580	4475
Volume total du mix	2000	3000	4000	5000

3.2.3 Préparation de la gamme de calibration :

Gamme	G6	G5	G4	G3	G2	G1	G0
Sol à transférer en mL	(G)	(G)	(G5)	(G4)	(G3)	(G2)	/
	1	1,2	1,2	1,2	1,2	1,2	
HCl 0,05N en mL		1,2	1,2	1,2	1,2	1,2	1

3.2.4 Traitement de l'ensemble des tubes (gamme-contrôles-échantillons) :

NB : Il est nécessaire de passer les urines échantillons pures et diluées au 1/10 et au 1/20.

-1/10 : 100µL d'urine + 900µL H₂O Ultra pure

-1/20 : 50µL d'urine + 950µL H₂O Ultra pure

- **Transférer, dans des tubes en verre de 5mL :**
 - 1000 µL de chaque point de gamme / urines / contrôles début et fin de série
 - + 100 µL de solution d'étalons internes deutérés (**combitip vert**)
 - + 1600 µL de complexant (**combitip orange**).
- **Vortexer** énergiquement au moins 60 sec.
- **Ajuster** le pH à 9.5 sous la hotte avec de l'hydroxyde d'ammonium 5%, noter le volume ajouté si celui-ci dépasse 50µL. CF annexe page 5 pour les volumes de NH₄OH.
- **Vortexer** énergiquement au moins 60 sec.
- **Ajouter**, sous la hotte, 1500µL d'acétate d'éthyle pour HPLC (tiroir à solvants labo ou armoire à solvants pièce réactifs Biochimie).
- **Vortexer** énergiquement au moins 60 sec.
- **Centrifuger** 5min, 2000 G à 4°C, à répéter si le surnageant n'est pas bien séparé (programme 1 centri Jouan)
- **Mettre** 800µL de surnageant dans de nouveaux tubes en verre de 5mL.
- **Evaporer** avec le vacuum à 37°C (environ 15min).
- **Reprendre** l'extrait par 200µL de phase mobile (**Combitip bleu**).
- **Vortexer**.
- **Centrifuger** 5min, 2000 G à 4°C (programme 1 centri Jouan).
- **Transférer** 150µL (en évitant les dépôts) dans des vials en plastique, ne pas laisser de bulle d'air. Penser à faire un vial supplémentaire en verre de blanc (Méthanol).

3.3 Passage sur la LC-MS-MS**3.3.1 Paramétrage :**

- **Hardware configuration :** 5500QTRAP+Shimadzu 2D
- **Projet :** Catéchos UAnnée
- **Méthode d'acquisition :** Catechos urinaires scheduled.dam
- **Batch :** Import depuis ValDeb : [9250-MO-299](#) ou Catechos U type.dab
- **Volume de prise d'échantillon :** 5µL
- **Temps de run :** 5 à 8 min
- **Température du four à colonne :** 30°C
- **Pompe A voie B :** phase mobile
- **Pompe A voie C :** rinçage

3.3.2 Amorçage, équilibré :

Amorçage : [9250-MO-312 « Amorçage des phases en LCMSMS »](#)

Equilibré : [9250-MO-321](#)

3.3.3 Rinçage :

- Placer les 2 voies dans les solutions de rinçage (50/50 H₂O/MeOH)

- Amorcer de la même façon que pour les phases.
- Equilibrate (choisir « Rinçage Catechos urinaires »).
- Lancer deux blancs MeOH.

3.4 Résultats

Lors de la quantification : rendre les transitions n°1 **sauf** pour l'épinéphrine, rendre transition n°3

Résultats sur Dxlab : si le résultat est inférieur à la limite de quantification, Dxlab joue une règle automatique pour convertir le résultat.

Penser à remplir le tableau de traçabilité des temps de rétention pour chaque paramètre : [RIA/Catu+DMU-LC MSMS/Technique/Temps de rétention.xlsx](#)

Annexe 2 : Fiches d'information, de consentement et de prélèvement à l'attention des sujets sains pour définition des intervalles de référence.

Annexe 2A : Fiche d'information

Fiche d'information

Avant le prélèvement

- REGIME ALIMENTAIRE : éviter dans les 48 heures précédant le prélèvement la consommation de **banane, chocolat, fruits secs, agrumes, avocat, tomate, prune, kiwi, ananas, mollusques** et **vanille** ; et consommation modérée de **café** et de **thé**.

Pendant le prélèvement :

- Pour les adultes, l'analyse est réalisée sur les urines de 24 heures.
- Conserver les urines à température ambiante entre chaque recueil.

Après le prélèvement :

- Envoyer rapidement au laboratoire.

Annexe 2B : Fiche de consentement

**LABORATOIRE DE BIOCHIMIE
UNITE HORMONOLOGIE ET RADIO-IMMUNOANALYSES
HOTEL DIEU**

CONSENTEMENT ECLAIRE

Prendre connaissance de la fiche d'information avant de signer le consentement.

Je soussigné(e) _____, donne mon accord pour un prélèvement urinaire en vue de réaliser les intervalles de référence pour le dosage des catécholamines, dérivés méthoxylés, VMA et HVA urinaires, réalisé au laboratoire de Biochimie-Hormonologie du CHU de Nantes.

Le dosage de ces paramètres permet de faire le diagnostic biologique et le suivi des phéochromocytomes et neuroblastomes.

J'affirme ne pas faire d'hypertension artérielle et j'affirme ne pas prendre de médicaments ou drogues, figurant entre parenthèses, pouvant fausser les résultats des dosages (anti-dépresseurs et anxiolytiques, Sotalol, Labetalol, Ventoline (Salbutamol), Terbutaline, Levodopa, α -Méthyldopa, Sulfasalazine, Phénoxybenzamine, cocaïne, amphétamines, prise de Paracétamol ou Efferalgan il y a moins de 24 heures).

Fait à Nantes, le

Annexe 2C : Fiche de prélèvement**Fiche de prélèvement****Catécholamines et Dérivés Méthoxylés urinaires****Etablissement des valeurs de référence**

A compléter et à rendre avec la fiche de consentement et le recueil urinaire

A envoyer au centre de tri des laboratoires pour le laboratoire de Biochimie (UF 3592 Hormonologie et Radiolmmuno-Analyses)

Contacts: Alizée VIOLIN (84147) / Kalyane BACH (84005) / Nolwenn GRAVELINE (82338)

Initiales (merci d'indiquer les deux premières lettres de votre nom et les deux premières lettres de votre prénom) :

Sexe :

Date de naissance :

Poids :

Taille :

Régime alimentaire (merci d'entourer les aliments ou boissons consommés dans les 48 heures précédant le prélèvement ainsi que de préciser la fréquence à laquelle vous les consommez) :

Bananes

Chocolat

Fruits secs

Agrumes

Avocats

Tomates

Prunes

Kiwis

Ananas

Mollusques

Vanille

Café

Thé

Annexe 3 : Utilisation du logiciel Analyst dans le cadre du dosage des catécholamines et des dérivés méthoxylés libres urinaires par LC-MS/MS.

	MODE OPERATOIRE EN PREPARATION <Ne pas modifier>	Diffusion par : <Ne pas modifier>	<Ne pas modifier>
	Processus : <Ne pas modifier>	Page 1 / 5	V. <Ne pas modifier>

1. OBJECTIFS

Ce document présente et décrit l'utilisation du logiciel Analyst utilisé sur la plateforme MS/MS.

2. DOMAINE D'APPLICATION

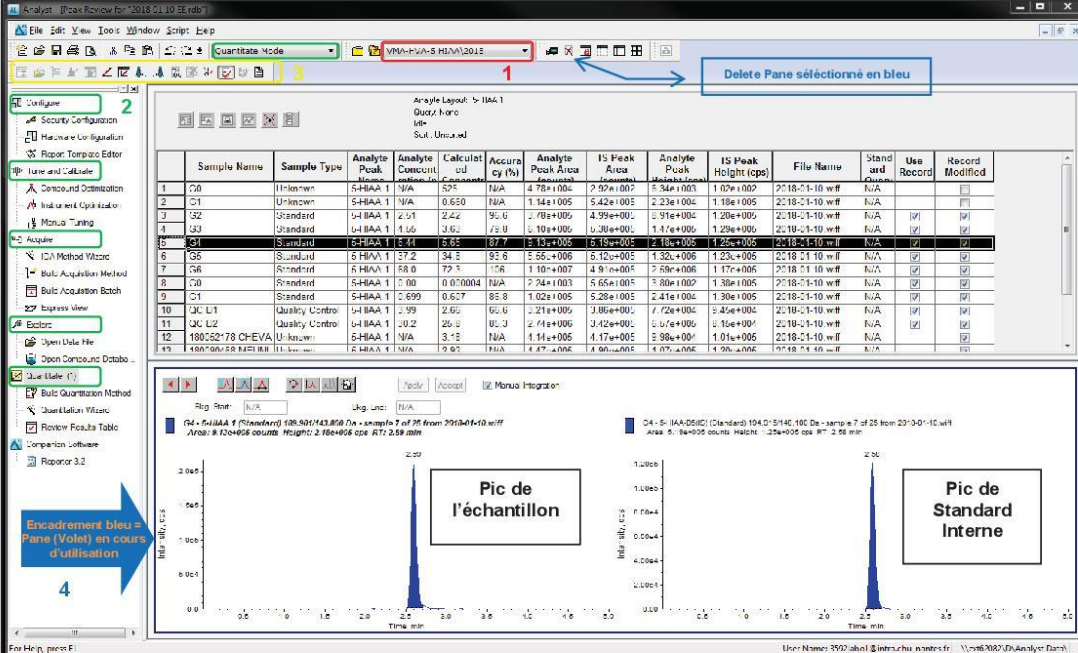
Le(s) secteur(s) concerné(s) est(ont) :
<Ne pas modifier>.

Le logiciel sert d'interface pour piloter les spectromètres de masse. Le logiciel ValDeb permet la connexion entre DxLab et Analyst pour les résultats patients et CQ (URT).

3. DESCRIPTION

1. PRESENTATION GENERALE

Le logiciel fonctionne par « Bloc ». Sélectionner en premier le projet puis le mode en fonction du but recherché.



The screenshot displays the Analyst software interface. At the top, there is a menu bar and a toolbar. Below the toolbar, a table lists sample data. The table has columns for Sample Name, Sample Type, Analyte Peak, Analyte Concentration, Calculated Concentration, Accuracy (%), Peak Area, IS Peak Area, IS Peak Height (cps), File Name, Standard Curve, Use Record, and Record Modified. Below the table, there are two chromatograms. The left chromatogram is labeled 'Pic de l'échantillon' and the right one is labeled 'Pic de Standard Interne'. There are numbered callouts (1, 2, 3, 4) pointing to specific elements in the interface: 1 points to the project selection dropdown, 2 points to the configuration panel on the left, 3 points to the 'Delete Pane sélectionné en bleu' button, and 4 points to the 'Encadrement bleu = Pane (Violet) en cours d'utilisation' button.

❖ 1 : Projet :

Sélectionner le projet sur lequel on souhaite travailler dans le menu déroulant

NB : Sur les PC de retraitement, choisir en premier la masse adéquate dans Tools → Project → Set Root Directory → Masse X → OK

Sur le Pc de la masse 1, dans Set Root Directory double cliquer sur DATA(D :), sélectionner Analyst Data, OK pour retrouver les projets de la masse 1

REDACTEUR(S)	VERIFICATEUR(S)	APPROBATEUR(S)	Date d'application
<Ne pas modifier>	<Ne pas modifier>	<Ne pas modifier>	<Ne pas modifier>

Il y a un projet par an pour chaque série d'analyses. Chaque année, cliquer sur « Copy Subproject » et mettre la nouvelle année en « Target Subproject » puis Copy.

❖ 2 : Mode

La sélection du mode de travail influence directement la présentation du logiciel : les **icônes (3)** et **volets (4)** accessibles varient suivant que l'on se trouve en « Acquire » « Explore » ou « Quantitate ».

L'exemple ci-contre présente le mode « Quantitate » avec accès aux icônes de visualisation de la courbe d'étalonnage.

NB : Il est possible de passer d'un **Projet** à un autre sans entraver celui déjà ouvert.






❖ 3 : Barre d'icônes

Cette barre ne présente pas les mêmes icônes suivant le **Mode** dans lequel on se trouve.

- **Mode « Acquire »**

C'est le mode dans lequel on se place pour lancer la série



-  **View Queue** : Permet de voir l'ordre dans lequel vont être pipeté les échantillons
-  **Start Sample** : Pour démarrer le pipetage dans les vials (grisé tant que l'appareil n'est pas prêt)
-  **Equilibrate** : Met la colonne et l'HPLC dans les conditions de pression et températures définies dans la méthode d'acquisition
-  **StandBy** : Pour quitter les conditions d'équilibre et tout remettre à zéro
-  **Tune** : Si cet icône est activée, il n'est pas possible de lancer l'équilibrage. Cliquer pour désactiver

- **Mode « Explore »**

Permet de visualiser les tracés brutes sans retraitement ni quantification.



Dans ce mode on utilise surtout les flèches ←→ pour passer d'un échantillon à l'autre lorsque l'on visualise les tracés brutes. La troisième flèche ↷ permet d'afficher la liste entière des tracés disponibles.

Pour observer les tracés « en direct », double cliquer sur Open Data File et sélectionner le tracé voulu.



Pour ne voir qu'un ou deux composés en particulier, faire *clic droit* sur le graphe, *Extract Ions* et sélectionner le composé à étudier, Ok

En double cliquant sur un pic, son spectre de masse s'affiche.

- **Mode « Quantitate »**

C'est dans ce mode que l'on va retraiter les résultats bruts de l'appareil en quantifiant notre composé à l'aide de son deutéré.



-  **Add/Remove Sample** : Pour ajouter ou supprimer des échantillons dans le fichier de quantification
-  **Calibration Pane** : Permet d'ouvrir le volet de visualisation de la courbe d'étalonnage

- **Mode « Companion Software »**

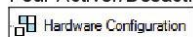
L'outil  Reporter 3.2 de ce mode permet de créer un rapport de résultats exploitable sur Valdeb.

2. LANCER UNE SERIE

- Préparer les phases si besoin
- S'assurer que l'appareil est disponible

- Créer la liste de travail *par demande* sur ValSerie ([9250-MO-005 « ValDeb Séries : gestion des feuilles de travail »](#)) et piloter (pas besoin de sélectionner l'appareil, attention à piloter et réceptionner sur le même PC)
- Ouvrir Analyst sur le PC relié à la masse
- Réaliser le montage avec la/les colonne(s) et phase(s) en fonction de la technique
- Amorcer les phases en suivant [9250-MO-3213 « Amorçage des phases en LC/MSMS »](#)
 - △ Attention : - MS 4 : aucun profil ne doit être activé en **Hardware Configuration**
 - MS 1 : Le profil peut déjà être activé pour l'amorçage.

Pour Activer/Désactiver un Profil (=communication active entre Analyst et la masse): double cliquer sur



Hardware Configuration, sélectionner le bon profil (cf MO de la technique en question) et cliquer sur « Activate Profil » (ou « Deactivate Profil») pour que les modules HPLC et la MSMS soient reconnus et activés.

- Ouvrir la méthode d'acquisition .dam:
 - File
 - Open
 - Files of types : Acquisition Method (*.dam)
- Créer le Batch .dab en important la liste de travail de Valdeb :
 - Dans le Mode « Acquire » : **Build Acquisition Batch**
 - Clic droit dans la fenêtre puis **Import From**
 - File
 - Look In: data (\Witan\Analyst)\B:
 - Type of file: Microsoft Text Driver (*.txt, *.csv)
 - Final Reports
 - Choisir la bonne liste au format *NOM DE LA SERIE_JJ-MM-AAAA_01.txt*
 - Open
 - Select AutoSampler :
 - MS 1 et 2 : Agilent 1200 G1367B
 - MS 3 : Agilent 1200 G1367C
 - MS 4 : ShimadzuSIL_20ACXR
 - Ok

- Dans l'onglet **Sample** ① : pour ajouter des CQ ou échantillons, cliquer sur **Add Samples** et renseigner le nombre de lignes souhaitées dans *New Samples*.
- Faire un copier/coller des premiers CQ si ce sont les mêmes à la fin et incrémenter la colonne « *Vial Position* » (clic droit, *AutoIncrement*)
- Dans la colonne Data File faire clic droit puis *Fill Down*
- Cliquer sur l'onglet **Quantitation** ② : copier/coller les lignes des CQ du début sur les CQ de fin pour faciliter l'intégration finale

Sample	Locations	Quantitation	Submit								
1	t	SET1		Quant Method: DERIVES METHOXYLES.qmf							
Sample Name	Quant Type	VMA-D3	HVA-D5	5-HIAA-D5	VMA 1	VMA 2	HVA 1	HVA 2	5-HIAA 1	5-HIAA 2	
1	MeOH	Unknown	0.000000	0.000000	0.000000	0.000000	0.000000	0.000000	0.000000	0.000000	
2	G0	Standard	0.000000	0.000000	0.000000	0.000000	0.000000	0.000000	0.000000	0.000000	
3	G6	Standard	0.000000	0.000000	0.000000	77.300000	77.300000	119.000000	119.000000	68.000000	
4	QC B1	QC	0.000000	0.000000	0.000000	3.320000	3.320000	3.450000	3.450000	3.450000	
5	QC B2	QC	0.000000	0.000000	0.000000	15.700000	15.700000	17.860000	17.860000	17.860000	
6	123 patient	Unknown	0.000000	0.000000	0.000000	0.000000	0.000000	0.000000	0.000000	0.000000	
7	QC B1	Unknown	0.000000	0.000000	0.000000	0.000000	0.000000	0.000000	0.000000	0.000000	
8	QC B2	Unknown	0.000000	0.000000	0.000000	0.000000	0.000000	0.000000	0.000000	0.000000	

Copier/coller pour faciliter l'intégration finale

- Dans l'onglet **Submit** ③ : soumettre les échantillons dans l'ordre de passage souhaité. De façon générale :
 - ❖ 4 Méthanols
 - ❖ Gamme
 - ❖ 1 Méthanol
 - ❖ CQ – Echantillons – CQ
 - ❖ 2 Méthanols

- Vérifier la liste soumise en *View Queue*


- Placer les vials en fonction de la liste de travail

- Lancer « EQUILIBRATE » suivant le mode opératoire [9250-MO-321 « LC MS-MS : équilibrage des masses »](#) (durée : 30 minutes)

Ⓢ Vérifier la bonne montée en pression des différentes voies (sinon vérifier les fuites ou ré amorcer les phases)

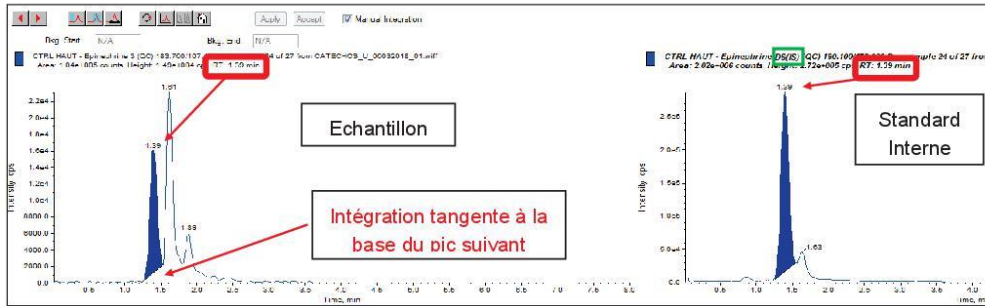
Lorsque les voyants en bas à droite sont vert, cliquer sur Start Sample

3. INTEGRER LES RESULTATS

- Dans le mode *Quantitate*, Double cliquer sur **Quantitation Wizard** 
- Dans la première colonne, sélectionner le fichier *.wiff* sur lequel on souhaite travailler
- Dans la seconde colonne, sélectionner les échantillons puis cliquer sur la flèche => pour les passer dans la troisième colonne
- Next
- Setting to Use: Sélectionner la méthode de quantification adéquate
- Next
- Choose Existing Method: Sélectionner la méthode adéquate
- Finish

Une fenêtre s'ouvre permettant de voir les courbes d'intensité du signal (en coups par secondes) en fonction du temps (Cf page 1):

- ✓ Commencer par regarder la courbe de droite qui correspond à l'Etalon Interne.
- ✓ Vérifier le temps de rétention par rapport au temps attendu ainsi que l'air sous la courbe qui doit être constant d'un échantillon à l'autre (colonne *Analyt peak area (counts)*)
- ✓ Regarder ensuite à gauche les courbes des échantillons, gammes et CQ :
 1. **Ceux-ci doivent avoir le même temps de rétention que l'Etalon Interne**
 2. **L'intégration doit être identique à celle de l'étalon interne**
 3. **Si un pic « traîne » ou est confondu avec un deuxième composé, l'intégration doit se faire en coupant à la jonction des deux pics plutôt qu'à la base du graphe.**



- Paramètres d'intégration automatique

Pour intégrer un pic automatiquement, sélectionner la zone d'intérêt sur le chromatogramme puis cliquer sur .

Si l'intégration est mal réalisée par le logiciel, vérifier la configuration ainsi :

Cliquer 2 fois sur **Show or Hide Parameters**  pour faire apparaître les paramètres d'intégration.

- Le Noise Percent doit être à 90%
- Le Base Sub Window à 0,30 min
- Le Peak-Splitting Factor à 2

Ces paramètres favorisent grandement l'intégration automatique des pics par Analyst.

Cliquer une nouvelle fois sur la flèche pour masquer les paramètres.

Si l'intégration n'est toujours pas satisfaisante, il est possible de la faire manuellement.

- Intégration manuelle des pics

Cliquer sur , cliquer à la base du pic que l'on veut intégrer puis aller jusqu'à l'autre point souhaité et recliquer pour définir la zone à intégrer.

Cliquer sur « Accept » pour valider l'intégration.

Il est parfois nécessaire de passer à un autre échantillon pour que les valeurs se mettent à jour dans le tableau.

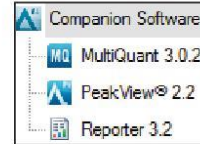
Une fois tout intégrer, enregistrer le fichier de résultats dans File, Save as : **ANNEE MM JJ Initiales**

4. EXPORT DES RESULTATS SUR VALDEB

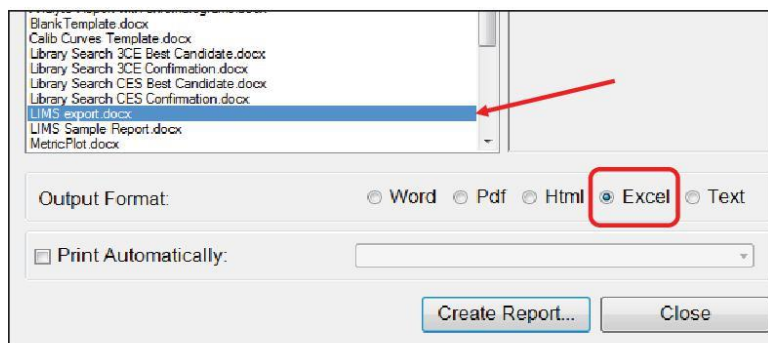
Une fois la série intégrée, il faut exporter les résultats vers Valdeb.

NB : On peut retrouver une série déjà intégrée en double cliquant sur « Review Results Table »

Double cliquer sur  Reporter 3.2



Une fenêtre s'ouvre : sélectionner **LIMS export.docx** et le format **Excel** :



- Create Report
- Donner un nom au fichier d'export : **AAAA MM JJ Initiales MANIP**
- Enregistrer

Un tableau Excel s'ouvre, ne rien y modifier et le fermer. Cette action exporte les données vers ValDeb.

5. CHANGEMENT DE LOT DE GAMMES ET CQI

Lors d'un changement de lot de gamme ou CQI, les modifications de valeurs sont à réaliser via les fichiers de Valdeb en suivant le document [9205-MO-249 « Changement de lot de CQI pour les paramètres LCMSMS gérés par Valdeb et URT »](#).

Les valeurs dans Analyst se mettront alors à jour automatiquement.

Annexe 4 : Reproductibilité. Coefficients de variation pour chaque catécholamine et dérivé méthoxylé urinaires aux deux niveaux de contrôle au cours de l'année 2017.

	CV contrôle 1 (%)	CV contrôle 2 (%)
Dopamine	12,5	11,2
Norépinéphrine	11,1	10,0
Epinéphrine	14,4	15,0
3-Méthoxytyramine	9,6	7,2
Normétanéphrine	6,2	4,9
Métanéphrine	7,1	5,0

Annexe 5 : Limites de quantification. Résultats obtenus après dilutions du point de gamme n°2, G2.

n=10	Dopamine				Norépinéphrine				Epinéphrine			
	pur	1/2	1/4	1/8	pur	1/2	1/4	1/8	pur	1/2	1/4	1/8
m (µg/L)	19,1	9,5	4,6	2,3	13,6	6,6	3,3	1,7	6,1	3,0	1,5	0,7
CV (%)	2,9	2,8	3,9	6,0	1,6	1,9	3,7	4,3	2,3	2,9	6,0	6,6

n=10	3-Méthoxytyramine				Normétanéphrine				Métanéphrine			
	pur	1/2	1/4	1/8	pur	1/2	1/4	1/8	pur	1/2	1/4	1/8
m (µg/L)	21,4	10,4	5,1	2,4	52,4	26,1	12,8	6,4	25,0	12,6	6,1	3,0
CV (%)	2,1	1,9	1,8	2,9	2,0	2,6	2,3	3,4	0,8	1,0	1,4	2,1

m = moyenne ; CV = coefficient de variation

Annexe 6 : Linéarité. Concentrations obtenues après cinq dosages successifs de chaque point de gamme.

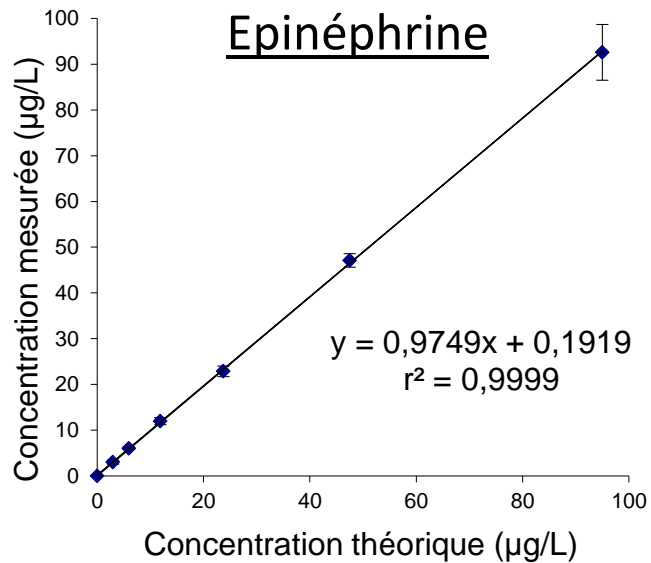
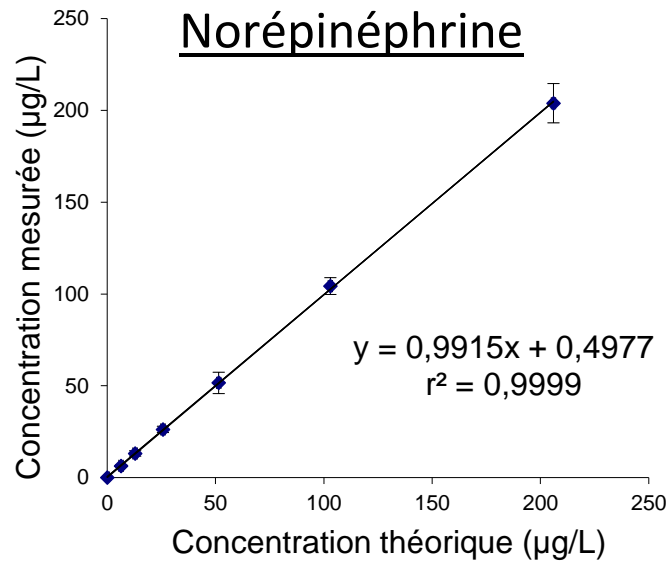
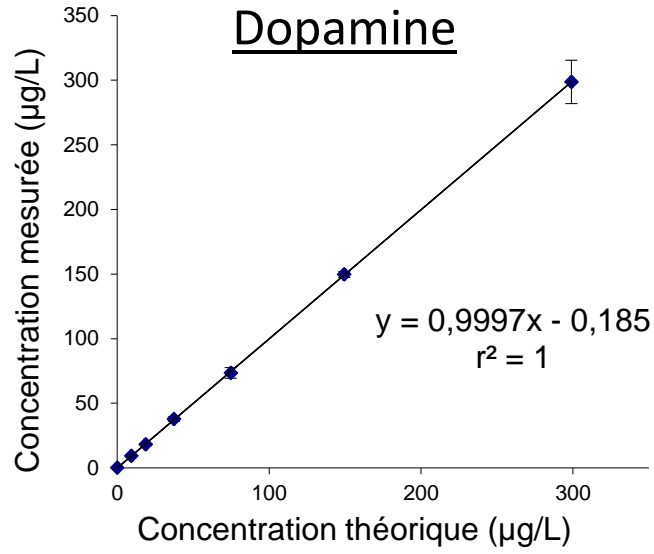
µg/L	Dopamine	Norépinéphrine	Epinéphrine	3-Méthoxytyramine	Normétanéphrine	Métanéphrine
G0	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
G0	0,03	0,01	0,02	0,01	0,01	0,00
G0	0,00	0,01	0,00	0,00	0,02	0,01
G0	0,02	0,01	0,06	0,00	0,01	0,01
G0	0,02	0,01	0,03	0,00	0,01	0,00
G1	9,69	6,23	3,02	10,90	26,07	12,80
G1	9,13	6,34	2,93	10,60	24,95	13,15
G1	8,99	6,12	2,83	10,40	25,20	12,55
G1	9,46	6,33	2,98	10,80	26,00	12,80
G1	8,96	6,84	3,41	10,80	24,97	12,60
G2	17,93	11,95	5,92	20,85	51,30	24,10
G2	18,03	13,20	6,29	21,25	51,43	24,55
G2	18,37	13,80	5,90	21,10	51,87	24,70
G2	18,50	13,15	6,06	21,60	51,87	24,95
G2	18,53	13,65	6,12	21,40	52,70	24,85
G3	38,90	25,70	12,13	42,85	104,67	49,75
G3	37,23	26,70	12,00	42,45	102,33	49,20
G3	38,20	27,55	12,57	44,00	104,67	50,40
G3	36,80	25,40	11,67	42,40	105,67	49,40
G3	37,60	25,95	11,60	42,80	102,33	49,40
G4	70,87	46,85	22,27	80,05	190,67	93,30
G4	72,27	51,80	22,73	86,15	204,33	96,95
G4	74,80	54,85	23,47	85,25	202,67	97,40
G4	73,60	52,40	23,47	86,00	201,67	97,30
G4	76,07	51,95	22,37	86,45	214,00	99,80
G5	149,67	100,55	47,10	170,50	408,00	195,00
G5	151,00	105,00	47,67	169,50	395,33	195,50
G5	150,33	105,50	46,03	175,00	402,33	196,00
G5	149,33	106,50	47,90	174,00	409,00	195,50
G5	148,00	104,00	46,87	173,50	418,00	199,00
G6	310,33	195,00	93,27	346,00	806,67	395,00
G6	298,00	206,50	88,03	349,00	754,33	388,00
G6	297,00	205,50	92,50	348,50	773,00	397,50
G6	301,33	209,00	96,57	364,50	778,33	402,00
G6	287,00	203,50	92,57	363,00	768,67	397,00

Annexe 7 : Linéarité. Concentrations moyennes, écart-types et coefficients de variation obtenus après cinq dosages successifs de chaque point de gamme.

n=5	Dopamine			Norépinéphrine			Epinéphrine		
	m (µg/L)	ET (µg/L)	CV (%)	m (µg/L)	ET (µg/L)	CV (%)	m (µg/L)	ET (µg/L)	CV (%)
G0	0,01	0,01	95,8	0,01	0,01	63,0	0,03	0,03	90,9
G1	9,25	0,32	3,4	6,37	0,28	4,3	3,03	0,22	7,3
G2	18,27	0,28	1,5	13,15	0,73	5,5	6,06	0,16	2,6
G3	37,75	0,82	2,2	26,26	0,87	3,3	11,99	0,39	3,3
G4	73,52	2,05	2,8	51,57	2,91	5,7	22,86	0,58	2,5
G5	149,67	1,13	0,8	104,31	2,29	2,2	47,11	0,74	1,6
G6	298,73	8,40	2,8	203,90	5,35	2,6	92,59	3,05	3,3

n=5	3-Méthoxytyramine			Normétanéphrine			Métanéphrine		
	m (µg/L)	ET (µg/L)	CV (%)	m (µg/L)	ET (µg/L)	CV (%)	m (µg/L)	ET (µg/L)	CV (%)
G0	0,00	0,00	223,6	0,01	0,01	40,0	0,01	0,01	115,5
G1	10,70	0,20	1,9	25,44	0,55	2,2	12,78	0,24	1,9
G2	21,24	0,29	1,4	51,83	0,55	1,1	24,63	0,33	1,4
G3	42,90	0,65	1,5	103,93	1,52	1,5	49,63	0,47	1,0
G4	84,78	2,68	3,2	202,67	8,31	4,1	96,95	2,34	2,4
G5	172,50	2,37	1,4	406,53	8,41	2,1	196,20	1,60	0,8
G6	354,20	8,81	2,5	776,20	19,22	2,5	395,90	5,10	1,3

m = moyenne ; CV = coefficient de variation ; ET = écart-type

Annexe 8 : Linéarité. Droites de calibration des catécholamines urinaires.

Barres d'erreur à plus ou moins deux fois l'écart-type

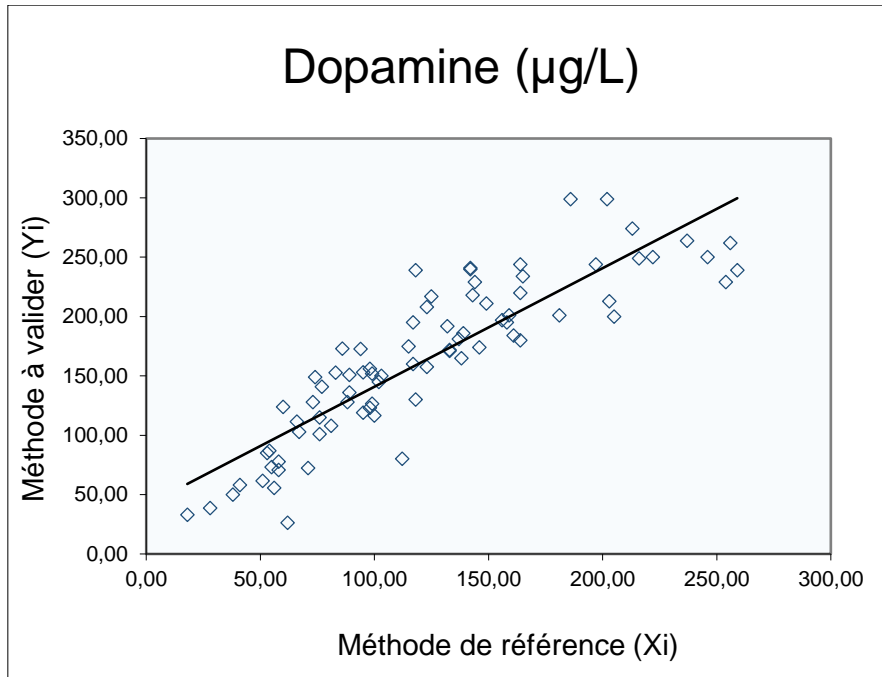
Annexe 9 : Contamination inter-échantillons.

µg/L	Dopamine	Norépinéphrine	Epinéphrine	3-Méthoxytyramine	Normétanéphrine	Métanéphrine
G6	297,7	215,5	94,4	344,5	754	395,5
	294,3	203,5	95,2	357,5	769,7	393,5
	300	211	92,1	361	776	394,5
G1	9,6	6,8	3,2	11,1	27	12,5
	9,4	6,7	2,9	10,8	26,2	12,4
	9,0	6,7	3,0	10,7	26,9	12,5
G6	299	203,5	95,5	344	774	394,5
	298,3	208,5	95,0	349	776,7	395
	294	203,5	96	350	763	391,5
G1	9,2	6,7	3,0	10,5	25,5	12,6
	9,5	6,8	2,9	10,7	27,2	12,3
	9,3	6,9	2,9	11,1	27,1	12,5
G6	293,3	207,5	96,4	340	771,3	390,5
	300,7	205	97,3	361	766,3	398
	302	207,5	96,9	349,5	748	396,5
G1	9,0	6,8	3,2	10,4	26,1	12,6
	9,3	6,7	3,0	10,9	27,8	12,5
	9,5	6,8	2,8	10,9	27,0	12,4
G6	301,7	207,5	91,9	328	737,7	393,5
	303,3	202,5	94,0	359	807,7	404
	302,7	203	93,6	351	757,7	394
G1	9,1	6,7	3,1	10,9	25,7	12,6
	9,0	6,8	3,0	10,9	27,1	12,4
	9,2	6,4	3,0	11,1	27,0	12,6
G6	301	210,5	95,8	339,5	822	392
	300,7	202	92,8	346	781,7	401,5
	304,7	204,5	93,4	361	741	398,5
G1	9,3	6,8	2,9	10,9	26,4	12,4
	9,1	6,8	3,0	11,5	26,0	12,6
	9,2	6,9	2,9	11,1	26,1	13,0

mB1	9,23	6,77	3,06	10,73	26,13	12,52
mB3	9,23	6,74	2,92	10,95	26,83	12,57
mH	299,56	206,43	94,69	349,4	769,78	395,53
Contamination (%)	0,014	0,052	0,002	0,015	0,067	0,047

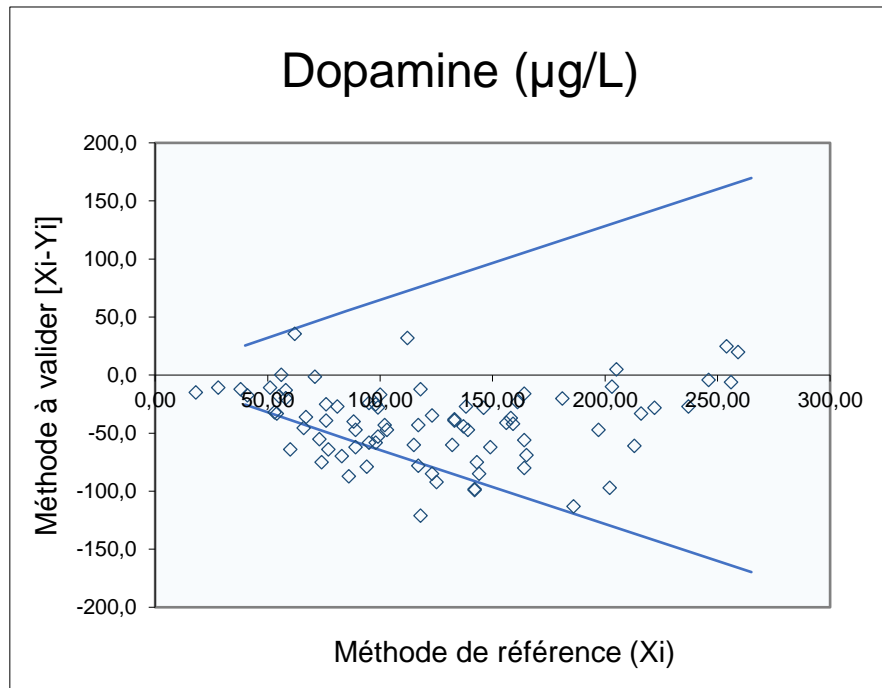
Annexe 10 : Dopamine : comparaison de méthode en concentrations.

Droite de régression de Passing-Bablok :

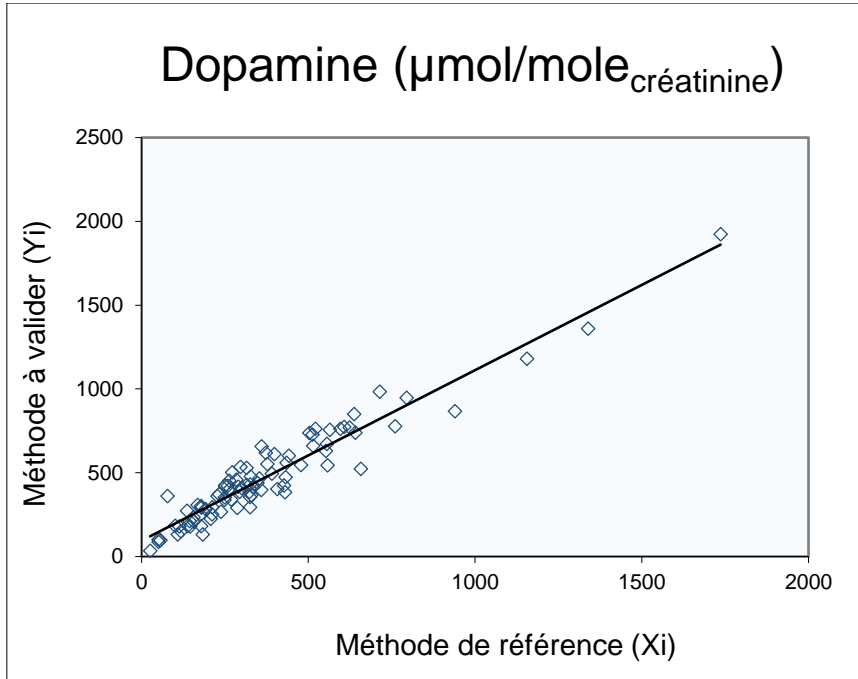


n	80
Equation de la droite	$y = 1x + 41$
r²	0,8744

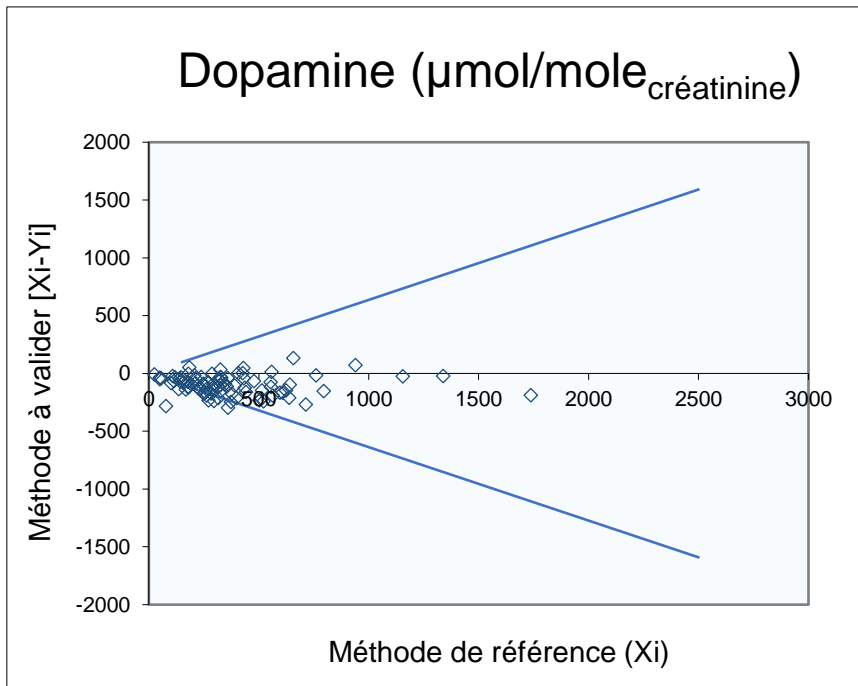
Graphique de Bland-Altman :



n	80
Biais moyen (%)	-40,87

Annexe 11 : Dopamine : comparaison de méthode en quantités.**Droite de régression de Passing-Bablok :**

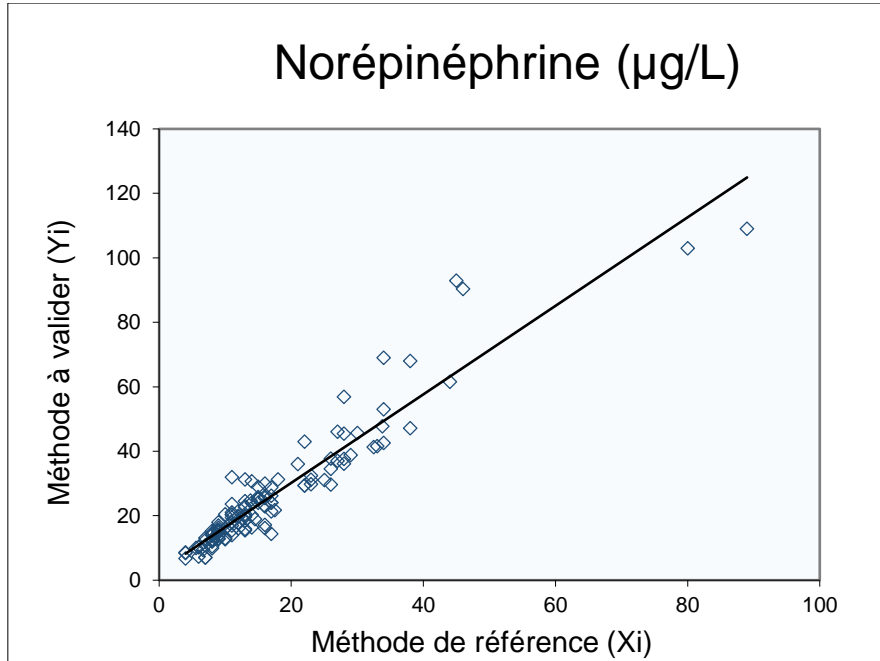
n	88
Equation de la droite	$y = 1,02x + 95,05$
r²	0,9566

Graphique de Bland-Altman :

n	88
Biais moyen (%)	-101,42

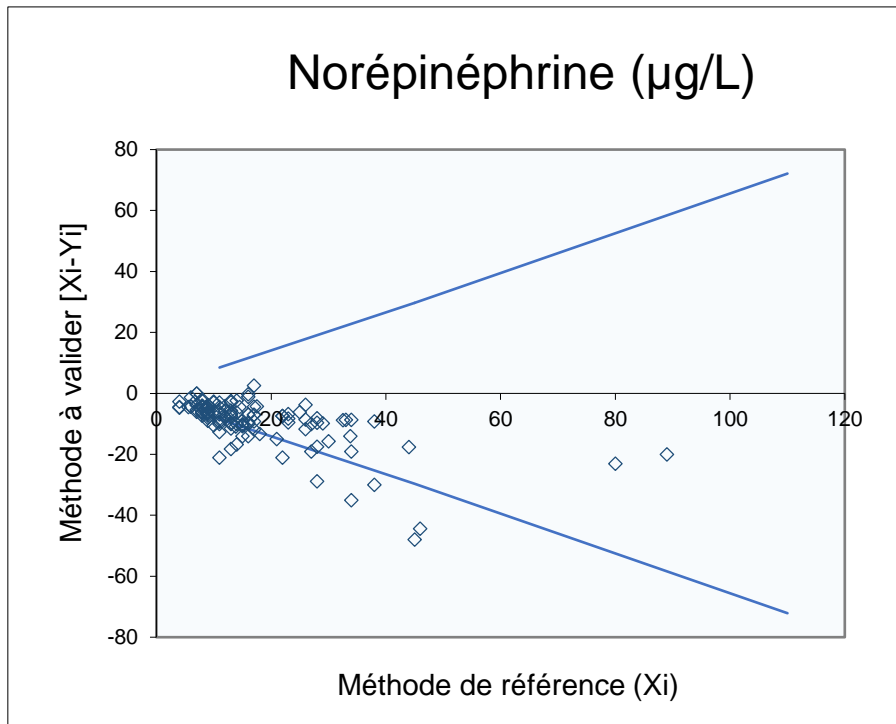
Annexe 12 : Norépinéphrine : comparaison de méthode en concentrations.

Droite de régression de Passing-Bablok :



n	123
Equation de la droite	$y = 1,37x + 2,74$
r^2	0,9452

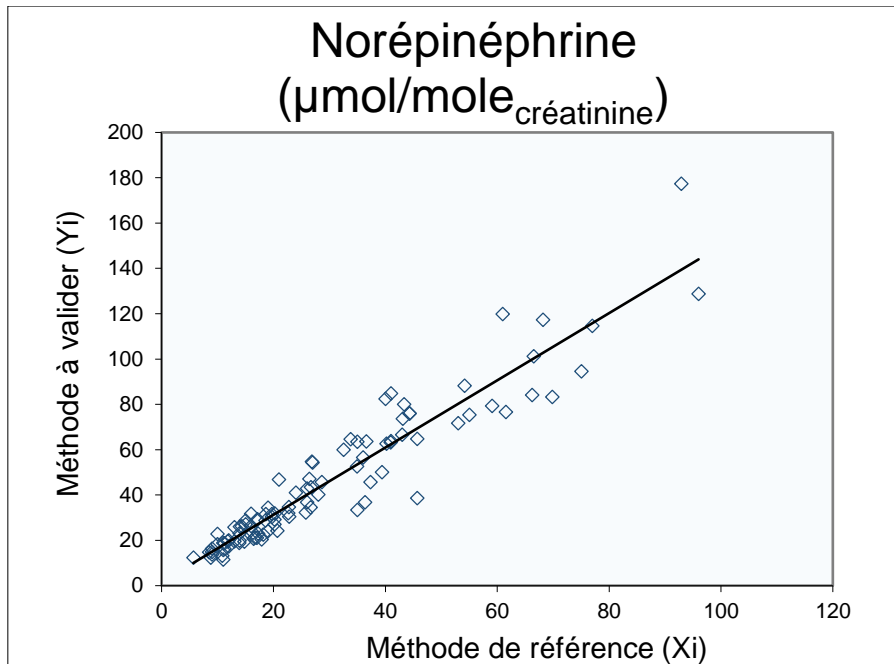
Graphique de Bland-Altman :



n	123
Biais moyen (%)	-9,08

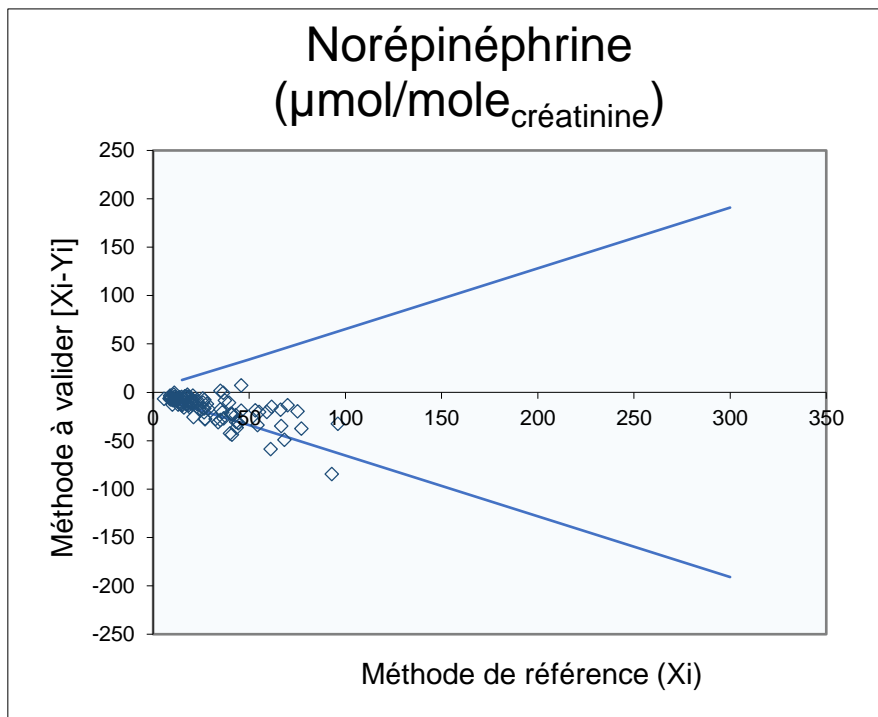
Annexe 13 : Norépinéphrine : comparaison de méthode en quantités.

Droite de régression de Passing-Bablok :



n	99
Equation de la droite	$y = 1,48x + 1,61$
r²	0,9476

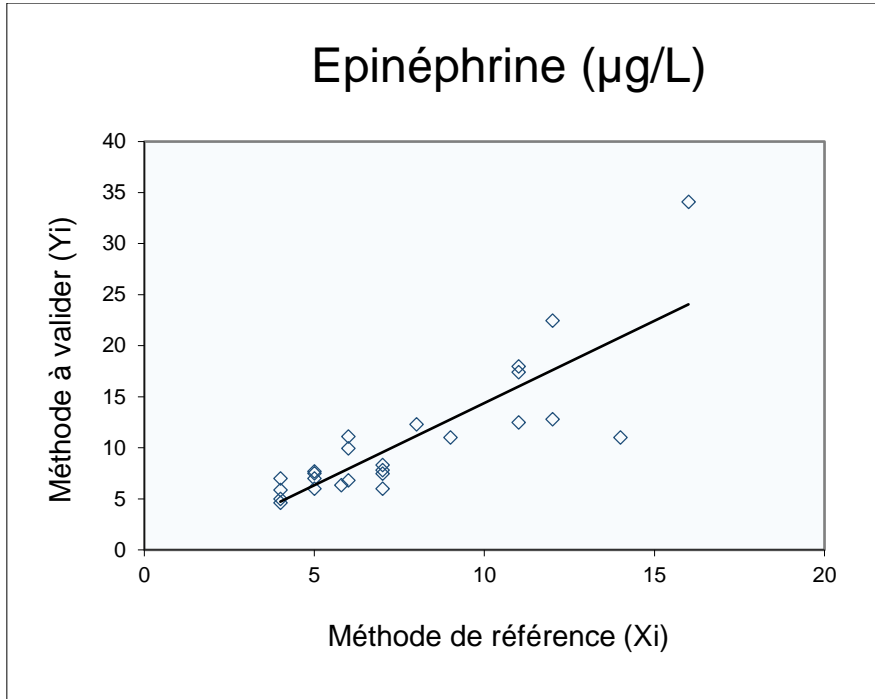
Graphique de Bland-Altman :



n	99
Biais moyen (%)	-15,76

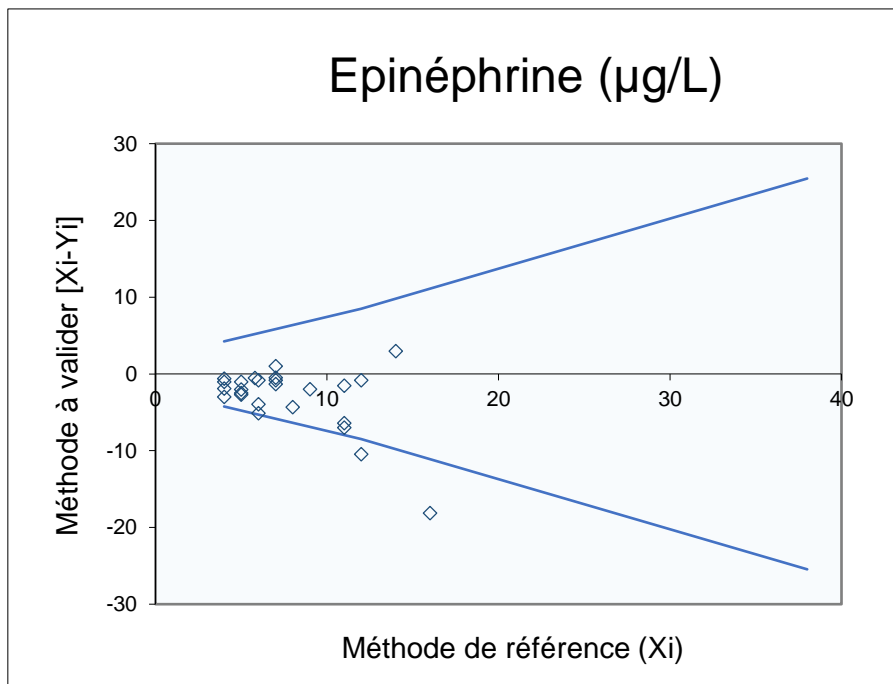
Annexe 14 : Epinéphrine : comparaison de méthodes en concentrations.

Droite de régression de Passing-Bablok :



n	25
Equation de la droite	$y = 1,61x - 1,71$
r²	0,8340

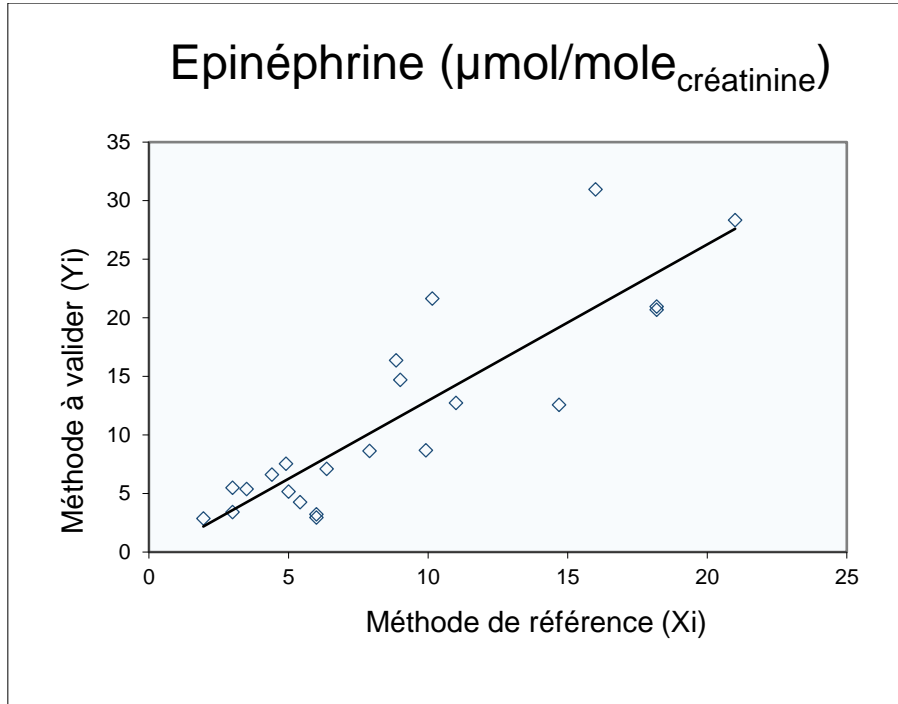
Graphique de Bland-Altman :



n	25
Biais moyen (%)	-2,97

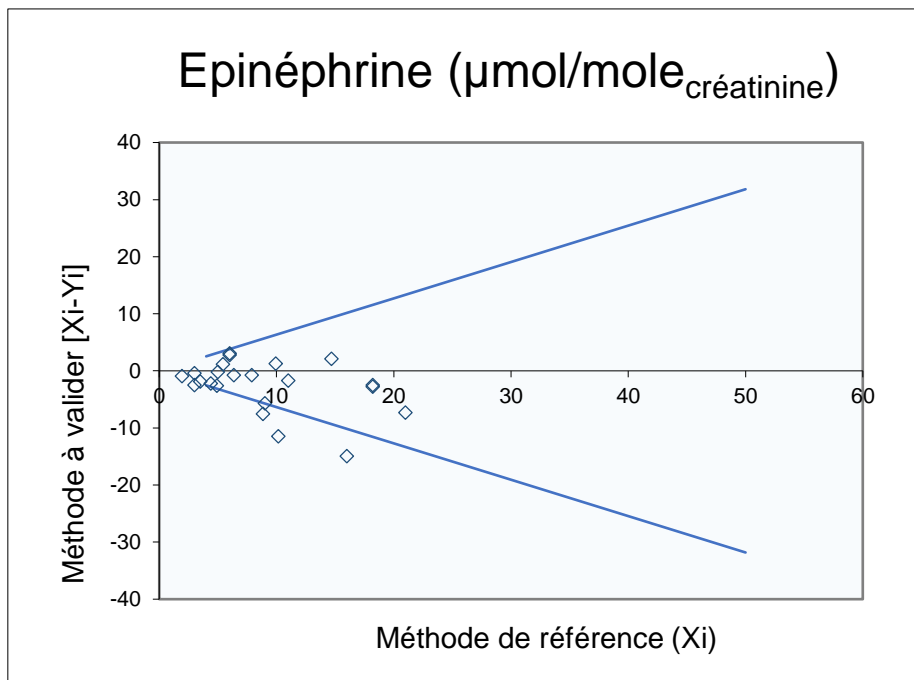
Annexe 15 : Epinéphrine : comparaison de méthodes en quantités.

Droite de régression de Passing-Bablok :



n	22
Equation de la droite	$y = 1,33x - 0,41$
r²	0,8754

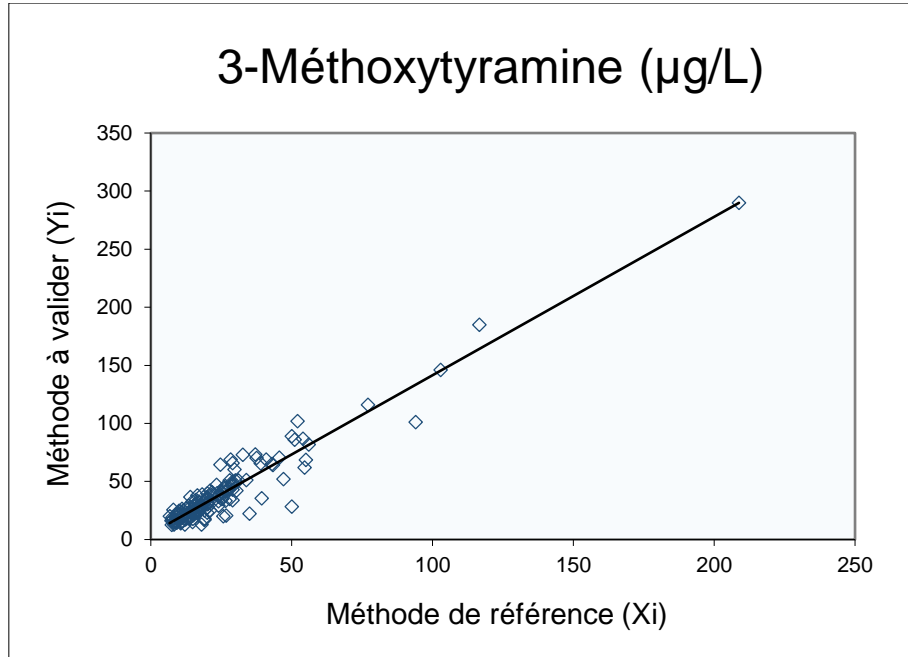
Graphique de Bland-Altman :



n	22
Biais moyen (%)	-2,54

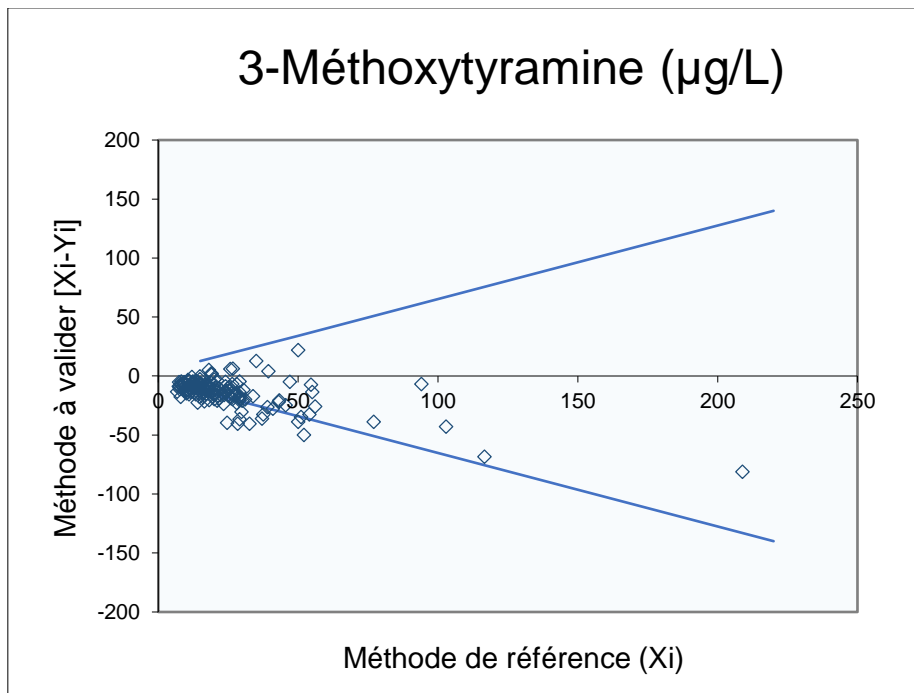
Annexe 16 : 3-Méthoxytyramine : comparaison de méthodes en concentrations.

Droite de régression de Passing-Bablok :



n	162
Equation de la droite	$y = 1,36x + 5,02$
r^2	0,9537

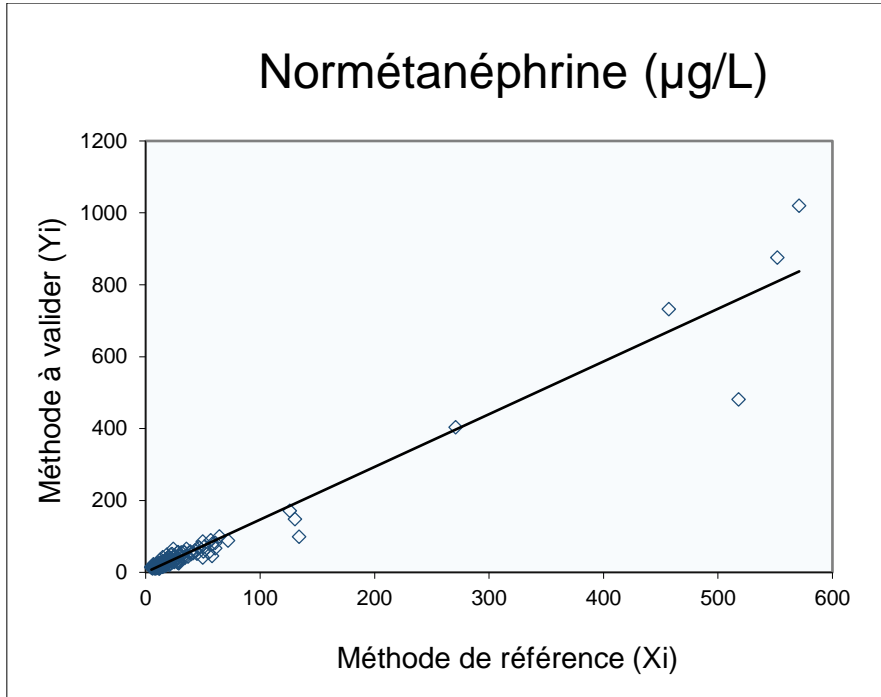
Graphique de Bland-Altman :



n	162
Biais moyen (%)	-13,86

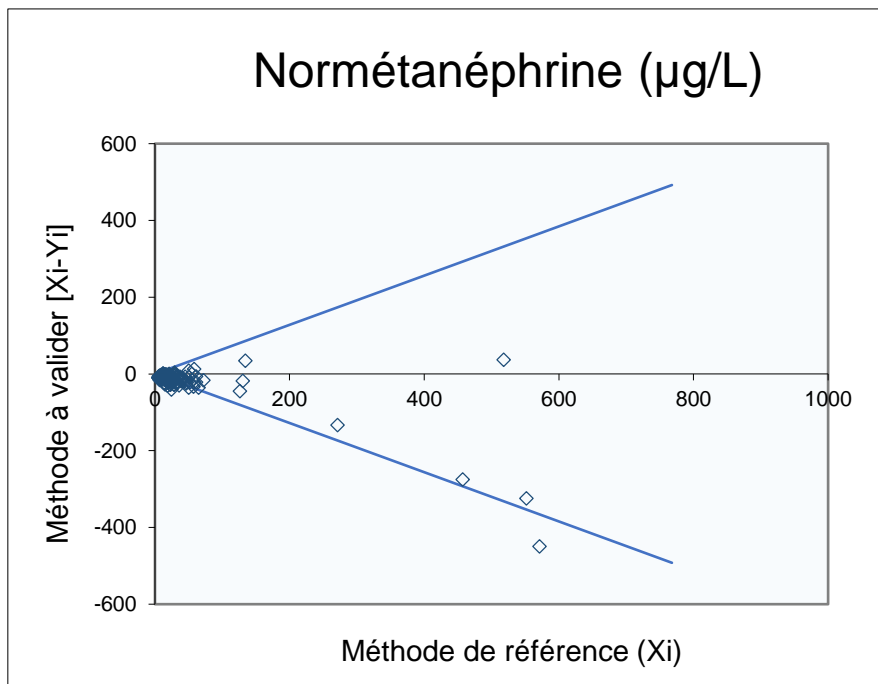
Annexe 17 : Normétanéphrine : comparaison de méthodes en concentrations.

Droite de régression de Passing-Bablok :



n	149
Equation de la droite	$y = 1,47x + 0,1$
r²	0,9711

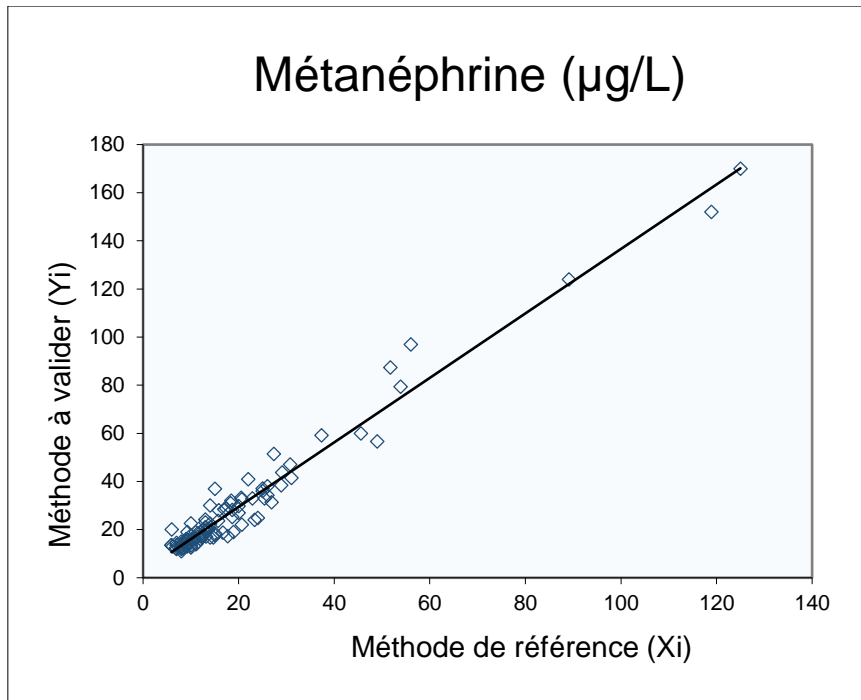
Graphique de Bland-Altman :



n	149
Biais moyen (%)	-18,08

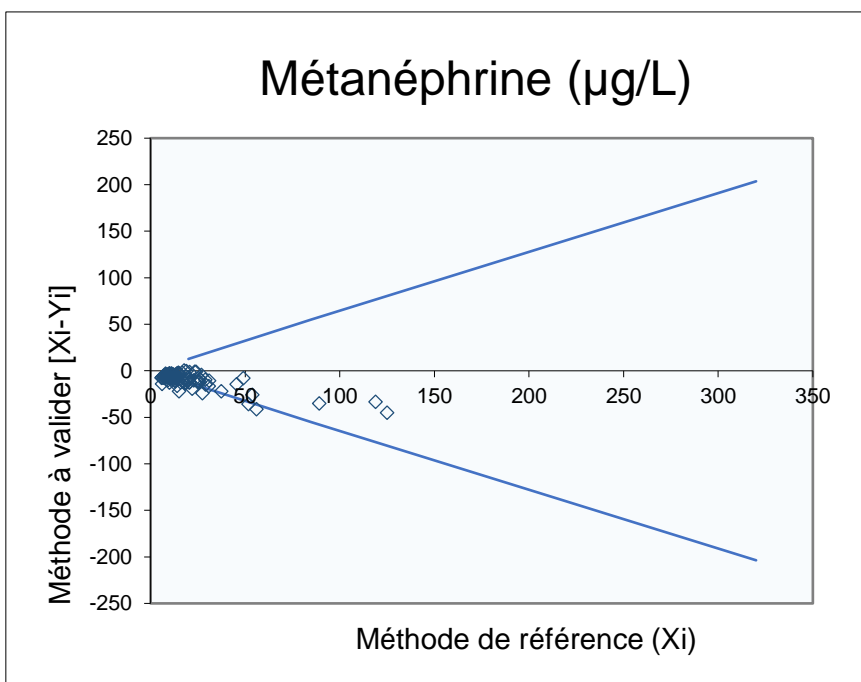
Annexe 18 : Métanéphrine : comparaison de méthodes en concentrations.

Droite de régression de Passing-Bablok :



n	102
Equation de la droite	$y = 1,34x + 2,68$
r²	0,9818

Graphique de Bland-Altman :



n	102
Biais moyen (%)	-9,20

Annexe 19 : Comparaison de méthodes : cas particulier de la dopamine.

Seule la dopamine présente un biais relativement important de l'ordre de $-40,87\%$ pour les concentrations, et de l'ordre de $-101,42\%$ pour les valeurs rendues en $\mu\text{mol/mole}_{\text{créatinine}}$ (annexes 10 et 11) par rapport aux résultats du laboratoire Biomnis.

Ce biais est sans importance pour les adultes car nous avons établi des valeurs de référence pour cette population (page 61). Cet intervalle de référence n'est pas applicable lorsque nous ne disposons que d'une simple miction, et chez les enfants (qui représentent la population cible des neuroblastomes), pour lesquels les valeurs varient en fonction de l'âge. Ainsi, pour interpréter les résultats des catécholamines urinaires chez les enfants, et notamment la dopamine (généralement augmentée dans les cas de neuroblastome), nous avons utilisé les valeurs de référence de la littérature (39). Ces valeurs étant les mêmes que celles utilisées par le laboratoire Biomnis, nous avons décidé de poursuivre les dosages urinaires en double avec le laboratoire Biomnis durant une période suffisamment longue pour déterminer si nos interprétations biologiques restent identiques.

Les tableaux 43 et annexe 58 présentent conjointement nos résultats et ceux obtenus par Biomnis, sur des urines d'un même patient sur le même recueil ou la même miction, ainsi que les caractéristiques cliniques correspondantes, à savoir si oui ou non un neuroblastome ou un phéochromocytome a bien été diagnostiqué (bilan de l'année 2018). Ces comparaisons discutées dans le chapitre *Application clinique au CHU de Nantes* (page 106) montrent que le biais observé pour la dopamine est au final sans importance, et que les conclusions qui sont tirées des résultats que nous rendons ne diffèrent pas de celles tirées des résultats du laboratoire Biomnis.

Annexe 20 : Liste des médicaments interférents et des aliments à exclure du régime alimentaire pendant 72 heures en vue du recueil urinaire pour détermination des valeurs de référence des catécholamines et des dérivés méthoxylés libres urinaires.

Médicaments interférents	Aliments interférents
<p>β-bloquants β-mimétiques Antidépresseurs tricycliques Analogues de la dopamine Paracétamol</p>	<p>Café Thé Tomates Avocats Bananes Chocolat Agrumes Kiwis Ananas Fruits secs oléagineux Vanille Mollusques Prunes</p>

**Annexe 21 : Résultats obtenus après dosage des catécholamines et dérivés
méthoxylés urinaires chez les 41 volontaires sains.**

Urine	Dopamine		Norépinéphrine		Epinéphrine	
	µg/L	nmol/24h	µg/L	nmol/24h	µg/L	nmol/24h
1	106	1730	10	147	3	47
2	320	2507	29	202	4	28
3	244	1752	48	309	11	66
4	172	1519	33	263	4	31
5	311	2032	34	201	5	26
6	291	2182	29	196	4	28
7	373	1948	29	138	3	14
8	252	2632	32	306	7	58
9	78	1071	16	201	1	11
10	196	1730	19	154	0	0
11	241	2363	25	225	2	16
12	61	601	10	89	3	27
13	135	1541	41	426	1	11
14	110	1364	19	213	3	33
15	127	1410	12	118	1	11
16	139	1541	16	160	1	11
17	94	1045	14	142	2	16
18	173	1240	25	166	2	11
19	126	1730	14	171	1	11
20	228	2605	53	550	6	60
21	97	1045	21	207	1	11
22	73	764	18	171	2	16
23	272	1632	30	160	5	27
24	164	2037	27	301	2	22
25	287	1874	60	355	8	44
26	363	1776	153	680	7	27
27	84	986	11	118	1	11
28	91	1423	16	225	3	38
29	59	790	11	136	1	11
30	78	967	18	203	3	28
31	100	1508	21	290	2	20
32	307	3010	40	355	5	44
33	157	2154	23	284	3	33
34	276	1619	49	260	3	16
35	120	2115	15	242	2	27
36	280	1462	43	201	7	33
37	303	2076	43	266	2	11
38	322	2944	49	408	5	38
39	151	1626	35	343	3	27
40	685	2461	81	266	18	55
41	392	2559	74	437	3	16

Urine	3-Méthoxytyramine		Normétanéphrine		Métanéphrine	
	µg/L	nmol/24h	µg/L	nmol/24h	µg/L	nmol/24h
1	14	202	9	119	15	185
2	46	327	28	182	32	195
3	31	205	31	187	47	264
4	26	211	25	183	16	112
5	47	282	25	138	24	124
6	44	303	26	165	19	109
7	50	240	22	98	36	146
8	32	303	20	178	39	314
9	13	161	10	115	9	96
10	36	293	15	109	12	81
11	29	263	21	175	24	183
12	8	72	7	60	9	71
13	21	221	19	180	9	81
14	16	161	10	104	16	152
15	20	203	8	76	10	86
16	16	161	13	120	11	96
17	11	114	9	82	11	96
18	27	179	15	93	23	127
19	19	239	10	115	14	147
20	42	443	29	278	19	167
21	17	167	15	136	7	61
22	13	126	10	87	11	91
23	43	233	19	93	19	86
24	17	191	15	158	12	117
25	34	203	24	131	25	127
26	39	173	75	306	29	112
27	14	150	11	109	9	81
28	11	155	11	142	12	147
29	8	96	5	55	3	30
30	12	136	11	117	14	132
31	13	184	12	149	10	118
32	33	299	27	224	21	162
33	24	299	15	175	29	309
34	50	269	26	126	18	81
35	19	305	9	131	9	122
36	40	191	21	93	37	152
37	45	281	20	115	14	76
38	45	377	32	246	30	213
39	24	239	26	235	27	228
40	74	245	50	153	87	243
41	41	245	35	191	23	117

Annexe 22 : Stabilité des urines traitées. Aires sous la courbe de la dopamine et de la dopamine-D4, et concentrations en dopamine à J0, J1, J2, J7 et J30.

Urine	Dopamine (counts)				
	J0	J1	J2	J7	J30
1	4.56E+06	4.00E+06	4.27E+06	4.59E+06	8.15E+06
2	3.28E+05	3.22E+05	3.42E+05	3.58E+05	6.30E+05
4	1.23E+06	1.17E+06	1.16E+06	1.27E+06	2.38E+06
5	6.36E+06	6.10E+06	6.19E+06	6.93E+06	1.24E+07
7	5.23E+06	4.90E+06	4.96E+06	5.60E+06	1.04E+07
8	6.10E+06	5.83E+06	6.02E+06	6.57E+06	1.12E+07
9	6.01E+06	5.81E+06	5.94E+06	6.24E+06	1.17E+07
10	6.46E+06	6.54E+06	6.48E+06	7.23E+06	1.30E+07
12	6.15E+06	6.10E+06	6.04E+06	6.76E+06	1.22E+07
13	7.95E+05	7.11E+05	7.43E+05	8.20E+05	1.48E+06
16	1.95E+06	1.93E+06	1.97E+06	2.13E+06	3.93E+06
17	1.20E+07	1.19E+07	1.20E+07	1.30E+07	2.34E+07
18	9.20E+06	9.12E+06	9.04E+06	1.03E+07	1.90E+07
19	3.08E+06	3.11E+06	3.08E+06	3.38E+06	6.42E+06
23	9.15E+06	9.06E+06	8.88E+06	9.36E+06	1.81E+07
24	6.68E+06	6.63E+06	6.89E+06	7.85E+06	1.42E+07
26	1.03E+07	1.07E+07	1.07E+07	1.15E+07	2.14E+07
27	3.72E+06	3.61E+06	3.66E+06	4.10E+06	7.27E+06
29	1.66E+06	1.60E+06	1.68E+06	1.85E+06	3.22E+06
30	4.43E+06	4.30E+06	4.62E+06	4.96E+06	8.96E+06

Aires sous la courbe de la dopamine.

Urine	Dopamine-D4 (counts)				
	J0	J1	J2	J7	J30
1	2.52E+06	2.18E+06	2.37E+06	2.50E+06	4.36E+06
2	1.78E+06	1.76E+06	1.81E+06	1.98E+06	3.53E+06
4	1.72E+06	1.69E+06	1.74E+06	1.89E+06	3.42E+06
5	2.61E+06	2.51E+06	2.61E+06	2.89E+06	5.23E+06
7	2.18E+06	2.06E+06	2.12E+06	2.30E+06	4.21E+06
8	2.26E+06	2.14E+06	2.23E+06	2.43E+06	4.26E+06
9	2.46E+06	2.34E+06	2.42E+06	2.56E+06	4.69E+06
10	2.56E+06	2.59E+06	2.69E+06	2.87E+06	5.05E+05
12	2.50E+06	2.48E+06	2.59E+06	2.80E+06	4.92E+05
13	2.26E+06	2.07E+06	2.07E+06	2.32E+06	4.22E+06
16	2.15E+06	2.14E+06	2.19E+06	2.32E+06	4.31E+06
17	2.52E+06	2.50E+06	2.64E+06	2.78E+06	4.95E+06
18	2.51E+06	2.46E+06	2.52E+06	2.79E+06	5.02E+06
19	1.65E+06	1.56E+06	1.63E+06	1.75E+06	3.22E+06
23	2.74E+06	2.63E+06	2.69E+06	2.78E+06	5.38E+06
24	1.78E+06	1.78E+06	1.84E+06	2.00E+06	3.82E+06
26	2.20E+06	2.26E+06	2.26E+06	2.44E+06	4.67E+06
27	1.53E+06	1.53E+06	1.59E+06	1.71E+06	3.01E+06
29	2.42E+06	2.36E+06	2.47E+06	2.74E+06	4.68E+06
30	1.47E+06	1.40E+06	1.49E+06	1.61E+06	2.88E+06

Aires sous la courbe de la dopamine-D4.

Urine	Dopamine ($\mu\text{g/L}$)					CV (%)
	J0	J1	J2	J7	J30	
1	112	117	113	117	117	2,2
2	11	11	11	12	11	2,6
4	44	43	42	43	42	1,2
5	150	153	149	150	148	1,3
7	149	150	148	154	152	1,6
8	168	173	168	169	164	1,8
9	152	158	153	154	156	1,6
10	151	156	150	154	154	1,7
12	151	153	144	149	146	2,4
13	21	21	22	22	21	1,9
16	57	58	56	59	56	2,1
17	291	299	287	292	295	1,6
18	222	232	221	228	233	2,5
19	117	127	122	124	123	3,0
23	208	218	209	210	212	1,9
24	226	234	233	240	230	2,2
26	288	297	294	295	293	1,2
27	152	151	144	150	151	2,2
29	42	43	42	43	43	1,9
30	189	195	193	194	194	1,2

Concentrations en dopamine et coefficients de variation.

Annexe 23 : Stabilité des urines traitées. Aires sous la courbe de la norépinéphrine et de la norépinéphrine-D6, et concentrations en norépinéphrine à J0, J1, J2, J7 et J30.

Urine	Norépinéphrine (counts)				
	J0	J1	J2	J7	J30
1	2.27E+05	2.09E+05	2.10E+05	2.21E+05	3.63E+05
2	3.56E+04	4.00E+04	3.61E+04	3.79E+04	6.78E+04
3	5.23E+05	5.38E+05	5.29E+05	6.68E+05	1.01E+06
5	2.75E+05	2.70E+05	2.79E+05	3.20E+05	5.39E+05
6	4.72E+05	4.32E+05	4.49E+05	5.61E+05	9.34E+05
7	1.00E+05	9.78E+04	9.63E+04	1.20E+05	1.95E+05
8	1.83E+05	1.85E+05	1.71E+05	1.96E+05	3.05E+05
9	6.30E+05	6.32E+05	6.00E+05	6.35E+05	1.11E+06
10	2.51E+05	2.61E+05	2.50E+05	3.18E+05	4.92E+05
11	1.06E+06	1.04E+06	1.00E+06	1.23E+06	2.00E+06
12	2.37E+05	2.35E+05	2.38E+05	2.88E+05	4.81E+05
13	7.51E+04	7.67E+04	7.30E+04	8.72E+04	1.59E+05
14	2.67E+05	2.56E+05	2.69E+05	3.33E+05	5.25E+05
15	2.77E+05	2.71E+05	2.78E+05	3.49E+05	5.71E+05
16	1.39E+05	1.48E+05	1.44E+05	1.65E+05	2.59E+05
17	1.32E+06	1.37E+06	1.32E+06	1.61E+06	2.61E+06
18	1.66E+05	1.65E+05	1.65E+05	1.96E+05	3.68E+05
19	8.63E+04	9.23E+04	8.55E+04	9.64E+04	1.62E+05
20	5.83E+05	5.69E+05	5.89E+05	7.07E+05	1.08E+06
21	3.45E+05	3.19E+05	3.27E+05	4.07E+05	6.45E+05
22	3.21E+05	3.15E+05	3.07E+05	3.82E+05	6.13E+05
23	1.73E+05	1.66E+05	1.65E+05	2.01E+05	3.22E+05
24	2.29E+05	2.32E+05	2.21E+05	2.82E+05	4.55E+05
25	3.44E+05	3.50E+05	3.44E+05	4.27E+05	6.73E+05
26	2.46E+05	2.68E+05	2.60E+05	3.27E+05	5.05E+05
28	6.89E+05	7.11E+05	6.99E+05	8.23E+05	1.35E+06
29	9.77E+04	1.00E+05	9.89E+04	1.12E+05	1.75E+05
30	1.23E+05	1.22E+05	1.27E+05	1.53E+05	2.39E+05

Aires sous la courbe de la norépinéphrine.

Urine	Norépinéphrine-D6 (counts)				
	J0	J1	J2	J7	J30
1	1.45E+06	1.03E+06	1.22E+06	4.14E+05	5.42E+06
2	7.18E+05	4.73E+05	6.31E+05	2.03E+05	2.61E+06
3	8.78E+05	6.34E+05	6.02E+05	2.70E+05	3.26E+06
5	1.28E+06	8.91E+05	1.03E+06	4.10E+05	5.00E+06
6	5.97E+05	4.62E+05	4.97E+05	2.03E+05	2.67E+06
7	9.46E+05	6.97E+05	7.90E+05	3.37E+05	4.21E+06
8	1.28E+06	9.99E+05	1.07E+06	4.15E+05	4.90E+06
9	1.68E+06	1.35E+06	1.51E+06	4.94E+05	6.31E+06
10	1.23E+06	1.10E+06	1.13E+06	4.35E+05	5.45E+06
11	9.20E+05	8.40E+05	8.21E+05	3.46E+05	4.26E+06
12	1.29E+06	9.34E+05	1.03E+06	4.31E+05	5.18E+06
13	1.32E+06	9.17E+05	1.07E+06	4.44E+05	5.14E+06
14	1.06E+06	6.95E+05	8.19E+05	3.42E+05	4.40E+06
15	1.09E+06	7.81E+05	1.00E+06	3.76E+05	4.45E+06
16	9.31E+05	6.48E+05	8.02E+05	3.13E+05	3.99E+06
17	1.19E+06	9.61E+05	9.67E+05	4.07E+05	5.05E+06
18	1.24E+06	9.39E+05	1.02E+06	4.41E+05	5.48E+06
19	7.76E+05	7.39E+05	7.59E+05	2.86E+05	3.56E+06
20	1.15E+06	8.95E+05	9.33E+05	4.17E+05	4.64E+06
21	1.08E+06	7.46E+05	8.31E+05	3.49E+05	4.21E+06
22	8.12E+05	5.68E+05	5.87E+05	2.68E+05	3.23E+06
23	1.42E+06	1.02E+06	1.13E+06	4.57E+05	5.57E+06
24	7.95E+05	6.47E+05	7.42E+05	2.96E+05	3.67E+06
25	9.24E+05	7.30E+05	7.84E+05	3.33E+05	4.24E+06
26	1.15E+06	1.02E+06	1.05E+06	4.25E+05	5.10E+06
28	9.22E+05	7.47E+05	8.37E+05	3.20E+05	3.93E+06
29	1.07E+06	8.05E+05	9.77E+05	3.61E+05	4.27E+06
30	6.30E+05	4.63E+05	5.49E+05	2.33E+05	2.90E+06

Aires sous la courbe de la norépinéphrine-D6.

Urine	Norépinéphrine (µg/L)					CV (%)
	J0	J1	J2	J7	J30	
1	13	13	12	12	12	4,1
2	4	4	3	3	5	15,5
3	47	54	66	59	60	12,4
5	16	20	20	19	20	8,8
6	62	60	73	67	77	10,8
7	7	8	10	9	9	10,2
8	11	11	13	11	11	9,8
9	29	30	33	33	32	4,5
10	16	15	17	18	18	7,4
11	93	81	94	88	86	5,9
12	13	16	16	16	18	12,4
13	4	4	4	4	6	15,0
14	20	25	26	24	23	10,2
15	19	23	22	25	25	10,0
16	12	14	14	11	12	8,8
17	90	92	108	98	96	7,2
18	10	12	13	11	12	8,7
19	8	8	8	9	8	5,0
20	39	39	43	39	45	6,4
21	25	28	32	28	29	8,5
22	31	34	43	35	35	12,2
23	9	10	11	11	11	10,1
24	24	24	23	24	24	2,0
25	31	32	35	31	30	6,3
26	18	17	20	19	19	7,1
28	57	61	65	63	62	4,9
29	7	8	7	6	7	8,3
30	14	17	18	16	16	8,1

Concentrations en norépinéphrine et coefficients de variation.

Annexe 24 : Stabilité des urines traitées. Aires sous la courbe de l'épinéphrine et de l'épinéphrine-D6, et concentrations en épinéphrine à J0, J1, J2, J7 et J30.

Urine	Epinéphrine (counts)				
	J0	J1	J2	J7	J30
3	1,66E+05	1,59E+05	1,50E+05	1,87E+05	5,97E+05
6	1,53E+05	1,50E+05	1,61E+05	1,69E+05	6,04E+05
9	2,30E+05	2,11E+05	1,96E+05	2,28E+05	7,92E+05
11	4,32E+05	4,03E+05	4,12E+05	4,68E+05	1,62E+06
14	8,59E+04	7,35E+04	7,53E+04	9,28E+04	2,61E+05
17	5,27E+05	5,22E+05	5,01E+05	5,54E+05	1,94E+06
20	2,05E+05	1,86E+05	2,00E+05	2,24E+05	7,31E+05
21	1,43E+05	1,29E+05	1,09E+05	1,00E+05	3,97E+05
22	7,85E+04	5,52E+04	7,44E+04	7,91E+04	2,47E+05
26	7,96E+04	1,04E+05	9,47E+04	8,56E+04	3,68E+05
28	5,78E+05	5,27E+05	5,76E+05	5,40E+05	1,99E+06

Aires sous la courbe de l'épinéphrine.

Urine	Epinéphrine-D6 (counts)				
	J0	J1	J2	J7	J30
3	1,62E+06	1,64E+06	1,69E+06	2,09E+06	3,34E+06
6	1,36E+06	1,23E+06	1,32E+06	1,70E+06	2,67E+06
9	2,71E+06	2,54E+06	2,62E+06	3,36E+06	5,67E+06
11	2,26E+06	2,09E+06	2,24E+06	2,82E+06	4,56E+06
14	2,28E+06	2,20E+06	2,34E+06	2,89E+06	4,50E+06
17	2,81E+06	2,60E+06	2,76E+06	3,38E+06	5,73E+06
20	2,51E+06	2,37E+06	2,54E+06	3,16E+06	4,42E+06
21	2,20E+06	2,03E+06	2,12E+06	2,68E+06	4,39E+06
22	1,72E+06	1,59E+06	1,71E+06	2,22E+06	3,05E+06
26	2,32E+06	2,32E+06	2,36E+06	2,83E+06	5,25E+06
28	2,20E+06	2,09E+06	2,13E+06	2,37E+06	4,43E+06

Aires sous la courbe de l'épinéphrine-D6.

Urine	Épinéphrine (µg/L)					CV (%)
	J0	J1	J2	J7	J30	
3	9	8	8	8	8	2,6
6	10	10	11	10	10	3,5
9	6	7	7	7	7	3,1
11	17	18	17	17	18	2,3
14	3	3	3	3	3	6,2
17	16	17	17	17	17	2,1
20	7	7	7	7	8	3,2
21	5	4	4	4	4	7,7
22	3	3	4	3	3	8,1
26	3	3	3	3	3	9,6
28	22	22	24	23	22	3,3

Concentrations en épinéphrine et coefficients de variation.

Annexe 25 : Stabilité des urines traitées. Aires sous la courbe de la 3-méthoxytyramine et de la 3-méthoxytyramine-D4 à J0, J1, J2, J7 et J30.

Urine	3-Méthoxytyramine (counts)				
	J0	J1	J2	J7	J30
1	2,87E+06	2,67E+06	2,89E+06	3,18E+06	5,44E+06
2	5,38E+05	5,79E+05	5,77E+05	6,46E+05	1,27E+06
3	2,90E+06	3,10E+06	3,20E+06	3,57E+06	6,09E+06
4	1,28E+06	1,34E+06	1,36E+06	1,51E+06	2,78E+06
5	1,48E+06	1,50E+06	1,55E+06	1,77E+06	3,16E+06
6	4,74E+05	4,76E+05	5,14E+05	5,72E+05	1,15E+06
7	1,09E+06	1,09E+06	1,15E+06	1,28E+06	2,39E+06
8	1,99E+06	2,02E+06	2,08E+06	2,29E+06	4,02E+06
9	8,85E+05	9,04E+05	9,28E+05	1,03E+06	1,92E+06
10	1,31E+06	1,40E+06	1,43E+06	1,57E+06	2,85E+06
11	2,64E+06	2,69E+06	2,85E+06	3,19E+06	5,32E+06
12	1,27E+06	1,32E+06	1,39E+06	1,52E+06	2,68E+06
13	3,50E+05	3,61E+05	3,69E+05	4,62E+05	9,44E+05
14	4,86E+06	5,04E+06	5,49E+06	5,90E+06	8,95E+06
15	2,34E+06	2,38E+06	2,51E+06	2,87E+06	5,01E+06
16	6,47E+05	6,97E+05	7,11E+05	8,11E+05	1,50E+06
17	1,09E+06	1,13E+06	1,14E+06	1,12E+06	2,40E+06
18	1,10E+06	1,08E+06	1,14E+06	1,42E+06	2,61E+06
19	1,47E+06	1,35E+06	1,46E+06	1,52E+06	2,64E+06
21	1,93E+06	1,90E+06	1,99E+06	2,13E+06	4,09E+06
22	1,93E+06	2,04E+06	2,10E+06	2,27E+06	3,49E+06
23	1,71E+06	1,62E+06	1,51E+06	1,63E+06	3,42E+06
24	9,83E+05	1,06E+06	1,14E+06	1,34E+06	2,48E+06
25	1,58E+06	1,66E+06	1,67E+06	1,72E+06	3,20E+06
26	1,23E+06	1,27E+06	1,35E+06	1,63E+06	3,10E+06
27	1,35E+06	1,37E+06	1,41E+06	1,60E+06	2,75E+06
29	5,38E+05	5,67E+05	6,28E+05	7,29E+05	1,36E+06
30	8,04E+05	8,24E+05	8,69E+05	9,49E+05	1,63E+06

Aires sous la courbe de la 3-méthoxytyramine.

Urine	3-Méthoxytyramine-D4 (counts)				
	J0	J1	J2	J7	J30
1	5,28E+05	4,93E+05	5,14E+05	5,67E+05	1,03E+06
2	4,14E+05	4,31E+05	4,43E+05	4,97E+05	8,76E+05
3	2,44E+05	2,61E+05	2,57E+05	2,87E+05	5,22E+05
4	4,36E+05	4,51E+05	4,47E+05	5,07E+05	9,23E+05
5	4,11E+05	4,10E+05	4,24E+05	4,76E+05	8,70E+05
6	2,92E+04	2,88E+04	2,98E+04	3,50E+04	7,62E+04
7	2,99E+05	2,96E+05	3,08E+05	3,41E+05	6,48E+05
8	3,58E+05	3,70E+05	3,73E+05	4,09E+05	7,57E+05
9	3,06E+05	3,13E+05	3,16E+05	3,48E+05	6,65E+05
10	2,27E+05	2,42E+05	2,40E+05	2,74E+05	5,05E+05
11	1,66E+05	1,74E+05	1,81E+05	2,09E+05	3,56E+05
12	2,21E+05	2,31E+05	2,42E+05	2,68E+05	4,92E+05
13	1,45E+05	1,47E+05	1,52E+05	1,92E+05	3,68E+05
14	4,09E+05	4,15E+05	4,38E+05	4,85E+05	7,87E+05
15	2,04E+05	2,03E+05	2,08E+05	2,34E+05	4,45E+05
16	4,48E+05	4,75E+05	4,84E+05	5,39E+05	9,96E+05
17	2,26E+05	2,41E+05	2,35E+05	2,48E+05	5,03E+05
18	2,20E+05	2,11E+05	2,26E+05	2,77E+05	5,16E+05
19	3,15E+05	3,31E+05	3,36E+05	3,87E+05	6,75E+05
21	1,75E+05	1,68E+05	1,69E+05	1,86E+05	3,46E+05
22	1,28E+05	1,33E+05	1,32E+05	1,51E+05	2,26E+05
23	3,19E+05	3,05E+05	2,58E+05	2,92E+05	6,91E+05
24	1,37E+05	1,51E+05	1,55E+05	1,72E+05	3,76E+05
25	1,51E+05	1,47E+05	1,31E+05	1,54E+05	3,17E+05
26	2,17E+05	2,16E+05	2,25E+05	2,75E+05	5,52E+05
27	2,36E+05	2,38E+05	2,53E+05	2,79E+05	5,22E+05
29	4,56E+05	4,69E+05	5,12E+05	6,04E+05	1,07E+06
30	2,01E+05	1,98E+05	2,10E+05	2,37E+05	4,31E+05

Aires sous la courbe de la 3-méthoxytyramine-D4.

Annexe 26 : Stabilité des urines traitées. Aires sous la courbe de la normétanéphrine et de la normétanéphrine-D3 à J0, J1, J2, J7 et J30.

Urine	Normétanéphrine (counts)				
	J0	J1	J2	J7	J30
1	7,28E+05	7,23E+05	7,37E+05	8,34E+05	1,28E+06
2	2,96E+05	3,30E+05	3,00E+05	3,60E+05	5,31E+05
3	1,29E+06	1,38E+06	1,40E+06	1,55E+06	2,32E+06
5	4,57E+05	4,69E+05	4,74E+05	5,34E+05	8,05E+05
6	1,58E+06	1,57E+06	1,67E+06	1,97E+06	2,94E+06
7	3,11E+05	2,77E+05	2,85E+05	3,45E+05	5,32E+05
8	8,35E+05	8,19E+05	8,62E+05	1,00E+06	1,47E+06
9	8,81E+05	8,78E+05	8,45E+05	1,01E+06	1,57E+06
10	7,18E+05	7,78E+05	7,76E+05	9,07E+05	1,38E+06
11	4,92E+06	5,10E+06	5,16E+06	5,99E+06	9,14E+06
12	7,47E+05	7,41E+05	7,42E+05	8,98E+05	1,39E+06
13	7,44E+05	7,35E+05	8,02E+05	9,39E+05	1,41E+06
14	6,48E+05	6,22E+05	6,83E+05	7,33E+05	1,08E+06
15	8,35E+05	8,34E+05	8,90E+05	9,48E+05	1,53E+06
16	2,51E+05	2,59E+05	2,47E+05	3,09E+05	4,56E+05
17	2,66E+06	2,74E+06	2,78E+06	3,09E+06	5,01E+06
18	4,79E+05	4,70E+05	4,61E+05	5,66E+05	8,60E+05
19	3,46E+05	3,60E+05	3,68E+05	4,44E+05	6,31E+05
20	9,93E+06	1,04E+07	1,05E+07	1,19E+07	1,61E+07
21	8,96E+05	8,97E+05	9,44E+05	1,04E+06	1,61E+06
22	3,25E+06	3,30E+06	3,41E+06	3,88E+06	5,31E+06
23	1,16E+06	1,12E+06	1,15E+06	1,26E+06	2,17E+06
24	7,73E+05	8,46E+05	9,27E+05	1,10E+06	1,66E+06
25	7,39E+05	3,50E+05	7,16E+05	7,97E+05	1,22E+06
26	6,75E+05	7,09E+05	7,27E+05	8,05E+05	1,35E+06
27	2,78E+05	2,89E+05	2,76E+05	3,32E+05	1,76E+05
28	1,23E+07	1,27E+07	1,29E+07	1,33E+07	2,15E+07
30	3,43E+05	3,29E+05	3,34E+05	4,19E+05	6,46E+05

Aires sous la courbe de la normétanéphrine.

Urine	Normétanéphrine-D3 (counts)				
	J0	J1	J2	J7	J30
1	3,15E+06	3,00E+06	3,11E+06	3,66E+06	5,59E+06
2	2,12E+06	2,21E+06	2,28E+06	2,64E+06	4,11E+06
3	2,18E+06	2,26E+06	2,23E+06	2,61E+06	4,16E+06
5	3,43E+06	3,47E+06	3,38E+06	4,00E+06	6,53E+06
6	2,12E+06	2,07E+06	2,31E+06	2,53E+06	3,97E+06
7	2,50E+06	2,48E+06	2,52E+06	2,87E+06	4,41E+06
8	3,04E+06	3,03E+06	2,98E+06	3,55E+06	5,21E+06
9	3,17E+06	3,20E+06	3,18E+06	3,89E+06	6,28E+06
10	3,74E+06	4,08E+06	3,99E+06	4,45E+06	7,30E+06
11	3,32E+06	3,26E+06	3,38E+06	4,07E+06	6,48E+06
12	3,67E+06	3,85E+06	3,82E+06	4,56E+06	7,32E+06
13	3,38E+06	3,50E+06	3,55E+06	4,31E+06	6,97E+06
14	3,06E+06	3,15E+06	3,31E+06	3,61E+06	5,24E+06
15	3,21E+06	3,14E+06	3,20E+06	3,77E+06	6,59E+06
16	2,34E+06	2,37E+06	2,57E+06	2,74E+06	4,52E+06
17	3,64E+06	3,73E+06	3,70E+06	4,17E+06	7,16E+06
18	3,49E+06	3,48E+06	3,51E+06	4,27E+06	7,51E+06
19	1,75E+06	1,83E+06	1,90E+06	2,14E+06	3,58E+06
20	3,29E+06	3,34E+06	3,41E+06	3,99E+06	5,65E+06
21	3,30E+06	3,21E+06	3,40E+06	3,62E+06	6,18E+06
22	2,40E+06	2,58E+06	2,60E+06	2,74E+06	3,90E+06
23	3,71E+06	3,84E+06	3,84E+06	3,95E+06	7,58E+06
24	2,37E+06	2,42E+06	2,60E+06	3,04E+06	4,88E+06
25	2,77E+06	2,97E+06	2,82E+06	2,98E+06	4,71E+06
26	3,12E+06	3,47E+06	3,41E+06	4,00E+06	6,96E+06
27	1,81E+06	1,83E+06	1,80E+06	2,06E+06	3,34E+06
28	2,76E+06	2,92E+06	3,02E+06	3,08E+06	5,31E+06
30	1,75E+06	1,68E+06	1,89E+06	2,06E+06	3,26E+06

Aires sous la courbe de la normétanéphrine-D3.

Annexe 27 : Stabilité des urines traitées. Aires sous la courbe de la métanéphrine et de la métanéphrine-D3 à J0, J1, J2, J7 et J30.

Urine	Métanéphrine (counts)				
	J0	J1	J2	J7	J30
3	1,03E+06	1,04E+06	1,04E+06	1,26E+06	3,22E+06
4	6,79E+04	6,66E+04	6,62E+04	8,03E+04	2,11E+05
5	1,93E+05	1,91E+05	1,83E+05	2,40E+05	6,20E+05
6	7,66E+05	7,09E+05	7,43E+05	9,50E+05	2,47E+06
7	8,19E+04	6,67E+04	7,07E+04	9,33E+04	2,39E+05
9	3,64E+05	3,48E+05	3,58E+05	4,44E+05	1,21E+06
10	5,69E+05	5,44E+05	5,49E+05	6,96E+05	1,82E+06
11	1,40E+06	1,37E+06	1,40E+06	1,73E+06	4,50E+06
12	5,27E+05	4,94E+05	4,98E+05	6,71E+05	1,72E+06
13	1,15E+05	1,11E+05	1,20E+05	1,42E+05	3,85E+05
14	4,19E+05	4,13E+05	4,29E+05	5,43E+05	1,09E+06
15	2,52E+05	2,40E+05	2,49E+05	3,04E+05	7,90E+05
16	7,26E+04	7,56E+04	7,04E+04	9,57E+04	2,52E+05
17	7,89E+05	7,85E+05	8,01E+05	8,43E+05	2,65E+06
18	3,57E+05	3,16E+05	3,02E+05	4,45E+05	1,20E+06
20	1,03E+06	1,02E+06	1,03E+06	1,31E+06	2,28E+06
21	1,31E+06	1,28E+06	1,31E+06	1,60E+06	4,16E+06
22	5,17E+05	5,15E+05	5,24E+05	6,61E+05	1,12E+06
23	4,24E+05	3,84E+05	3,52E+05	3,58E+05	1,33E+06
24	3,35E+05	3,66E+05	3,94E+05	6,11E+05	1,51E+06
25	3,98E+05	3,99E+05	3,66E+05	3,45E+05	9,68E+05
26	3,78E+05	3,99E+05	3,80E+05	6,20E+05	1,69E+06
27	2,37E+05	2,40E+05	2,37E+05	3,24E+05	8,11E+05
28	1,05E+06	1,04E+06	1,07E+06	9,32E+05	3,22E+06
29	5,17E+04	5,42E+04	5,69E+04	7,54E+04	1,78E+05
30	8,99E+04	8,58E+04	1,01E+05	1,14E+05	2,75E+05

Aires sous la courbe de la métanéphrine.

Urine	Métanéphrine-D3 (counts)				
	J0	J1	J2	J7	J30
3	2,40E+06	2,44E+06	2,49E+06	3,04E+06	6,75E+06
4	2,66E+06	2,65E+06	2,65E+06	3,43E+06	7,87E+06
5	3,85E+06	3,73E+06	3,77E+06	4,94E+06	1,11E+07
6	1,96E+06	1,79E+06	1,92E+06	2,46E+06	5,62E+06
7	2,63E+06	2,44E+06	2,54E+06	3,33E+06	7,66E+06
9	3,47E+06	3,36E+06	3,43E+06	4,33E+06	1,00E+07
10	4,07E+06	4,17E+06	4,20E+06	5,29E+06	1,20E+07
11	3,59E+06	3,52E+06	3,63E+06	4,49E+06	1,02E+07
12	4,05E+06	3,88E+06	4,00E+06	5,38E+06	1,21E+07
13	3,72E+06	3,56E+06	3,71E+06	4,69E+06	1,06E+07
14	3,47E+06	3,42E+06	3,60E+06	4,52E+06	8,07E+06
15	3,61E+06	3,49E+06	3,64E+06	4,41E+06	1,03E+07
16	2,41E+06	2,46E+06	2,50E+06	3,28E+06	7,30E+06
17	3,89E+06	3,94E+06	4,04E+06	4,12E+06	1,14E+07
18	3,74E+06	3,39E+06	3,24E+06	4,78E+06	1,15E+07
20	3,76E+06	3,73E+06	3,86E+06	4,80E+06	7,29E+06
21	3,61E+06	3,44E+06	3,61E+06	4,40E+06	1,01E+07
22	2,65E+06	2,72E+06	2,79E+06	3,50E+06	5,22E+06
23	3,96E+06	3,70E+06	3,39E+06	3,32E+06	1,11E+07
24	2,08E+06	2,30E+06	2,49E+06	3,81E+06	8,24E+06
25	2,84E+06	2,89E+06	2,65E+06	2,45E+06	6,24E+06
26	2,85E+06	3,04E+06	2,88E+06	4,73E+06	1,13E+07
27	1,97E+06	2,03E+06	2,04E+06	2,70E+06	6,03E+06
28	3,04E+06	2,99E+06	3,14E+06	2,71E+06	8,16E+06
29	2,12E+06	2,11E+06	2,35E+06	3,43E+06	6,91E+06
30	1,84E+06	1,83E+06	1,89E+06	2,40E+06	5,41E+06

Aires sous la courbe de la métanéphrine-D3.

Annexe 28 : Stabilité des urines natives. Aires sous la courbe de la dopamine et de la dopamine-D4, et concentrations en dopamine pour cinq urines pures et diluées au dixième à J0, J2, J7, J14 et J30.

	Dopamine (counts)					CV (%)
	J0	J2	J7	J14	J30	
Urine 1	1,67E+07	1,78E+07	1,65E+07	1,90E+07	1,50E+07	8,9
Urine 1 1/10 ^{ème}	1,80E+06	1,75E+06	1,71E+06	2,03E+06	1,60E+06	
Urine 2	2,05E+07	1,91E+07	1,90E+07	1,97E+07	1,95E+07	4,7
Urine 2 1/10 ^{ème}	1,92E+06	2,00E+06	1,76E+06	1,91E+06	1,86E+06	
Urine 3	1,88E+07	1,97E+07	1,86E+07	1,78E+07	2,06E+07	6,3
Urine 3 1/10 ^{ème}	1,85E+06	2,13E+06	1,98E+06	2,05E+06	1,85E+06	
Urine 4	2,86E+07	2,94E+07	2,79E+07	3,04E+07	2,96E+07	2,5
Urine 4 1/10 ^{ème}	3,30E+06	3,25E+06	3,25E+06	3,44E+06	3,24E+06	
Urine 5	2,38E+07	1,74E+06	2,27E+07	2,87E+07	2,87E+07	4,5
Urine 5 1/10 ^{ème}	2,55E+06	2,78E+06	2,61E+06	2,83E+06	2,63E+06	

	Dopamine-D4 (counts)					CV (%)
	J0	J2	J7	J14	J30	
Urine 1	4,80E+06	5,22E+06	5,02E+06	5,63E+06	4,56E+06	7,1
Urine 1 1/10 ^{ème}	5,54E+06	5,16E+06	5,02E+06	5,76E+06	4,86E+06	
Urine 2	5,16E+06	5,05E+06	4,90E+06	5,29E+06	5,22E+06	5,9
Urine 2 1/10 ^{ème}	5,04E+06	5,37E+06	4,76E+06	5,15E+06	4,64E+06	
Urine 3	4,90E+06	5,08E+06	4,84E+06	4,76E+06	5,41E+06	5,0
Urine 3 1/10 ^{ème}	5,14E+06	5,41E+06	4,85E+06	4,97E+06	4,79E+06	
Urine 4	4,61E+06	4,94E+06	4,65E+06	5,07E+06	5,30E+06	3,6
Urine 4 1/10 ^{ème}	5,62E+06	5,30E+06	5,61E+06	5,83E+06	5,46E+06	
Urine 5	4,34E+06	3,33E+05	4,33E+06	5,76E+06	5,48E+06	7,0
Urine 5 1/10 ^{ème}	4,89E+06	5,40E+06	4,72E+06	5,57E+06	5,00E+06	


	Dopamine (µg/L)					CV (%)
	J0	J2	J7	J14	J30	
Urine 1	272	265	257	263	256	3,3
Urine 1 1/10 ^{ème}	25,2	26,3	26,5	27,4	25,6	
Urine 2	310	295	302	289	291	3,5
Urine 2 1/10 ^{ème}	29,6	28,9	28,7	28,9	31,2	
Urine 3	298	302	299	291	296	5,2
Urine 3 1/10 ^{ème}	28,1	30,6	31,7	32,1	30	
Urine 4	483	463	467	467	435	2,1
Urine 4 1/10 ^{ème}	45,6	47,7	45,1	45,9	46,2	
Urine 5	426	407	408	388	408	3,4
Urine 5 1/10 ^{ème}	40,5	40,1	43,1	39,4	41	


Annexe 29 : Stabilité des urines natives. Aires sous la courbe de la norépinéphrine et de la norépinéphrine-D6, et concentrations en norépinéphrine pour cinq urines pures et diluées au dixième à J0, J2, J7, J14 et J30.

	Norépinéphrine (counts)					CV (%)
	J0	J2	J7	J14	J30	
Urine 1	1,34E+06	1,33E+06	1,29E+06	1,33E+06	7,56E+05	1,7
Urine 1 1/10 ^{ème}	1,32E+05	1,22E+05	1,25E+05	1,23E+05	1,04E+05	
Urine 2	1,81E+06	1,74E+06	1,81E+06	1,67E+06	1,68E+06	3,9
Urine 2 1/10 ^{ème}	1,57E+05	1,59E+05	1,54E+05	1,49E+05	1,37E+05	
Urine 3	1,82E+06	1,88E+06	1,91E+06	8,78E+05	1,68E+06	5,6
Urine 3 1/10 ^{ème}	1,75E+05	1,82E+05	1,83E+05	1,60E+05	1,53E+05	
Urine 4	2,29E+06	2,25E+06	2,17E+06	2,00E+06	2,33E+06	5,9
Urine 4 1/10 ^{ème}	2,25E+05	2,25E+05	2,39E+05	2,14E+05	2,03E+05	
Urine 5	2,05E+06	1,01E+05	1,77E+06	2,14E+06	2,44E+06	54,4
Urine 5 1/10 ^{ème}	2,17E+05	2,43E+05	2,44E+05	2,37E+05	2,10E+05	

	Norépinéphrine-D6 (counts)					CV (%)
	J0	J2	J7	J14	J30	
Urine 1	3,48E+06	3,45E+06	3,47E+06	3,52E+06	1,96E+06	0,9
Urine 1 1/10 ^{ème}	3,59E+06	3,27E+06	3,64E+06	3,46E+06	2,80E+06	
Urine 2	3,65E+06	3,58E+06	3,61E+06	3,34E+06	3,35E+06	4,3
Urine 2 1/10 ^{ème}	3,30E+06	3,32E+06	3,25E+06	3,15E+06	2,82E+06	
Urine 3	3,36E+06	3,41E+06	3,51E+06	1,61E+06	3,15E+06	4,5
Urine 3 1/10 ^{ème}	3,34E+06	3,45E+06	3,54E+06	3,12E+06	2,88E+06	
Urine 4	3,41E+06	3,24E+06	3,27E+06	2,89E+06	3,29E+06	6,1
Urine 4 1/10 ^{ème}	3,38E+06	3,35E+06	3,71E+06	3,22E+06	3,11E+06	
Urine 5	2,69E+06	1,18E+05	2,42E+06	2,79E+06	3,19E+06	11,5
Urine 5 1/10 ^{ème}	3,04E+06	3,18E+06	3,47E+06	3,35E+06	2,91E+06	

	Norépinéphrine (µg/L)					CV (%)
	J0	J2	J7	J14	J30	
Urine 1	82,8	82,8	79,6	81	82,9	1,8
Urine 1 1/10 ^{ème}	7,86	7,97	7,35	7,58	7,92	
Urine 2	106	105	108	107	108	1,2
Urine 2 1/10 ^{ème}	10,1	10,3	10,1	10,1	10,4	
Urine 3	117	119	117	117	115	1,2
Urine 3 1/10 ^{ème}	11,2	11,3	11,1	11	11,4	
Urine 4	144	149	143	149	152	2,6
Urine 4 1/10 ^{ème}	14,2	14,4	13,8	14,2	13,9	
Urine 5	164	183	157	165	164	5,8
Urine 5 1/10 ^{ème}	15,3	16,3	15,1	15,2	15,4	

 : valeur à l'origine d'une augmentation du CV mais sans impact sur la concentration

 : valeur faisant augmenter le CV avec impact sur la concentration

Annexe 30 : Stabilité des urines natives. Aires sous la courbe de la 3-méthoxytyramine et de la 3-méthoxytyramine-D4 pour cinq urines pures et diluées au dixième à J0, J2, J7, J14 et J30.

	3-Méthoxytyramine (counts)					CV (%)
	J0	J2	J7	J14	J30	
Urine 1	5,55E+06	5,28E+06	5,66E+06	6,02E+06	7,34E+06	13,6
Urine 1 1/10 ^{ème}	8,43E+05	7,25E+05	8,19E+05	7,97E+05	1,00E+06	
Urine 2	6,48E+06	5,99E+06	7,06E+06	6,72E+06	8,90E+06	15,9
Urine 2 1/10 ^{ème}	1,03E+06	1,02E+06	1,01E+06	1,05E+06	1,31E+06	
Urine 3	8,39E+06	8,26E+06	9,10E+06	9,38E+06	1,11E+07	9,9
Urine 3 1/10 ^{ème}	1,28E+06	1,25E+06	1,24E+06	1,36E+06	1,56E+06	
Urine 4	8,72E+06	8,38E+06	6,16E+06	6,58E+06	8,12E+06	10,4
Urine 4 1/10 ^{ème}	1,47E+06	1,38E+06	1,55E+06	1,61E+06	1,81E+06	
Urine 5	7,47E+06	8,16E+06	1,05E+07	1,17E+07	1,26E+07	11,8
Urine 5 1/10 ^{ème}	1,54E+06	1,76E+06	1,85E+06	1,85E+06	2,14E+06	

	3-Méthoxytyramine-D4 (counts)					CV (%)
	J0	J2	J7	J14	J30	
Urine 1	9,55E+05	9,38E+05	1,02E+06	1,10E+06	1,21E+06	10,8
Urine 1 1/10 ^{ème}	1,52E+06	1,35E+06	1,55E+06	1,57E+06	1,64E+06	
Urine 2	8,64E+05	8,25E+05	9,80E+05	9,39E+05	1,06E+06	10,0
Urine 2 1/10 ^{ème}	1,39E+06	1,44E+06	1,44E+06	1,57E+06	1,65E+06	
Urine 3	9,14E+05	9,43E+05	1,04E+06	1,11E+06	1,16E+06	5,8
Urine 3 1/10 ^{ème}	1,48E+06	1,51E+06	1,51E+06	1,69E+06	1,63E+06	
Urine 4	7,84E+05	8,07E+05	6,06E+05	6,30E+05	7,11E+05	8,7
Urine 4 1/10 ^{ème}	1,39E+06	1,34E+06	1,53E+06	1,62E+06	1,62E+06	
Urine 5	5,87E+05	6,63E+05	8,85E+05	9,77E+05	9,59E+05	10,7
Urine 5 1/10 ^{ème}	1,28E+06	1,43E+06	1,58E+06	1,65E+06	1,66E+06	

Annexe 31 : Stabilité des urines natives. Aires sous la courbe de la normétanéphrine et de la normétanéphrine-D3 pour cinq urines pures et diluées au dixième à J0, J2, J7, J14 et J30.

	Normétanéphrine (counts)					CV (%)
	J0	J2	J7	J14	J30	
Urine 1	3,67E+07	4,15E+07	3,92E+07	4,71E+07	4,71E+07	11,1
Urine 1 1/10 ^{ème}	4,83E+06	4,55E+06	4,86E+06	5,25E+06	5,06E+06	
Urine 2	5,18E+07	5,21E+07	5,37E+07	5,55E+07	6,16E+07	7,3
Urine 2 1/10 ^{ème}	5,71E+06	6,14E+06	5,65E+06	6,39E+06	6,37E+06	
Urine 3	6,14E+07	6,30E+07	6,50E+07	7,65E+07	7,33E+07	9,3
Urine 3 1/10 ^{ème}	6,67E+06	7,03E+06	6,99E+06	8,42E+06	7,46E+06	
Urine 4	6,93E+07	6,83E+07	6,79E+07	8,21E+07	8,45E+07	13,6
Urine 4 1/10 ^{ème}	8,51E+06	8,16E+06	8,63E+06	1,12E+07	9,95E+06	
Urine 5	6,51E+07	8,13E+07	8,35E+07	1,06E+08	9,80E+07	14,3
Urine 5 1/10 ^{ème}	8,56E+06	1,05E+07	1,02E+07	1,27E+07	1,14E+07	

	Normétanéphrine-D3 (counts)					CV (%)
	J0	J2	J7	J14	J30	
Urine 1	5,88E+06	6,96E+06	6,95E+06	8,42E+06	7,73E+06	13,3
Urine 1 1/10 ^{ème}	7,88E+06	7,62E+06	8,65E+06	9,57E+06	8,33E+06	
Urine 2	6,83E+06	6,78E+06	7,30E+06	7,78E+06	7,70E+06	6,4
Urine 2 1/10 ^{ème}	7,31E+06	7,92E+06	7,53E+06	8,54E+06	7,49E+06	
Urine 3	6,38E+06	7,13E+06	7,29E+06	8,71E+06	8,00E+06	12,6
Urine 3 1/10 ^{ème}	6,54E+06	7,15E+06	7,62E+06	9,08E+06	7,26E+06	
Urine 4	6,09E+06	6,43E+06	6,40E+06	8,10E+06	7,75E+06	13,4
Urine 4 1/10 ^{ème}	7,27E+06	7,18E+06	7,90E+06	9,86E+06	8,23E+06	
Urine 5	4,78E+06	6,66E+06	7,03E+06	9,29E+06	7,78E+06	15,3
Urine 5 1/10 ^{ème}	6,20E+06	7,88E+06	7,96E+06	9,63E+06	8,25E+06	

Annexe 32 : Stabilité des urines natives. Aires sous la courbe de la métanéphrine et de la métanéphrine-D3 pour cinq urines pures et diluées au dixième à J0, J2, J7, J14 et J30.

	Métanéphrine (counts)					CV (%)
	J0	J2	J7	J14	J30	
Urine 1	1,16E+07	1,29E+07	1,22E+07	1,37E+07	1,38E+07	7,4
Urine 1 1/10 ^{ème}	1,65E+06	1,57E+06	1,60E+06	1,63E+06	1,55E+06	
Urine 2	1,63E+07	1,62E+07	1,69E+07	1,73E+07	1,82E+07	4,8
Urine 2 1/10 ^{ème}	2,17E+06	2,37E+06	2,17E+06	2,28E+06	2,25E+06	
Urine 3	1,94E+07	2,07E+07	2,01E+07	2,16E+07	2,23E+07	5,6
Urine 3 1/10 ^{ème}	2,71E+06	2,72E+06	2,67E+06	2,77E+06	2,56E+06	
Urine 4	2,38E+07	2,26E+07	2,14E+07	2,35E+07	2,54E+07	4,3
Urine 4 1/10 ^{ème}	3,12E+06	3,11E+06	3,29E+06	3,45E+06	3,24E+06	
Urine 5	2,06E+07	2,63E+07	2,71E+07	3,04E+07	2,84E+07	6,2
Urine 5 1/10 ^{ème}	3,31E+06	3,86E+06	3,77E+06	3,87E+06	3,67E+06	

	Métanéphrine-D3 (counts)					CV (%)
	J0	J2	J7	J14	J30	
Urine 1	6,17E+06	6,91E+06	6,66E+06	7,58E+06	7,33E+06	8,0
Urine 1 1/10 ^{ème}	8,90E+06	8,63E+06	8,65E+06	9,48E+06	8,63E+06	
Urine 2	6,14E+06	6,51E+06	6,52E+06	6,72E+06	7,13E+06	5,5
Urine 2 1/10 ^{ème}	8,60E+06	9,57E+06	8,67E+06	9,26E+06	9,17E+06	
Urine 3	6,58E+06	6,72E+06	6,59E+06	7,43E+06	7,15E+06	5,5
Urine 3 1/10 ^{ème}	8,93E+06	8,92E+06	9,18E+06	9,73E+06	8,75E+06	
Urine 4	6,02E+06	6,22E+06	5,64E+06	6,56E+06	6,62E+06	4,4
Urine 4 1/10 ^{ème}	8,63E+06	8,91E+06	9,09E+06	9,71E+06	9,01E+06	
Urine 5	4,74E+06	6,31E+06	6,22E+06	7,34E+06	6,76E+06	5,4
Urine 5 1/10 ^{ème}	8,26E+06	9,25E+06	9,26E+06	9,34E+06	8,61E+06	

Annexe 33 : Concentrations en catécholamines pour dix échantillons urinaires dosés initialement (t_0) et à un temps t .

Dopamine ($\mu\text{g/L}$)			
t	t_0	t	CV (%)
1 an et 2 mois	1180	851	22,9
1 an et 1 mois	180	156	10,1
1 an	579	472	14,4
1 an	487	404	13,2
10 mois	349	281	15,3
8 mois	418	368	9,0
8 mois	1680	1390	13,4
7 mois et demi	55,6	66,6	12,7
7 mois et demi	2150	1790	12,9
5 mois	1150	1460	16,8

Norépinéphrine ($\mu\text{g/L}$)			
t	t_0	t	CV (%)
1 an et 2 mois	15,4	15	1,9
1 an et 1 mois	25,5	21,5	12,0
1 an	34,5	31,7	6,0
1 an	109	94	10,5
10 mois	45,7	41,9	6,1
8 mois	46,1	44,8	2,0
8 mois	29,4	25,3	10,6
7 mois et demi	<3	<3	0,0
7 mois et demi	20,3	18,1	8,1
5 mois	12,7	17,1	20,9

t_0 = premier dosage réalisé sur les urines des patients,

t = temps écoulé entre la date de prélèvement et le redosage,

 : coefficient de variation supérieur à 20%

Annexe 34 : Mode opératoire et résultats du test de stabilité du complexant.

Nous avons préparé le complexant la veille du premier dosage (J0).

A J0, le dosage est réalisé en y incluant trois échantillons supplémentaires différents. Ces trois échantillons sont un contrôle bas (Lyphocheck® Quantitative Urine Control 1, Bio-rad) (Ctrl Niv 1), un contrôle fort « maison » (cf *Matériel et méthode* page 40) (Ctrl Niv 2) et une urine provenant d'un volontaire sain (U3). Le suivi dans le temps de la stabilité du complexant se fera donc sur les valeurs obtenues pour chaque analyte pour ces trois échantillons. Suite au premier dosage, le complexant est conservé à +4°C et sera réutilisé les quatre semaines suivantes.

A J7, la semaine suivante, un nouveau complexant est préparé la veille du second dosage. A J7, la gamme, les contrôles et les patients sont dosés en utilisant ce complexant préparé extemporanément. Nos trois échantillons, en revanche, sont dosés en utilisant le complexant préparé la semaine précédente. Compte tenu du fait que nous avons prouvé la stabilité des échantillons à -20°C sur une période d'un mois, nous pouvons nous dispenser du dosage de ces trois échantillons avec le complexant préparé extemporanément.

Sur le même schéma, à J14, un nouveau complexant est préparé pour réaliser les analyses de routine, et le complexant préparé pour J0 est utilisé pour doser nos trois échantillons.

Il en va de même à J21 et à J28.

µg/L	J0					
	Dopamine	Norépinéphrine	Epinéphrine	3-Méthoxytyramine	Normétanéphrine	Métanéphrine
Ctrl Niv 1	83,9	45,2	13,2	13,8	312	101
Ctrl Niv 2	184	68,8	34,3	193	544	249
U3	120	14,2	4,58	18,5	12,4	18,1

µg/L	J7					
	Dopamine	Norépinéphrine	Epinéphrine	3-Méthoxytyramine	Normétanéphrine	Métanéphrine
Ctrl Niv 1	80,6	45,9	11	13,4	336	95,5
Ctrl Niv 2	205	76	28,6	203	658	276
U3	111	13,6	4,25	18,9	13,6	17,5

µg/L	J14					
	Dopamine	Norépinéphrine	Epinéphrine	3-Méthoxytyramine	Normétanéphrine	Métanéphrine
Ctrl Niv 1	83,6	45,5	11,1	14,2	333	98,4
Ctrl Niv 2	196	75	24,4	200	594	278
U3	129	14,7	6,36	20,3	13,4	19,1

µg/L	J21					
	Dopamine	Norépinéphrine	Epinéphrine	3-Méthoxytyramine	Normétanéphrine	Métanéphrine
Ctrl Niv 1	80,6	46,5	10,8	14,3	327	97,7
Ctrl Niv 2	188	74,6	25,6	202	575	270
U3	126	14,9	5,28	21,5	13,2	19,3

µg/L	J28					
	Dopamine	Norépinéphrine	Epinéphrine	3-Méthoxytyramine	Normétanéphrine	Métanéphrine
Ctrl Niv 1	84,6	48,7	10,7	15,7	345	105
Ctrl Niv 2	214	77,3	25,6	210	632	285
U3	132	15,4	4,67	21,6	13,8	19,7

Par la suite, nous avons comparé les différentes valeurs obtenues entre elles pour chaque composé et pour chaque échantillon sur les cinq techniques de dosage réalisées sur la période d'un mois. Tous les CV sont inférieurs à 20%.

	CV (%)					
	Dopamine	Norépinéphrine	Epinéphrine	3-Méthoxytyramine	Normétanéphrine	Métanéphrine
Ctrl Niv 1	2,3	3,0	9,2	6,1	3,7	3,7
Ctrl Niv 2	6,2	4,4	14,5	3,0	7,5	5,1
U3	6,7	4,7	16,6	7,1	4,1	4,9

Annexe 35 : Dilutions : concentrations en dopamine et CV (n=188).

N° éch	Etendue de mesure :	Dopamine (µg/L)	
		[3 – 299]	CV (%)
1	Pur	374	5,0
	1/10 ^{ème}	380	
	1/20 ^{ème}	354	
2	Pur	1280	0,8
	1/10 ^{ème}	1260	
	1/20 ^{ème}	1274	
3	Pur	373	0,4
	1/10 ^{ème}	352	
	1/20 ^{ème}	354	
4	Pur	130	5,1
	1/10 ^{ème}	121	
	1/20 ^{ème}	128,2	
5	Pur	1390	13,0
	1/10 ^{ème}	1600	
	1/20 ^{ème}	1924	
6	Pur	165	8,2
	1/10 ^{ème}	147	
	1/20 ^{ème}	146,4	
7	Pur	360	3,0
	1/10 ^{ème}	303	
	1/20 ^{ème}	316	
8	Pur	255	3,6
	1/10 ^{ème}	240	
	1/20 ^{ème}	256	
9	Pur	354	3,9
	1/10 ^{ème}	337	
	1/20 ^{ème}	356	
10	Pur	150	12,3
	1/10 ^{ème}	126	
	1/20 ^{ème}	119,4	
11	Pur	304	5,7
	1/10 ^{ème}	264	
	1/20 ^{ème}	286	
12	Pur	259	7,3
	1/10 ^{ème}	230	
	1/20 ^{ème}	228	

N° éch	Etendue de mesure :	Dopamine (µg/L)	
		[3 – 299]	CV (%)
13	Pur	352	8,6
	1/10 ^{ème}	409	
	1/20 ^{ème}	362	
14	Pur	134	1,6
	1/10 ^{ème}	137	
	1/20 ^{ème}	138	
15	Pur	249	6,7
	1/10 ^{ème}	263	
	1/20 ^{ème}	230	
16	Pur	172	5,1
	1/10 ^{ème}	160	
	1/20 ^{ème}	136,6	
17	Pur	831	2,9
	1/10 ^{ème}	1150	
	1/20 ^{ème}	1104	
18	Pur	391	0,2
	1/10 ^{ème}	395	
	1/20 ^{ème}	394	
19	Pur	501	11,2
	1/10 ^{ème}	485	
	1/20 ^{ème}	414	
20	Pur	582	0,2
	1/10 ^{ème}	596	
	1/20 ^{ème}	594	
21	Pur	1170	21,1
	1/10 ^{ème}	1400	
	1/20 ^{ème}	1892	
22	Pur	135	4,9
	1/10 ^{ème}	126	
	1/20 ^{ème}	126,4	
23	Pur	100	5,9
	1/10 ^{ème}	92	
	1/20 ^{ème}	94	
24	Pur	129	18,2
	1/10 ^{ème}	167	
	1/20 ^{ème}	161,8	

N° éch	Etendue de mesure :	Dopamine (µg/L)	
		[3 – 299]	CV (%)
25	Pur	110	6,9
	1/10 ^{ème}	99,8	
	1/20 ^{ème}	98,2	
26	Pur	174	7,3
	1/10 ^{ème}	157	
	1/20 ^{ème}	166,6	
27	Pur	304	4,7
	1/10 ^{ème}	325	
	1/20 ^{ème}	304	
28	Pur	172	2,5
	1/10 ^{ème}	166	
	1/20 ^{ème}	188	
29	Pur	506	5,8
	1/10 ^{ème}	512	
	1/20 ^{ème}	472	
30	Pur	174	1,6
	1/10 ^{ème}	178	
	1/20 ^{ème}	176	
31	Pur	160	2,2
	1/10 ^{ème}	155	
	1/20 ^{ème}	76,4	
32	Pur	156	7,1
	1/10 ^{ème}	141	
	1/20 ^{ème}	149,2	
33	Pur	250	3,2
	1/10 ^{ème}	235	
	1/20 ^{ème}	246	
34	Pur	361	2,5
	1/10 ^{ème}	379	
	1/20 ^{ème}	366	
35	Pur	248,3	4,3
	1/10 ^{ème}	270	
	1/20 ^{ème}	264	
36	Pur	383	0,2
	1/10 ^{ème}	351	
	1/20 ^{ème}	352	
37	Pur	130	5,1
	1/10 ^{ème}	121	
	1/20 ^{ème}	111	
38	Pur	124	3,3
	1/10 ^{ème}	130	
	1/20 ^{ème}	123,8	

N° éch	Etendue de mesure :	Dopamine (µg/L)	
		[3 – 299]	CV (%)
39	Pur	136	3,1
	1/10 ^{ème}	142	
	1/20 ^{ème}	128,8	
40	Pur	239	2,4
	1/10 ^{ème}	228	
	1/20 ^{ème}	234	
41	Pur	375	1,0
	1/10 ^{ème}	343	
	1/20 ^{ème}	348	
42	Pur	157	6,1
	1/10 ^{ème}	144	
	1/20 ^{ème}	142	
43	Pur	508	3,3
	1/10 ^{ème}	524	
	1/20 ^{ème}	500	
44	Pur	176	4,0
	1/10 ^{ème}	169	
	1/20 ^{ème}	162,6	
45	Pur	247	10,4
	1/10 ^{ème}	304	
	1/20 ^{ème}	286	
46	Pur	201	5,1
	1/10 ^{ème}	213	
	1/20 ^{ème}	192,4	
47	Pur	153	0,5
	1/10 ^{ème}	154	
	1/20 ^{ème}	172,8	
48	Pur	123	5,0
	1/10 ^{ème}	132	
	1/20 ^{ème}	132	
49	Pur	137	1,6
	1/10 ^{ème}	134	
	1/20 ^{ème}	137,6	
50	Pur	133	3,6
	1/10 ^{ème}	140	
	1/20 ^{ème}	150,4	
51	Pur	213	6,7
	1/10 ^{ème}	242	
	1/20 ^{ème}	236	
52	Pur	128	7,8
	1/10 ^{ème}	143	
	1/20 ^{ème}	131,8	

N° éch	Etendue de mesure :	Dopamine (µg/L)	
		[3 – 299]	CV (%)
53	Pur	262	9,5
	1/10 ^{ème}	316	
	1/20 ^{ème}	282	
54	Pur	159	1,3
	1/10 ^{ème}	162	
	1/20 ^{ème}	163,4	
55	Pur	96.1	9,5
	1/10 ^{ème}	110	
	1/20 ^{ème}	95,4	
56	Pur	103	0,7
	1/10 ^{ème}	102	
	1/20 ^{ème}	101,6	
57	Pur	217	7,9
	1/10 ^{ème}	225	
	1/20 ^{ème}	252	
58	Pur	93,4	3,8
	1/10 ^{ème}	98,5	
	1/20 ^{ème}	90,8	
59	Pur	894	1,9
	1/10 ^{ème}	1040	
	1/20 ^{ème}	1068	
60	Pur	274	3,5
	1/10 ^{ème}	270	
	1/20 ^{ème}	256	
61	Pur	291	4,9
	1/10 ^{ème}	274	
	1/20 ^{ème}	302	
62	Pur	560	0,5
	1/10 ^{ème}	578	
	1/20 ^{ème}	574	
63	Pur	691	3,1
	1/10 ^{ème}	794	
	1/20 ^{ème}	830	
64	Pur	195	3,4
	1/10 ^{ème}	193	
	1/20 ^{ème}	182,8	
65	Pur	159	1,4
	1/10 ^{ème}	156	
	1/20 ^{ème}	157,6	
66	Pur	163	0,9
	1/10 ^{ème}	161	
	1/20 ^{ème}	152,4	

N° éch	Etendue de mesure :	Dopamine (µg/L)	
		[3 – 299]	CV (%)
67	Pur	147	16,7
	1/10 ^{ème}	116	
	1/20 ^{ème}	83,2	
68	Pur	162	13,4
	1/10 ^{ème}	134	
	1/20 ^{ème}	103	
69	Pur	245	2,6
	1/10 ^{ème}	233	
	1/20 ^{ème}	236	
70	Pur	111,4	2,9
	1/10 ^{ème}	107	
	1/20 ^{ème}	102,8	
71	Pur	100	1,4
	1/10 ^{ème}	98,1	
	1/20 ^{ème}	95	
72	Pur	102	1,4
	1/10 ^{ème}	104	
	1/20 ^{ème}	108,8	
73	Pur	120,8	1,3
	1/10 ^{ème}	123	
	1/20 ^{ème}	125	
74	Pur	128	2,8
	1/10 ^{ème}	123	
	1/20 ^{ème}	141,2	
75	Pur	173	0,8
	1/10 ^{ème}	171	
	1/20 ^{ème}	171,2	
76	Pur	239	4,3
	1/10 ^{ème}	253	
	1/20 ^{ème}	260	
77	Pur	220	6,0
	1/10 ^{ème}	225	
	1/20 ^{ème}	246	
78	Pur	139	1,5
	1/10 ^{ème}	142	
	1/20 ^{ème}	161,8	
79	Pur	893	2,1
	1/10 ^{ème}	1180	
	1/20 ^{ème}	1216	
80	Pur	129	10,2
	1/10 ^{ème}	149	
	1/20 ^{ème}	165,8	

N° éch	Etendue de mesure :	Dopamine (µg/L)	
		[3 – 299]	CV (%)
81	Pur	80,7	11,4
	1/10 ^{ème}	94,9	
	1/20 ^{ème}	119,4	
82	Pur	144	4,8
	1/10 ^{ème}	154	
	1/20 ^{ème}	164,8	
83	Pur	160	8,9
	1/10 ^{ème}	141	
	1/20 ^{ème}	133	
84	Pur	199	4,0
	1/10 ^{ème}	188	
	1/20 ^{ème}	153,4	
85	Pur	176	25,1
	1/10 ^{ème}	123	
	1/20 ^{ème}	134,6	
86	Pur	119	8,2
	1/10 ^{ème}	106	
	1/20 ^{ème}	107,2	
87	Pur	179	11,1
	1/10 ^{ème}	153	
	1/20 ^{ème}	157,8	
88	Pur	146	19,3
	1/10 ^{ème}	111	
	1/20 ^{ème}	110,6	
89	Pur	113	9,9
	1/10 ^{ème}	130	
	1/20 ^{ème}	119,8	
90	Pur	145	0,0
	1/10 ^{ème}	145	
	1/20 ^{ème}	130	
91	Pur	180	2,4
	1/10 ^{ème}	174	
	1/20 ^{ème}	161,2	
92	Pur	250	4,6
	1/10 ^{ème}	261	
	1/20 ^{ème}	238	
93	Pur	201	5,8
	1/10 ^{ème}	179	
	1/20 ^{ème}	188,6	
94	Pur	397	1,4
	1/10 ^{ème}	394	
	1/20 ^{ème}	402	

N° éch	Etendue de mesure :	Dopamine (µg/L)	
		[3 – 299]	CV (%)
95	Pur	230	2,6
	1/10 ^{ème}	219	
	1/20 ^{ème}	228	
96	Pur	139	5,8
	1/10 ^{ème}	128	
	1/20 ^{ème}	126,2	
97	Pur	311	5,4
	1/10 ^{ème}	300	
	1/20 ^{ème}	324	
98	Pur	181	3,2
	1/10 ^{ème}	173	
	1/20 ^{ème}	177,4	
99	Pur	213	6,6
	1/10 ^{ème}	187	
	1/20 ^{ème}	197,6	
100	Pur	200	4,9
	1/10 ^{ème}	187	
	1/20 ^{ème}	182,2	
101	Pur	377	0,2
	1/10 ^{ème}	377	
	1/20 ^{ème}	378	
102	Pur	512	3,1
	1/10 ^{ème}	539	
	1/20 ^{ème}	516	
103	Pur	208	3,4
	1/10 ^{ème}	204	
	1/20 ^{ème}	218	
104	Pur	211	6,0
	1/10 ^{ème}	225	
	1/20 ^{ème}	238	
105	Pur	121	11,8
	1/10 ^{ème}	143	
	1/20 ^{ème}	120,2	
106	Pur	248	7,4
	1/10 ^{ème}	281	
	1/20 ^{ème}	284	
107	Pur	347	1,7
	1/10 ^{ème}	338	
	1/20 ^{ème}	330	
108	Pur	338	0,6
	1/10 ^{ème}	333	
	1/20 ^{ème}	330	

N° éch	Etendue de mesure :	Dopamine (µg/L)	
		[3 – 299]	CV (%)
109	Pur	321	5,5
	1/10 ^{ème}	337	
	1/20 ^{ème}	312	
110	Pur	304	2,0
	1/10 ^{ème}	309	
	1/20 ^{ème}	318	
111	Pur	493	8,9
	1/10 ^{ème}	487	
	1/20 ^{ème}	552	
112	Pur	201	3,7
	1/10 ^{ème}	187	
	1/20 ^{ème}	191	
113	Pur	296	1,7
	1/10 ^{ème}	302	
	1/20 ^{ème}	306	
114	Pur	264	6,5
	1/10 ^{ème}	248	
	1/20 ^{ème}	232	
115	Pur	132	8,5
	1/10 ^{ème}	117	
	1/20 ^{ème}	123,8	
116	Pur	303	2,4
	1/10 ^{ème}	302	
	1/20 ^{ème}	292	
117	Pur	116	4,4
	1/10 ^{ème}	109	
	1/20 ^{ème}	96,4	
118	Pur	260	2,0
	1/10 ^{ème}	251	
	1/20 ^{ème}	260	
119	Pur	88,2	3,4
	1/10 ^{ème}	92,6	
	1/20 ^{ème}	94,2	
120	Pur	273	5,8
	1/10 ^{ème}	249	
	1/20 ^{ème}	278	
121	Pur	333	0,4
	1/10 ^{ème}	342	
	1/20 ^{ème}	344	
122	Pur	349	0,4
	1/10 ^{ème}	330	
	1/20 ^{ème}	328	

N° éch	Etendue de mesure :	Dopamine (µg/L)	
		[3 – 299]	CV (%)
123	Pur	404	1,4
	1/10 ^{ème}	349	
	1/20 ^{ème}	356	
124	Pur	100	6,2
	1/10 ^{ème}	91,6	
	1/20 ^{ème}	90,6	
125	Pur	213	4,9
	1/10 ^{ème}	194	
	1/20 ^{ème}	199,2	
126	Pur	273	6,1
	1/10 ^{ème}	246	
	1/20 ^{ème}	246	
127	Pur	120	0,6
	1/10 ^{ème}	119	
	1/20 ^{ème}	122	
128	Pur	115	7,8
	1/10 ^{ème}	103	
	1/20 ^{ème}	105	
129	Pur	321	3,6
	1/10 ^{ème}	299	
	1/20 ^{ème}	284	
130	Pur	342	4,1
	1/10 ^{ème}	322	
	1/20 ^{ème}	304	
131	Pur	431	2,3
	1/10 ^{ème}	430	
	1/20 ^{ème}	416	
132	Pur	272	7,7
	1/10 ^{ème}	235	
	1/20 ^{ème}	244	
133	Pur	186	13,3
	1/10 ^{ème}	154	
	1/20 ^{ème}	152	
134	Pur	184	5,2
	1/10 ^{ème}	171	
	1/20 ^{ème}	158,8	
135	Pur	455	1,1
	1/10 ^{ème}	431	
	1/20 ^{ème}	438	
136	Pur	481	1,7
	1/10 ^{ème}	422	
	1/20 ^{ème}	432	

N° éch	Etendue de mesure :	Dopamine (µg/L)	
		[3 – 299]	CV (%)
137	Pur	428	1,3
	1/10 ^{ème}	418	
	1/20 ^{ème}	426	
138	Pur	1660	0,8
	1/10 ^{ème}	1680	
	1/20 ^{ème}	1698	
139	Pur	2120	1,0
	1/10 ^{ème}	2150	
	1/20 ^{ème}	2120	
140	Pur	881	3,3
	1/10 ^{ème}	829	
	1/20 ^{ème}	868	
141	Pur	725	0,6
	1/10 ^{ème}	660	
	1/20 ^{ème}	666	
142	Pur	173	5,1
	1/10 ^{ème}	161	
	1/20 ^{ème}	160,2	
143	Pur	112	9,3
	1/10 ^{ème}	98,2	
	1/20 ^{ème}	93,6	
144	Pur	128	7,0
	1/10 ^{ème}	116	
	1/20 ^{ème}	116,4	
145	Pur	213	3,3
	1/10 ^{ème}	220	
	1/20 ^{ème}	206	
146	Pur	141	12,6
	1/10 ^{ème}	118	
	1/20 ^{ème}	88,2	
147	Pur	176	6,7
	1/10 ^{ème}	160	
	1/20 ^{ème}	154,4	
148	Pur	180	6,2
	1/10 ^{ème}	165	
	1/20 ^{ème}	160,8	
149	Pur	115	11,3
	1/10 ^{ème}	98	
	1/20 ^{ème}	104	
150	Pur	110	10,0
	1/10 ^{ème}	95,5	
	1/20 ^{ème}	76,6	

N° éch	Etendue de mesure :	Dopamine (µg/L)	
		[3 – 299]	CV (%)
151	Pur	442	7,2
	1/10 ^{ème}	405	
	1/20 ^{ème}	384	
152	Pur	168	18,0
	1/10 ^{ème}	130	
	1/20 ^{ème}	91,6	
153	Pur	152	23,9
	1/10 ^{ème}	108	
	1/20 ^{ème}	96,2	
154	Pur	1540	23,7
	1/10 ^{ème}	1150	
	1/20 ^{ème}	1612	
155	Pur	1130	2,3
	1/10 ^{ème}	985	
	1/20 ^{ème}	1018	
156	Pur	185	0,6
	1/10 ^{ème}	183	
	1/20 ^{ème}	184,4	
157	Pur	358	7,3
	1/10 ^{ème}	323	
	1/20 ^{ème}	340	
158	Pur	140	20,6
	1/10 ^{ème}	205	
	1/20 ^{ème}	206	
159	Pur	92	1,9
	1/10 ^{ème}	94,5	
	1/20 ^{ème}	93,2	
160	Pur	130	3,3
	1/10 ^{ème}	124	
	1/20 ^{ème}	136	
161	Pur	755	2,4
	1/10 ^{ème}	764	
	1/20 ^{ème}	790	
162	Pur	384	1,3
	1/10 ^{ème}	381	
	1/20 ^{ème}	374	
163	Pur	298	1,6
	1/10 ^{ème}	305	
	1/20 ^{ème}	296	
164	Pur	231	5,6
	1/10 ^{ème}	213	
	1/20 ^{ème}	208	



N° éch	Etendue de mesure :	Dopamine (µg/L)	
		[3 – 299]	CV (%)
165	Pur	113	1,3
	1/10 ^{ème}	111	
	1/20 ^{ème}	116,8	
166	Pur	106	1,4
	1/10 ^{ème}	104	
	1/20 ^{ème}	110,4	
167	Pur	421	3,7
	1/10 ^{ème}	430	
	1/20 ^{ème}	408	
168	Pur	140	5,8
	1/10 ^{ème}	152	
	1/20 ^{ème}	145	
169	Pur	153	2,4
	1/10 ^{ème}	148	
	1/20 ^{ème}	133,8	
170	Pur	353	1,0
	1/10 ^{ème}	345	
	1/20 ^{ème}	340	
171	Pur	358	3,9
	1/10 ^{ème}	353	
	1/20 ^{ème}	334	
172	Pur	366	5,6
	1/10 ^{ème}	368	
	1/20 ^{ème}	340	
173	Pur	94,8	10,5
	1/10 ^{ème}	110	
	1/20 ^{ème}	99,8	
174	Pur	153	32,6
	1/10 ^{ème}	280	
	1/20 ^{ème}	181,2	
175	Pur	139	2,6
	1/10 ^{ème}	134	
	1/20 ^{ème}	121,2	
176	Pur	155	0,9
	1/10 ^{ème}	153	
	1/20 ^{ème}	144	
177	Pur	173	6,2
	1/10 ^{ème}	196	
	1/20 ^{ème}	185,8	
178	Pur	119	12,0
	1/10 ^{ème}	141	
	1/20 ^{ème}	120,6	

N° éch	Etendue de mesure :	Dopamine (µg/L)	
		[3 – 299]	CV (%)
179	Pur	133	3,8
	1/10 ^{ème}	126	
	1/20 ^{ème}	131	
180	Pur	397	3,9
	1/10 ^{ème}	373	
	1/20 ^{ème}	394	
181	Pur	121	2,4
	1/10 ^{ème}	117	
	1/20 ^{ème}	125,6	
182	Pur	93	5,8
	1/10 ^{ème}	101	
	1/20 ^{ème}	94,6	
183	Pur	181	2,4
	1/10 ^{ème}	175	
	1/20 ^{ème}	175,6	
184	Pur	701	27,2
	1/10 ^{ème}	1310	
	1/20 ^{ème}	888	
185	Pur	362	4,5
	1/10 ^{ème}	354	
	1/20 ^{ème}	332	
186	Pur	269	0,6
	1/10 ^{ème}	267	
	1/20 ^{ème}	266	
187	Pur	187	22,8
	1/10 ^{ème}	135	
	1/20 ^{ème}	138	
188	Pur	386	0,6
	1/10 ^{ème}	389	
	1/20 ^{ème}	386	

: valeur inférieure à la limite de quantification
 : valeur supérieure à l'étendue de mesure
 : coefficient de variation supérieur à 20%



Annexe 36 : Dilutions : concentrations en norépinéphrine et CV (n=8).

N° éch	Etendue de mesure :	Norépinéphrine (µg/L)	
		[3 – 206]	CV (%)
1	Pur	1620	0,8
	1/10 ^{ème}	1680	
	1/20 ^{ème}	1700	
2	Pur	353	3,1
	1/10 ^{ème}	370	
	1/20 ^{ème}	374	
3	Pur	380	7,2
	1/10 ^{ème}	337	
	1/20 ^{ème}	336	
4	Pur	121	1,2
	1/10 ^{ème}	123	
	1/20 ^{ème}	97,8	
5	Pur	191	6,6
	1/10 ^{ème}	174	
	1/20 ^{ème}	162,2	
6	Pur	127	4,8
	1/10 ^{ème}	136	
	1/20 ^{ème}	111,6	
7	Pur	120,4	3,2
	1/10 ^{ème}	126	
	1/20 ^{ème}	120,4	
8	Pur	1680	2,5
	1/10 ^{ème}	1530	
	1/20 ^{ème}	1586	

 : valeur inférieure à la limite de quantification
 : valeur supérieure à l'étendue de mesure

Annexe 37 : Dilutions : concentrations en épinéphrine et CV (n=3).

N° éch	Etendue de mesure :	Epinéphrine (µg/L)	
		[3 – 95]	CV (%)
1	Pur	293	8,9
	1/10 ^{ème}	291	
	1/20 ^{ème}	330	
2	Pur	58,9	14,0
	1/10 ^{ème}	48,3	
	1/20 ^{ème}	36,2	
3	Pur	64,8	8,1
	1/10 ^{ème}	64,3	
	1/20 ^{ème}	74	



 : valeur inférieure à la limite de quantification
 : valeur supérieure à l'étendue de mesure

Annexe 38 : Dopamine : résultats du test de l'influence du pH urinaire.

	Nom de l'échantillon	Dopamine (µg/L)	
U5Ø	U5ØpH5	56	CV (%) = 6,7 Moyenne = 55
	U5ØpH3	51	
	U5ØpH1	58	
U5Niv1	U5Niv1pH5	179	CV (%) = 1,9 Moyenne = 183
	U5Niv1pH3	186	
	U5Niv1pH1	183	
U5Niv2	U5Niv2pH5	344	CV (%) = 3,7 Moyenne = 356
	U5Niv2pH3	370	
	U5Niv2pH1	354	
U8Ø	U8ØpH8	48	Rendement (%) = 78
	U8ØpH7	61,3	CV (%) = 10,7
	U8ØpH5	62,3	Moyenne = 62 CV corrigé (%) = 3,8
	U8ØpH3	58,8	
	U8ØpH1	64,4	
U8Niv1	U8Niv1pH8	72	Rendement (%) = 42
	U8Niv1pH7	170	CV (%) = 29,4
	U8Niv1pH5	163	Moyenne = 171 CV corrigé (%) = 3,3
	U8Niv1pH3	175	
	U8Niv1pH1	175	
U8Niv2	U8Niv2pH7	232	Rendement (%) = 68
	U8Niv2pH5	340	CV (%) = 17,7
	U8Niv2pH3	347	Moyenne = 343
	U8Niv2pH1	343	CV corrigé (%) = 1,0

Comparaison urines pH=5 vs urines pH=8
Urines non surchargées : CV (%) = 8,0
Urines surcharge faible : CV (%) = 4,8
Urines surcharge forte : CV (%) = 2,6

Comparaison des valeurs entre les urines recueillies à pH égal à 5 et celles à pH égal à 8 pour les différents niveaux de surcharge.



 : valeur aberrante
 : CV non satisfaisant

Annexe 39 : Norépinéphrine : résultats du test de l'influence du pH urinaire.

	Nom de l'échantillon	Norépinéphrine ($\mu\text{g/L}$)	
U5 \emptyset	U5 \emptyset pH5	9,6	CV (%) = 5,0 Moyenne = 9,4
	U5 \emptyset pH3	8,8	
	U5 \emptyset pH1	9,7	
U5Niv1	U5Niv1pH5	49	CV (%) = 1,3 Moyenne = 48
	U5Niv1pH3	49	
	U5Niv1pH1	48	
U5Niv2	U5Niv2pH5	104	CV (%) = 2,5 Moyenne = 106
	U5Niv2pH3	109	
	U5Niv2pH1	105	
U8 \emptyset	U8 \emptyset pH8	9,6	CV (%) = 4,5 Moyenne = 10
	U8 \emptyset pH7	10,5	
	U8 \emptyset pH5	10,3	
	U8 \emptyset pH3	10,2	
	U8 \emptyset pH1	9,5	
U8Niv1	U8Niv1pH8	34	Rendement (%) = 75 CV (%) = 12,6 Moyenne = 46 CV corrigé (%) = 3,7
	U8Niv1pH7	47	
	U8Niv1pH5	42	
	U8Niv1pH3	46	
	U8Niv1pH1	47	
U8Niv2	U8Niv2pH7	88	Rendement (%) = 83 CV (%) = 9,0 Moyenne = 106 CV corrigé (%) = 0,6
	U8Niv2pH5	105	
	U8Niv2pH3	106	
	U8Niv2pH1	106	

Comparaison urines pH=5 vs urines pH=8
Urines non surchargées : CV (%) = 4,8
Urines surcharge faible : CV (%) = 4,2
Urines surcharge forte : CV (%) = 0,2

Comparaison des valeurs entre les urines recueillies à pH égal à 5 et celles à pH égal à 8 pour les différents niveaux de surcharge.

 : valeur aberrante
 : CV non satisfaisant

Annexe 40 : Données sur les interférences analytiques vis-à-vis des catécholamines et des dérivés méthoxylés dans le plasma (36).

Potential interferent	MW (g/mol)	Full scan (t_R , min)	MRM (t_R , min)	Ion(s) observed (m/z)
Hemolysis	N/A	Not found	Not found	-
Icterus	585	Not found	Not found	-
Lipemia (inralipid)	N/A	Not found	Not found	-
Acetaminophen	151	Not found	Not found	-
Amphetamine	135	Not found	Not found	-
Caffeine	194	Not found	Not found	-
Carbidopa	226	Not found	Not found	-
Cimetidine	252	1.75	Not found	253, 159, 117
Diazepam	285	Not found	Not found	-
L-Dopa	197	Not found	Not found	-
Dopamine	153	Not found	Not found	-
Ephedrine	165	1.66	Not found	166, 148
Epinephrine	183	Not found	Not found	-
Hydralazine	160	Not found	Not found	-
Isoetharine	239	1.7	Not found	-
Isoproterenol	211	1.7	1.6-1.8 (met quant/qual)	240, 222
Labetalol	328	1.59	1.6-1.8 (normet quant)	212, 194, 152
Metanephrine	197	Not monitored	1.59 (met qual)	329, 311
Methamphetamine	149	1.65	1.75	180, 148, 120
MDA	179	1.65	Not found	150, 119
MDMA	193	1.65	1.65 (met and normet quant)	180, 163
Nicotine	162	Not found	1.66 (normet quant)	194, 163
Norepinephrine	169	Not found	Not found	-
Normetanephrine	183	Not monitored	1.75	166, 134, 121
Phenoxybenzamine	304	Not found	Not found	-
L-Phenylalanine	165	Not found	Not found	-
Pseudoephedrine	165	1.39	1.38 (met quant)	166, 148
Serotonin	176	Not found	Not found	-
Sodium salicylate	160	Not found	Not found	-
Theobromine	180	Not found	Not found	-
L-Tyrosine	181	Not found	Not found	-

Annexe 41 : Fiche de recueil et d'information et fiche d'entrée d'étude fournies aux douze volontaires sains dans le cadre d'une recherche d'interférences dues à un aliment en particulier.

Fiche de recueil et d'information

Initiales sujet	
Age sujet	
Date entrée d'étude	

TEMPS 1 : URINES CONTROLES

1. Avant le prélèvement :

REGIME ALIMENTAIRE : éviter dans les **48 heures** précédant le prélèvement la consommation des aliments interférents c'est-à-dire banane, chocolat, fruits secs, agrumes, avocat, tomate, prune, kiwi, ananas, mollusques et vanille ; et une consommation modérée de café et de thé.

2. Pendant le prélèvement :

- Continuer le régime alimentaire le jour du prélèvement. Le régime dure donc **72 heures** au total.
- Pour les adultes, l'analyse est réalisée sur les **urines de 24 heures**.
- Pour les enfants, l'analyse est réalisée sur une miction.
- Conserver les urines à température ambiante pendant le recueil dans le flacon fourni.

3. Après le prélèvement :

- Conserver les urines à température ambiante jusqu'à la récupération par le laboratoire.
- Le régime alimentaire peut être suspendu.

TEMPS 2 : URINES + ALIMENT INTERFERENT

1. Avant le prélèvement :

REGIME ALIMENTAIRE : reprise du régime sur **48 heures** précédant le prélèvement sauf pour **1 aliment déterminé** qui sera consommé en grande quantité durant ces 48 heures.

Aliment choisi	
----------------	--

2. Pendant le prélèvement :

- Continuer le régime alimentaire le jour du prélèvement. Le régime dure donc **72 heures** au total.
- Pour les adultes, l'analyse est réalisée sur les **urines de 24 heures**.
- Pour les enfants, l'analyse est réalisée sur une miction.
- Conserver les urines à température ambiante pendant le recueil dans le flacon fourni.

3. Après le prélèvement :

- Conserver les urines à température ambiante jusqu'à la récupération par le laboratoire.
- Le régime alimentaire peut être suspendu.

Fiche d'entrée d'étude

date	
------	--

Tout d'abord je tiens à vous remercier d'avoir accepté de participer à cette étude qui rentre dans le cadre de mon stage TER mais surtout qui permettra de préciser les résultats d'analyses biologiques en ce qui concerne le dosage des catécholamines et leurs dérivés dans les urines des patients.

Pour le bon déroulement de l'étude, je vous dépose aujourd'hui les 2 bidons qui serviront pour le recueil des urines de 24h.

- Le 1er bidon servira pour le **temps 1** de l'étude cad pour le recueil des **urines contrôles**
- Le 2nd bidon servira pour le **temps 2** de l'étude cad pour le recueil des **urines + l'aliment interférent** que vous aurez choisi (distribution en début de semaine prochaine)

Vous pouvez réaliser l'expérience quand vous le souhaitez, mais nous devons récupérer impérativement tous les bidons au plus tard pour le **20 juin 2017** afin de commencer le traitement et l'analyse.

Pour rappel l'étude se déroule ainsi :

- **1^{er} temps** : Vous vous **privez des 13 aliments** de la liste pendant 3 jours au total. Sur le 3^{ème} jour vous récupérez vos urines sur 24 heures.
- **2^{ème} temps** : Vous vous privez de 12 aliments parmi les 13 et vous **prenez en grande quantité l'aliment que vous aurez choisi** sur 3 jours (au minimum 3 portions de l'aliment par jour). Sur le 3^{ème} jour vous récupérez vos urines sur 24 heures.

Pour toute question contactez-moi via alexandre.stoerkler@gmail.com

Annexe 42 : Concentrations en catécholamines et dérivés méthoxylés obtenues avant et après régime riche en l'aliment considéré.

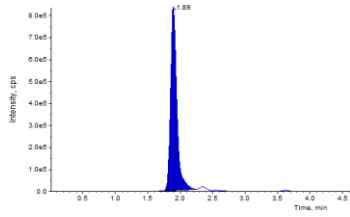
Cav, Cap en µg/L ; CV en %		Agrumes	Kiwis	Vanille	Bananes	Ananas	Gruyère	Tomates	Avocats	Noix	Chocolat	Café	Thé
Dopamine	Cav	121,0	177,0	204,0	218,0	142,0	461,0	254,0	69,2	240,0	220,0	136,0	129,0
	Cap	103,0	213,0	183,0	399,0	188,0	435,0	293,0	83,3	357,0	275,0	231,0	120,0
	CV	11,4	13,1	7,7	41,5	19,7	4,1	10,1	13,1	27,7	15,7	36,6	5,1
Norépinéphrine	Cav	18,8	14,0	20,7	17,2	10,9	39,7	75,1	12,1	41,9	43,2	32,3	11,0
	Cap	16,1	24,1	22,2	32,0	17,7	72,3	113,0	16,0	53,1	44,4	56,5	14,2
	CV	10,9	37,5	4,9	42,5	33,6	41,2	28,5	19,6	16,7	1,9	38,5	18,0
Epinéphrine	Cav	3,1	<3	<3	<3	<3	15,0	<3	<3	12,6	5,3		
	Cap	4,4	<3	<3	3,4	6,3	<3	7,4	<3	13,9	<3		
	CV	23,7	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	6,9	NA		
3-Méthoxytyramine	Cav	18,8	32,4	23,3	38,6	22,0	49,0	47,3	10,5	36,8	37,1	21,9	17,9
	Cap	16,2	39,3	25,8	84,9	33,0	73,1	44,2	13,2	63,6	42,5	31,8	18,5
	CV	10,5	13,6	7,2	53,0	28,3	27,9	4,8	16,1	37,7	9,6	26,1	2,3
Normétanéphrine	Cav	11,3	13,5	16,5	14,2	11,2	28,4	42,1	10,0	33,1	35,9	25,1	9,7
	Cap	8,9	19,7	16,5	19,9	18,4	42,9	55,9	12,5	47,5	41,6	48,3	12,4
	CV	17,0	26,4	0,0	23,6	34,4	28,8	19,9	15,7	25,3	10,4	44,7	17,5
Méтанéphrine	Cav	17,6	19,2	7,7	11,5	19,1	53,2	18,9	9,4	34,3	30,9	20,7	17,0
	Cap	15,5	27,4	7,9	26,9	28,8	58,2	24,8	11,3	50,9	29,0	45,6	18,1
	CV	9,0	24,9	2,0	56,7	28,6	6,3	19,1	13,3	27,6	4,5	53,1	4,4

Cav = concentration avant régime riche en l'aliment considéré

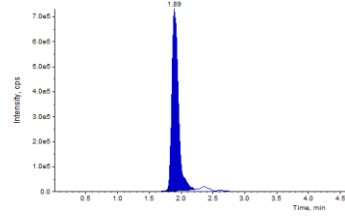
Cap = concentration après régime riche en l'aliment considéré

Annexe 43 : Chromatogrammes des catécholamines et dérivés méthoxylés avant et après consommation d'agrumes.

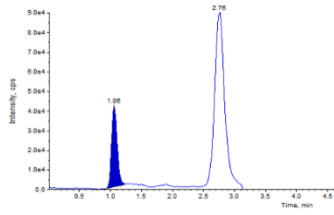
Dopamine avant :



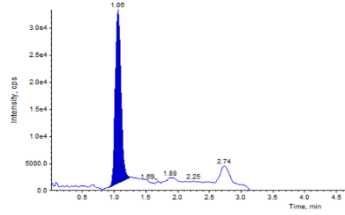
Dopamine après :



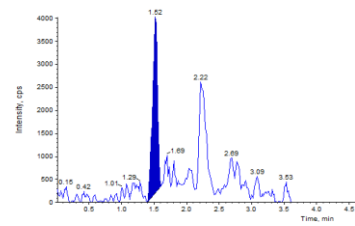
Norépinéphrine avant :



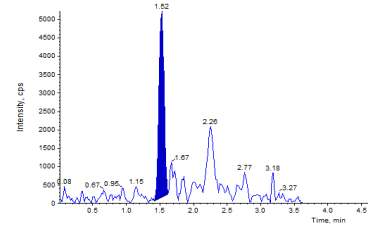
Norépinéphrine après :



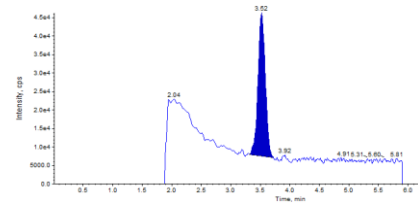
Epinéphrine avant :



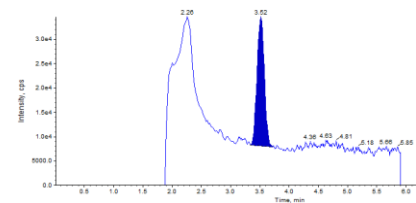
Epinéphrine après :



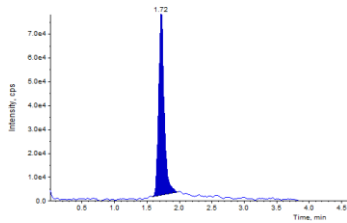
3-Méthoxytyramine avant :



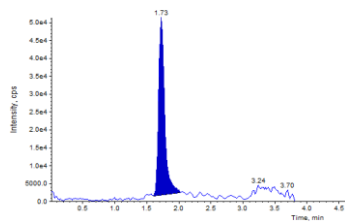
3-Méthoxytyramine après :



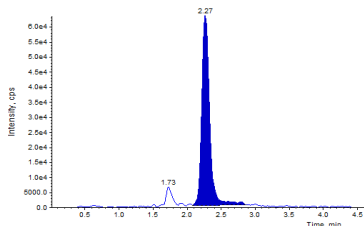
Normétanéphrine avant :



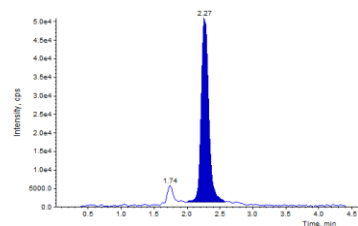
Normétanéphrine après :



Métanéphrine avant :

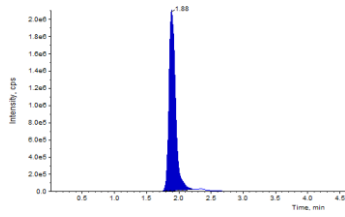


Métanéphrine après :

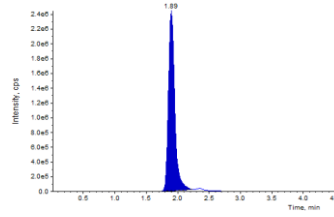


Annexe 44 : Chromatogrammes des catécholamines et dérivés méthoxylés avant et après consommation de kiwis.

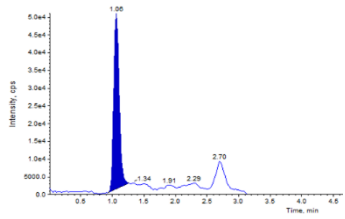
Dopamine avant :



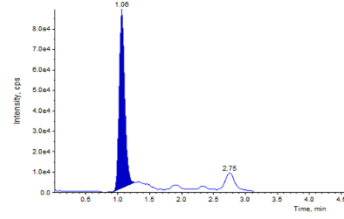
Dopamine après :



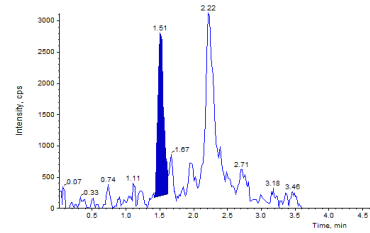
Norépinéphrine avant :



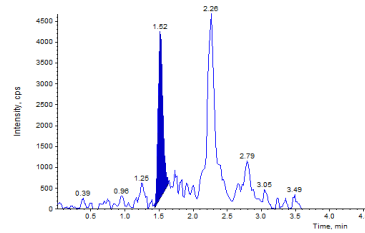
Norépinéphrine après :



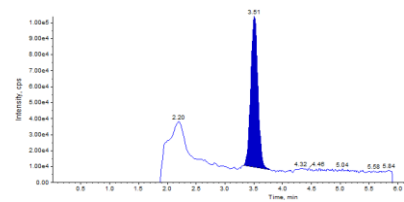
Epinéphrine avant :



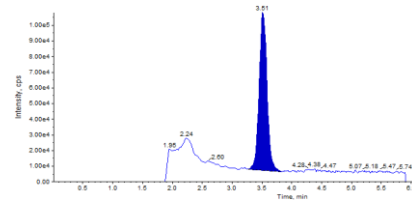
Epinéphrine après :



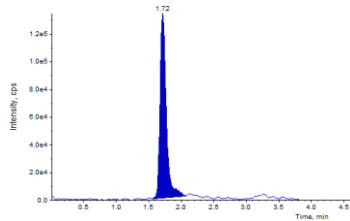
3-Méthoxytyramine avant :



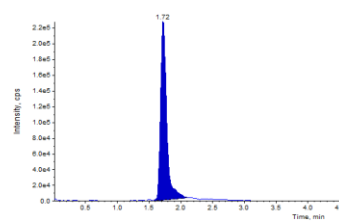
3-Méthoxytyramine après :



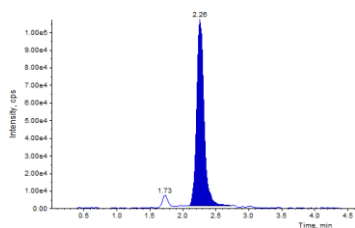
Normétanéphrine avant :



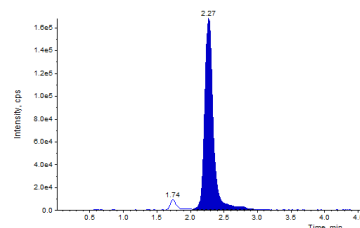
Normétanéphrine après :



Métanéphrine avant :

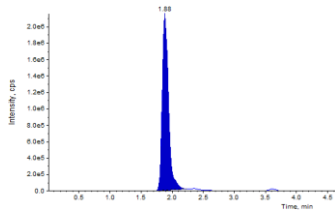


Métanéphrine après :

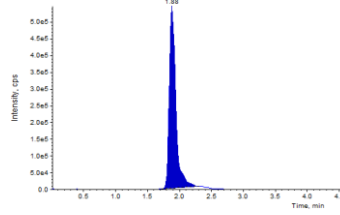


Annexe 45 : Chromatogrammes des catécholamines et dérivés méthoxylés avant et après consommation de vanille.

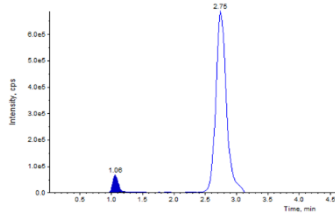
Dopamine avant :



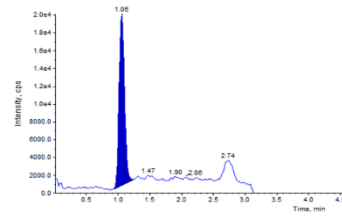
Dopamine après :



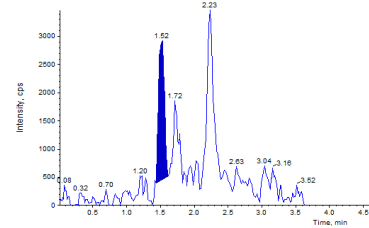
Norépinéphrine avant :



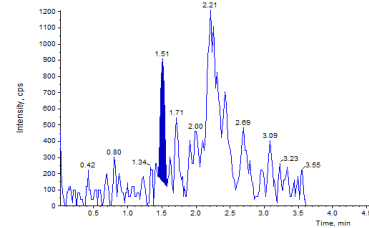
Norépinéphrine après :



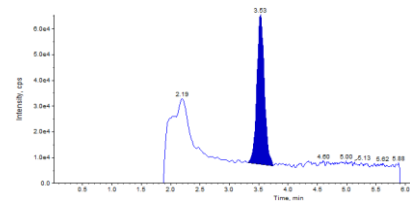
Epinéphrine avant :



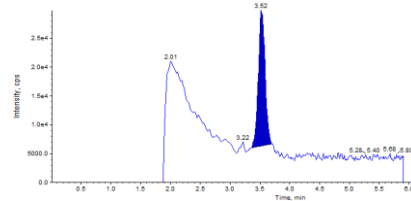
Epinéphrine après :



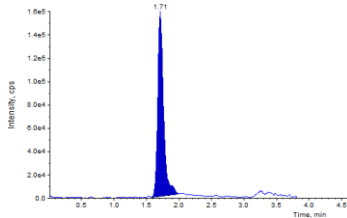
3-Méthoxytyramine avant :



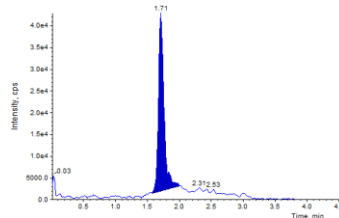
3-Méthoxytyramine après :



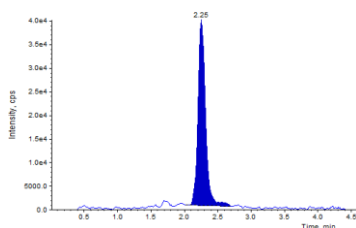
Normétanéphrine avant :



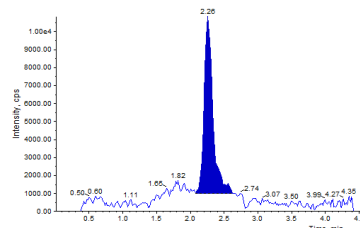
Normétanéphrine après :



Métanéphrine avant :

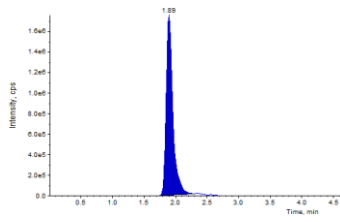


Métanéphrine après :

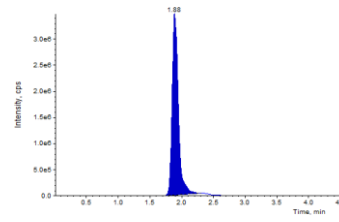


Annexe 46 : Chromatogrammes des catécholamines et dérivés méthoxylés avant et après consommation de bananes.

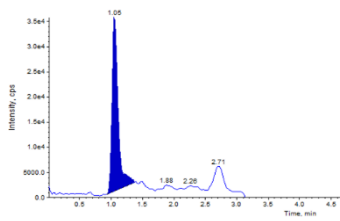
Dopamine avant :



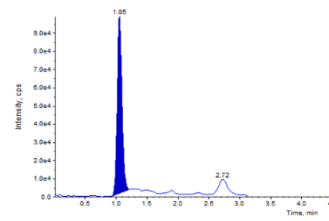
Dopamine après :



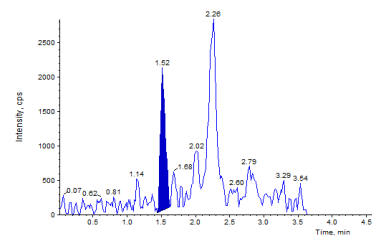
Norépinéphrine avant :



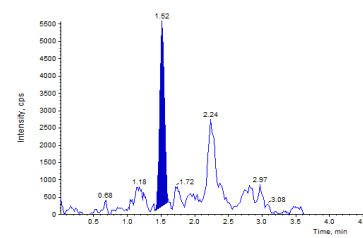
Norépinéphrine après :



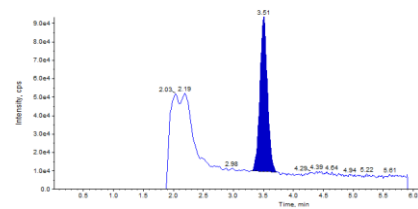
Epinéphrine avant :



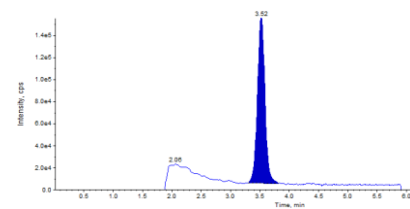
Epinéphrine après :



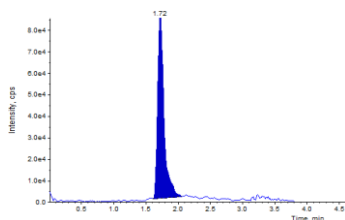
3-Méthoxytyramine avant :



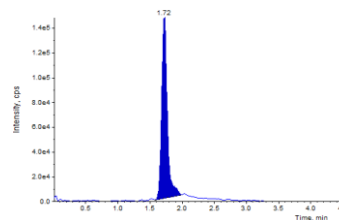
3-Méthoxytyramine après :



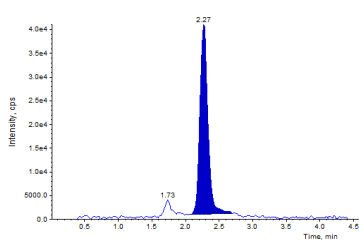
Normétanéphrine avant :



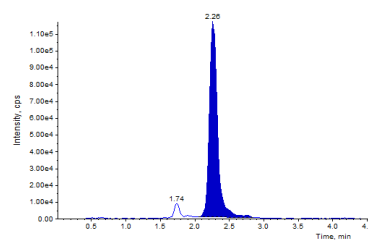
Normétanéphrine après :



Métanéphrine avant :

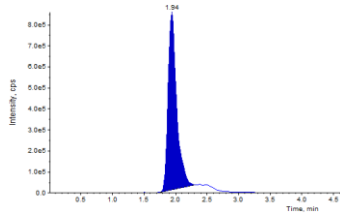


Métanéphrine après :

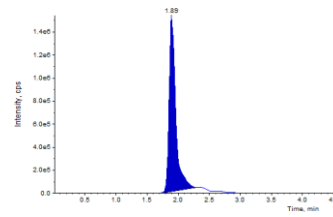


Annexe 47 : Chromatogrammes des catécholamines et dérivés méthoxylés avant et après consommation d'ananas.

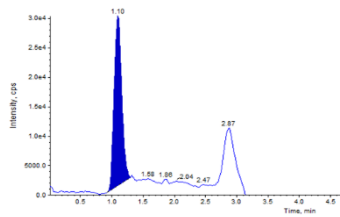
Dopamine avant :



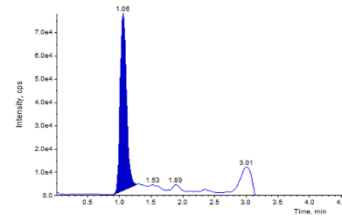
Dopamine après :



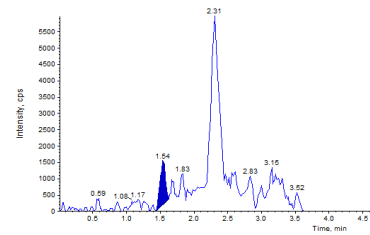
Norépinéphrine avant :



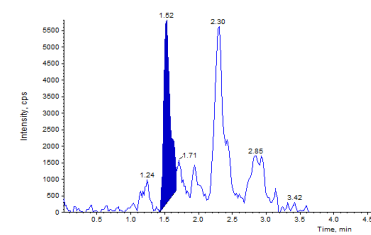
Norépinéphrine après :



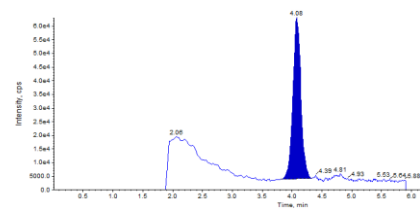
Epinéphrine avant :



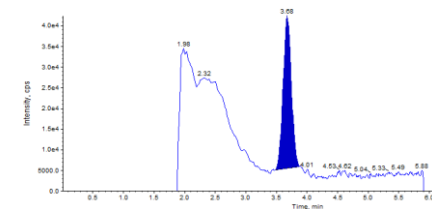
Epinéphrine après :



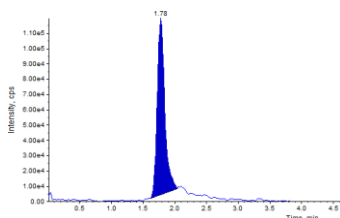
3-Méthoxytyramine avant :



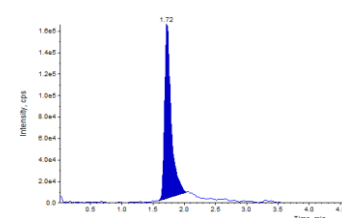
3-Méthoxytyramine après :



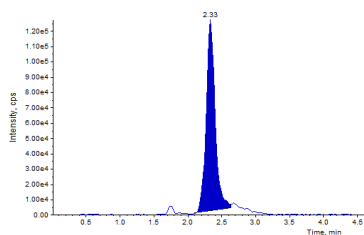
Normétanéphrine avant :



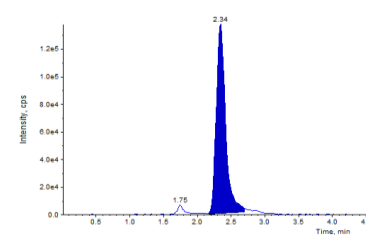
Normétanéphrine après :



Métanéphrine avant :

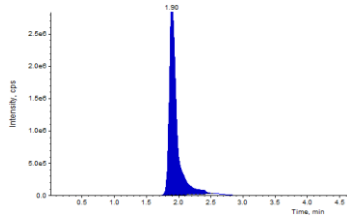


Métanéphrine après :

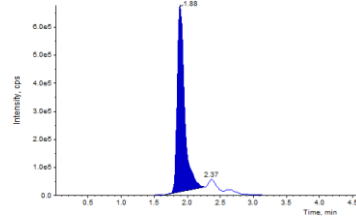


Annexe 48 : Chromatogrammes des catécholamines et dérivés méthoxylés avant et après consommation de gruyère.

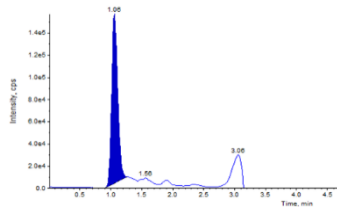
Dopamine avant :



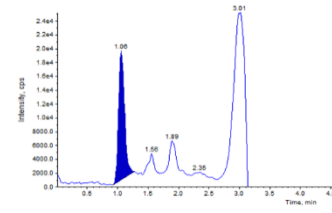
Dopamine après :



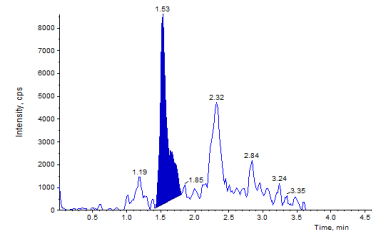
Norépinéphrine avant :



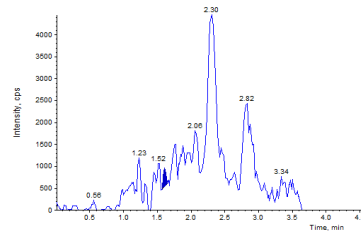
Norépinéphrine après :



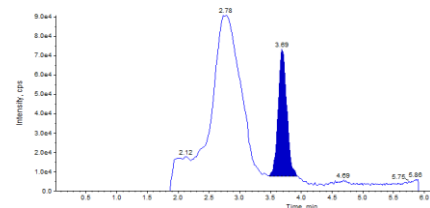
Epinéphrine avant :



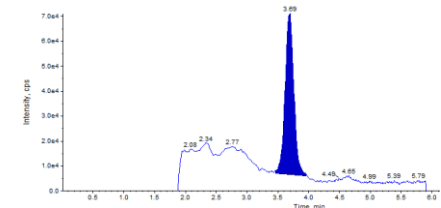
Epinéphrine après :



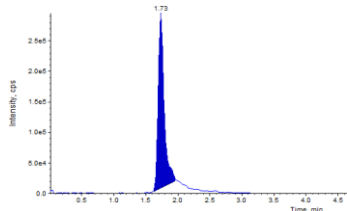
3-Méthoxytyramine avant :



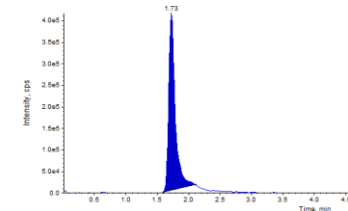
3-Méthoxytyramine après :



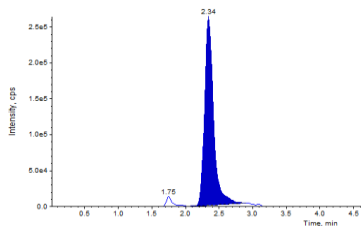
Normétanéphrine avant :



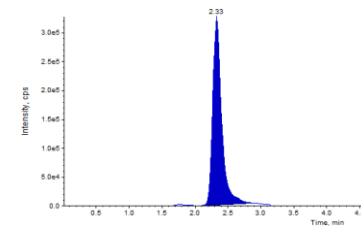
Normétanéphrine après :



Métanéphrine avant :

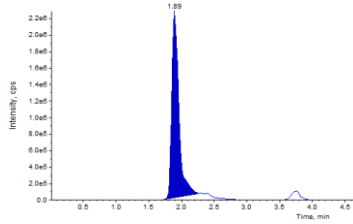


Métanéphrine après :

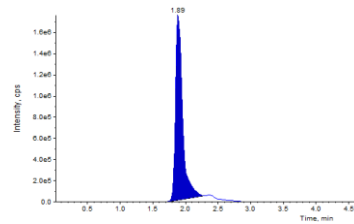


Annexe 49 : Chromatogrammes des catécholamines et dérivés méthoxylés avant et après consommation de tomates.

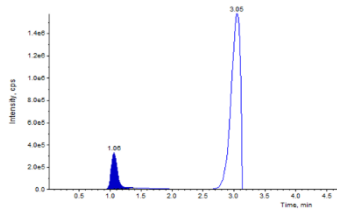
Dopamine avant :



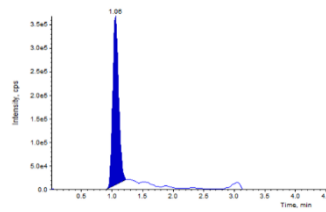
Dopamine après :



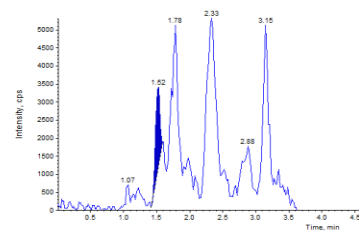
Norépinéphrine avant :



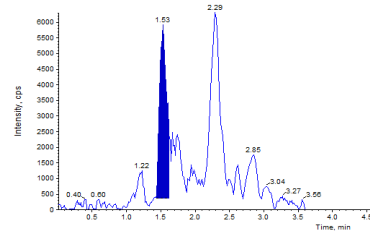
Norépinéphrine après :



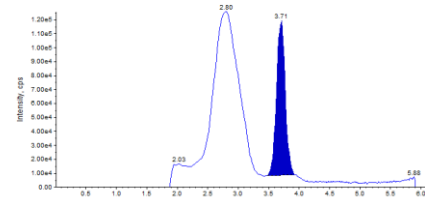
Epinéphrine avant :



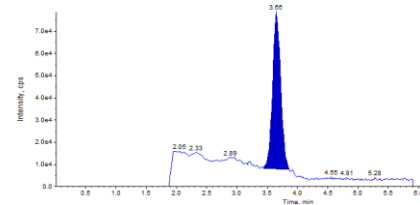
Epinéphrine après :



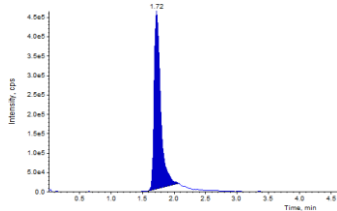
3-Méthoxytyramine avant :



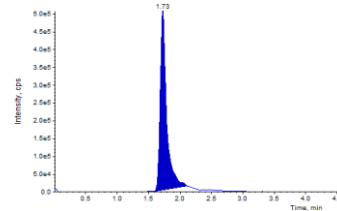
3-Méthoxytyramine après :



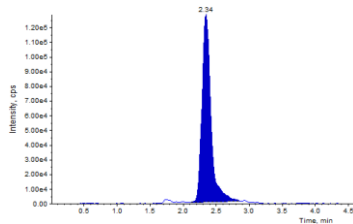
Normétanéphrine avant :



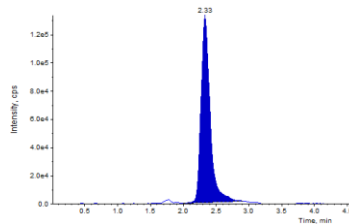
Normétanéphrine après :



Métanéphrine avant :

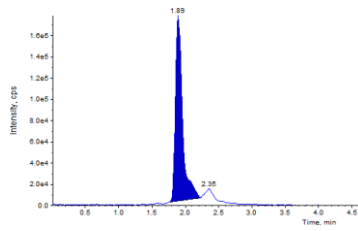


Métanéphrine après :

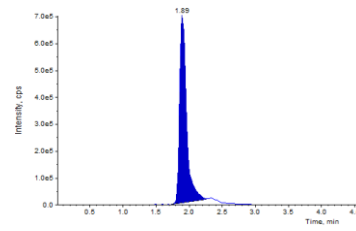


Annexe 50 : Chromatogrammes des catécholamines et dérivés méthoxylés avant et après consommation d'avocats.

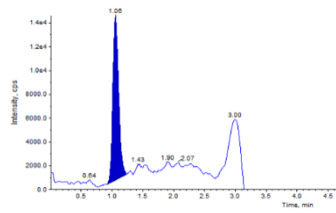
Dopamine avant :



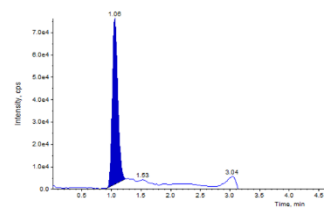
Dopamine après :



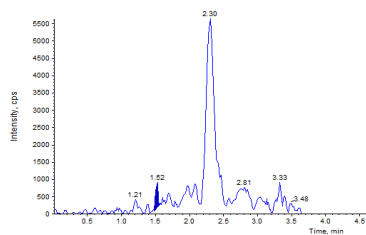
Norépinéphrine avant :



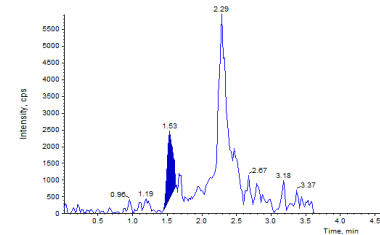
Norépinéphrine après :



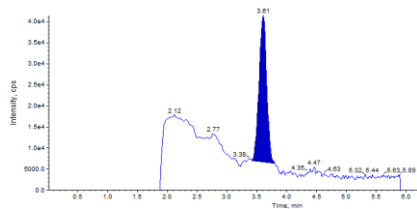
Epinéphrine avant :



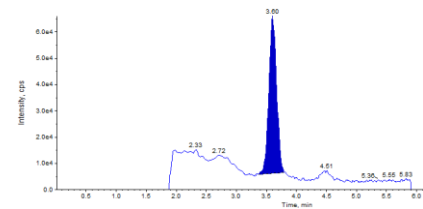
Epinéphrine après :



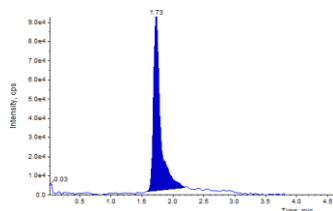
3-Méthoxytyramine avant :



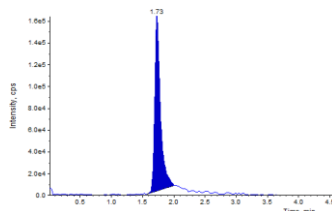
3-Méthoxytyramine après :



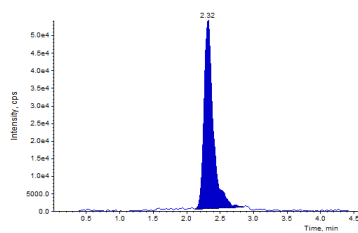
Normétanéphrine avant :



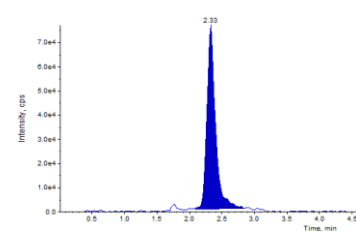
Normétanéphrine après :



Métanéphrine avant :

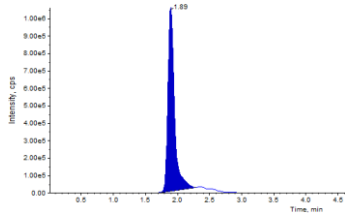


Métanéphrine après :

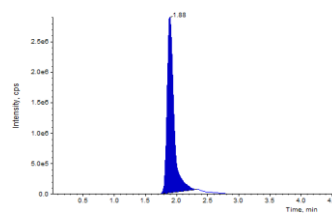


Annexe 51 : Chromatogrammes des catécholamines et dérivés méthoxylés avant et après consommation de noix.

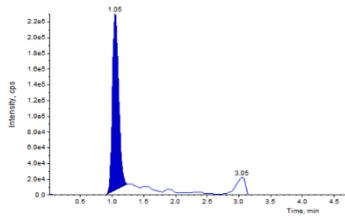
Dopamine avant :



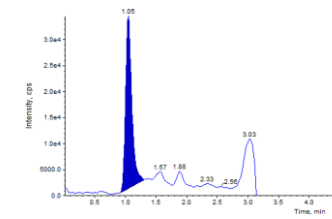
Dopamine après :



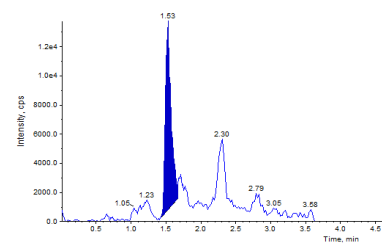
Norépinéphrine avant :



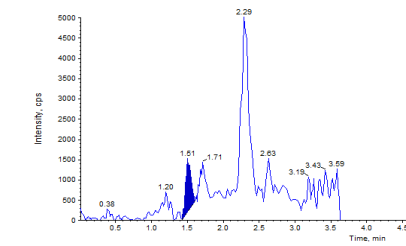
Norépinéphrine après :



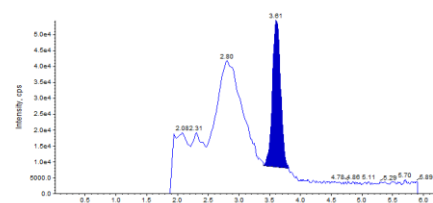
Epinéphrine avant :



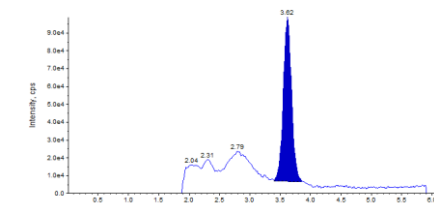
Epinéphrine après :



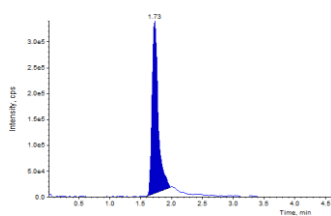
3-Méthoxytyramine avant :



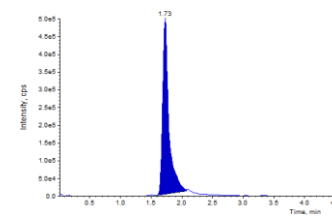
3-Méthoxytyramine après :



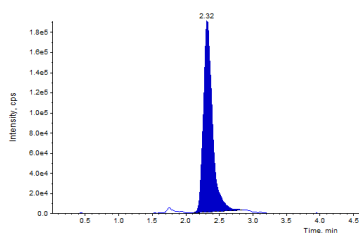
Normétanéphrine avant :



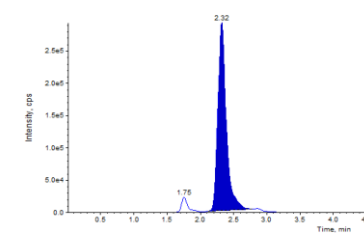
Normétanéphrine après :



Métanéphrine avant :

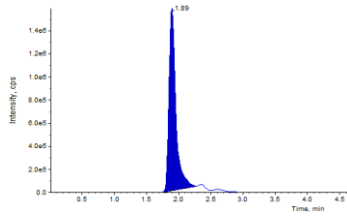


Métanéphrine après :

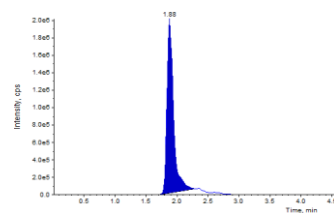


Annexe 52 : Chromatogrammes des catécholamines et dérivés méthoxylés avant et après consommation de chocolat.

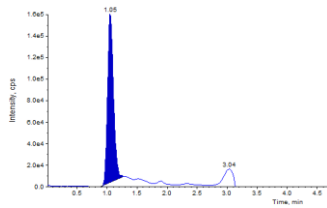
Dopamine avant :



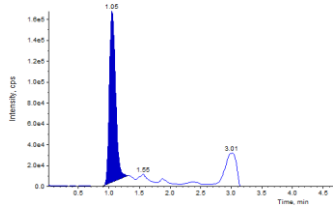
Dopamine après :



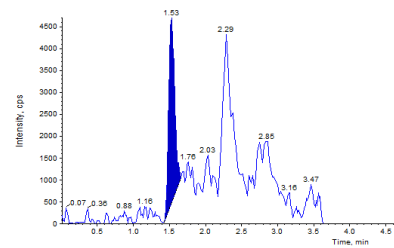
Norépinéphrine avant :



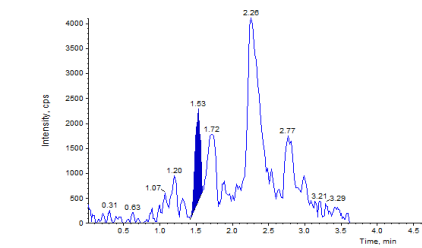
Norépinéphrine après :



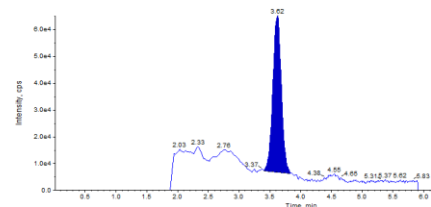
Epinéphrine avant :



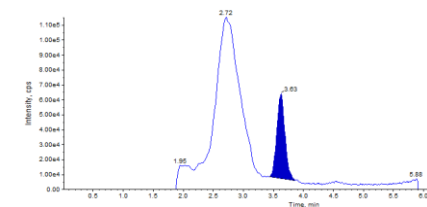
Epinéphrine après :



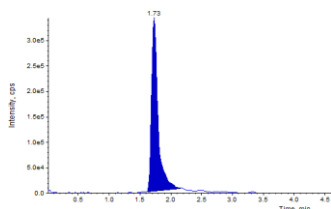
3-Méthoxytyramine avant :



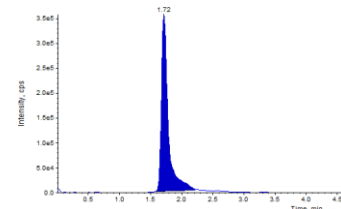
3-Méthoxytyramine après :



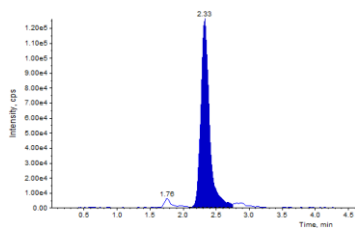
Normétanéphrine avant :



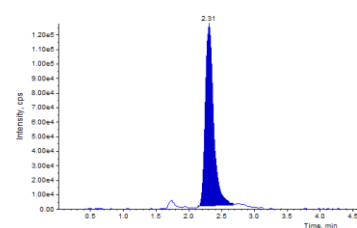
Normétanéphrine après :



Métanéphrine avant :

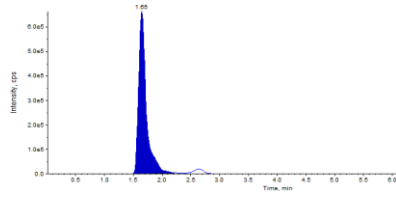


Métanéphrine après :

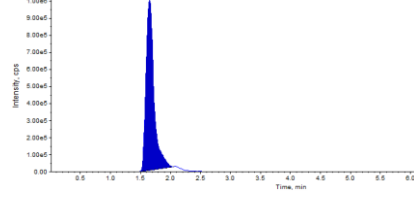


Annexe 53 : Chromatogrammes des catécholamines et dérivés méthoxylés avant et après consommation de café.

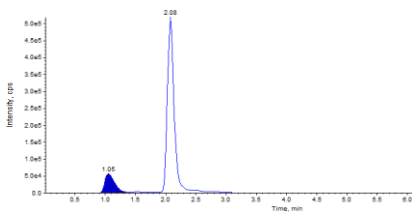
Dopamine avant :



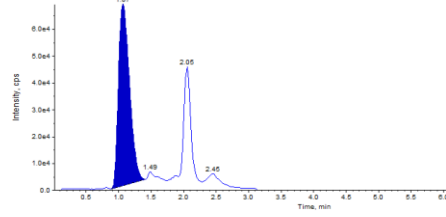
Dopamine après :



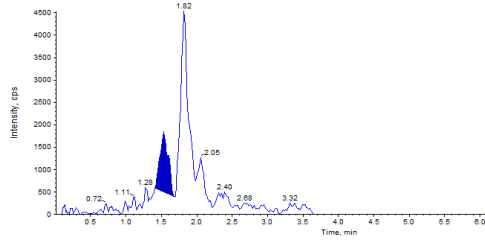
Norépinéphrine avant :



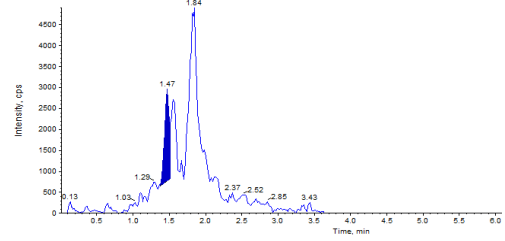
Norépinéphrine après :



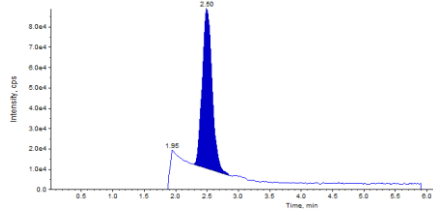
Epinéphrine avant :



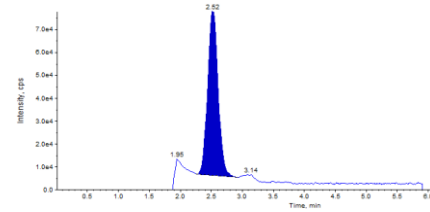
Epinéphrine après :



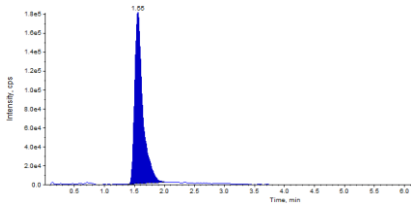
3-Méthoxytyramine avant :



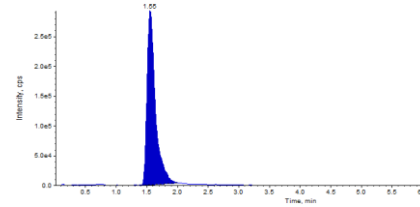
3-Méthoxytyramine après :



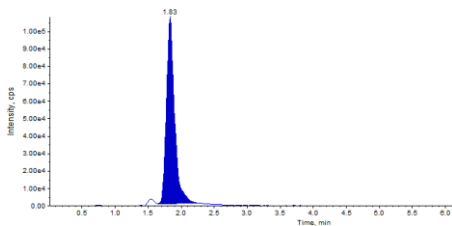
Normétanéphrine avant :



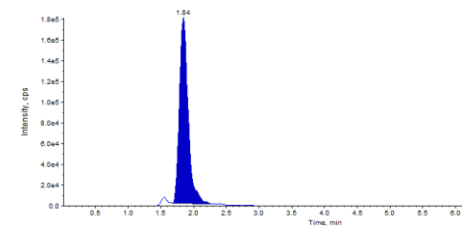
Normétanéphrine après :



Métanéphrine avant :

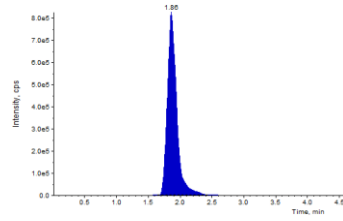


Métanéphrine après :

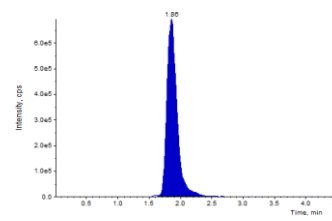


Annexe 54 : Chromatogrammes des catécholamines et dérivés méthoxylés avant et après consommation de thé.

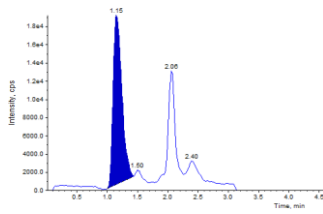
Dopamine avant :



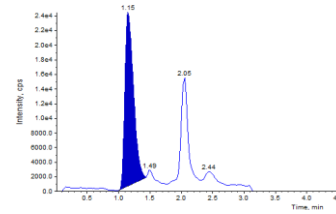
Dopamine après :



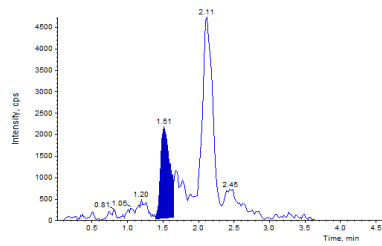
Norépinéphrine avant :



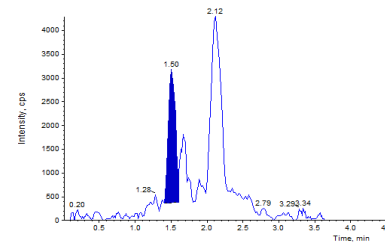
Norépinéphrine après :



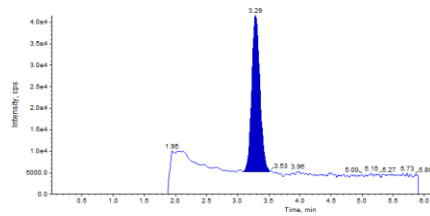
Epinéphrine avant :



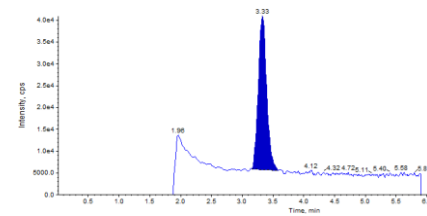
Epinéphrine après :



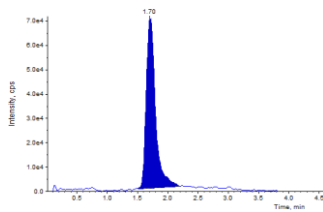
3-Méthoxytyramine avant :



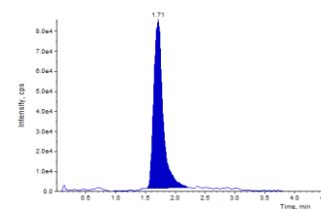
3-Méthoxytyramine après :



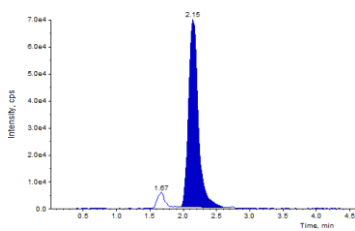
Normétanéphrine avant :



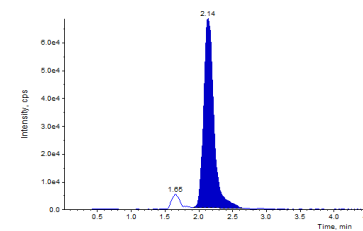
Normétanéphrine après :



Métanéphrine avant :



Métanéphrine après :



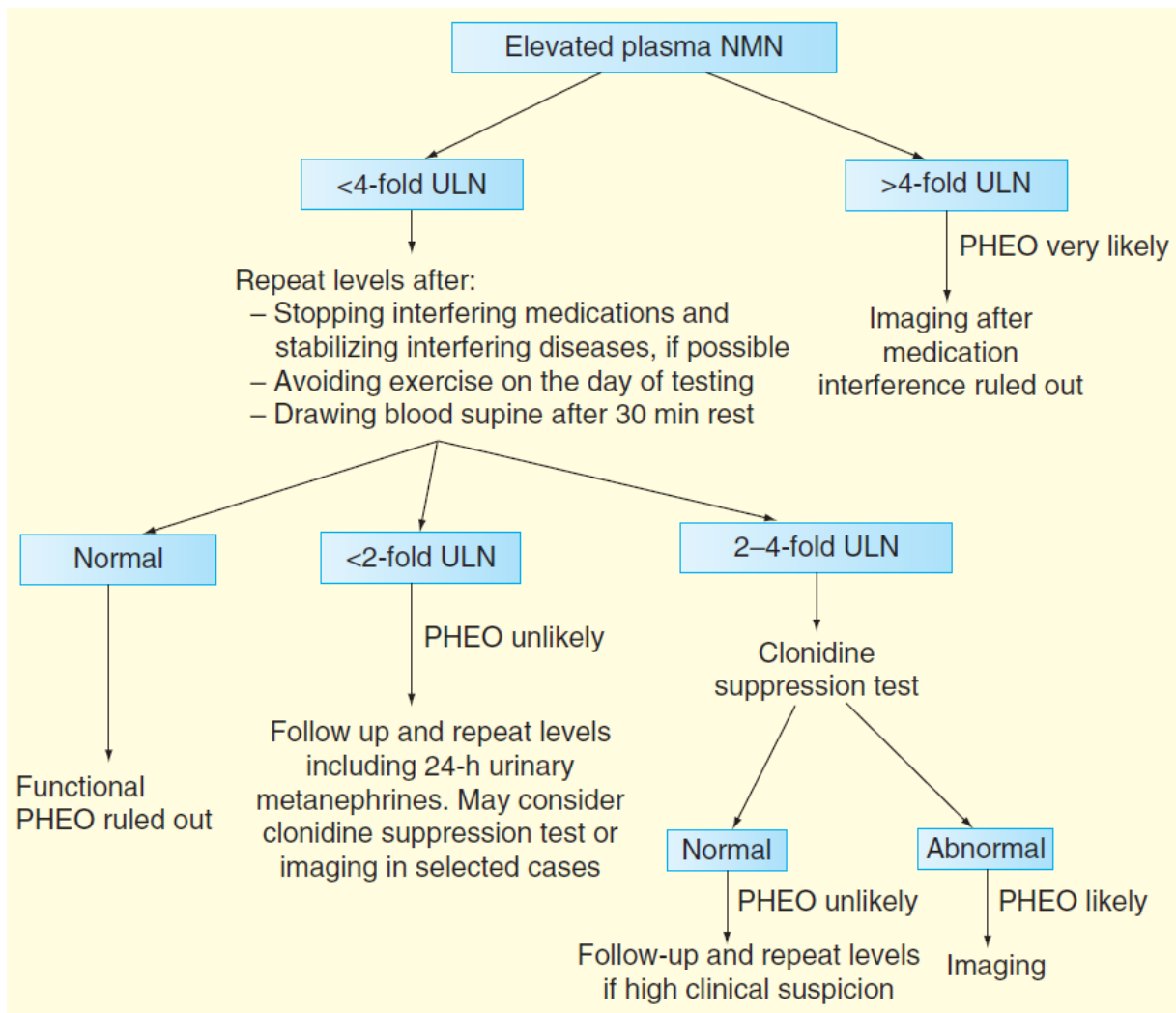
Annexe 55 : Quantités d'HVA et VMA urinaires chez l'adulte suite à un régime riche en l'aliment considéré.

Estimation de l'acceptabilité (Acc ?) de l'interférence rencontrée (O = interférence acceptable, N = interférence non acceptable) par rapport aux valeurs de référence (VN) et à des intervalles compris entre 2N et 4N (2N-4N) ou supérieurs à 4N (> 4N).

		Agrumes	Kiwis	Vanille	Bananes	Gruyère	Avocats	Noix	Chocolat	Café	Thé
HVA ($\mu\text{mol}/\text{mmole}$ créatinine)	Qav	1,20	1,48	0,98	2,16	0,59	2,77	1,93	2,39	3,55	1,72
	Qap	1,42	1,81	1,91	2,17	1,63	2,13	1,36	2,50	2,64	1,67
	CV (%)	12,1	14,2	45,4	0,5	66	18,6	24,5	3,1	20,8	2,1
	VN	[1,04 ; 3,25]									
	2N-4N]6,50 ; 13,0]									
	> 4N]13,0 ; + ∞ [
	Acc?	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
VMA ($\mu\text{mol}/\text{mmole}$ créatinine)	Qav	0,99	1,30	1,05	1,78	0,57	2,18	1,27	2,88	2,10	1,30
	Qap	0,89	1,07	1,68	1,37	1,51	1,50	1,08	1,08	1,76	0,98
	CV (%)	7,9	13,5	32,9	18,4	63,6	26	11,5	64,4	12,4	20
	VN	[1,19 ; 2,48]									
	2N-4N]4,96 ; 9,92]									
	> 4N]9,92 ; + ∞ [
	Acc?	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

- : valeur comprise dans l'intervalle de référence
- : valeur comprise entre la limite supérieure de l'intervalle de référence et 2N
- : valeur comprise entre 2N et 4N
- : valeur supérieure à 4N

Annexe 56 : Approche clinique devant une élévation des métanéphrines plasmatiques chez des patients suspectés d'avoir une forme sporadique de phéochromocytome (46).



Annexe 57 : Fiche de recueil et d'information fournie aux dix volontaires sains dans le cadre d'une recherche d'interférences dues à un régime varié.

Fiche de recueil et d'information

Initiales sujet	
Age sujet	
Date du recueil	

Objectif de l'étude : confirmer ou réfuter l'hypothèse qu'une consommation d'un mélange d'aliments riches en catécholamines peut interférer avec le dosage des catécholamines et méthanéphrines libres urinaires.

Avant le prélèvement :

Pendant les 48 heures précédant le prélèvement, suivre un régime alimentaire normal tout en y intégrant la consommation, selon le tableau ci-dessous, des aliments suivants en quantité minimale et par jour :

Aliments à consommer	Nombre d'unités à consommer par jour (au minimum)	Nombre d'unités au total sur 72h (au minimum)
Tomates	2/jour	6
Chocolat	1 barrette de 4 carrés/jour + aliments en contenant	3 barrettes
Café ou Thé	5/jour	15
Agrumes (oranges)	1/jour + 20cL jus d'orange (1 grand verre)	3 + 60cL jus d'orange
Kiwis	2/jour	6
Fruits secs (noix)	10/jour	30
Avocats	Un demi/jour	3 demis
Ananas	20cL jus d'ananas (1 grand verre)	60cL jus d'ananas
Bananes	1/jour	3
Gruyère ou fromage à pâte cuite	50g/jour	150g

Il est tout à fait possible de consommer plus que ce qui est indiqué ci-dessus. L'objectif est de voir si une alimentation « normale » influe sur le dosage des catécholamines urinaires. Ainsi, si vous avez des habitudes alimentaires particulières (exemple : manger une tablette de chocolat par jour), je vous encourage à les conserver.

Le 3^{ème} jour, continuer de suivre ce régime tout en effectuant le recueil des urines de 24h dans le flacon prévu à cet effet.

Après le prélèvement :

Conserver les urines de 24h à température ambiante jusqu'à acheminement au laboratoire d'hormonologie-RIA.

Je vous remerciais également de remplir le tableau sur la dernière page indiquant ce que vous avez consommé durant ces 72h.

Pour toute information supplémentaire : contact via alizee.violin@chu-nantes.fr

Résumé de la marche à suivre

- Pendant 48 heures, je mange à ma guise tout en incluant les portions d'aliments, renseignées dans le tableau, à mon régime
- Pendant les 24 heures suivantes, je continue le régime alimentaire entamé tout en recueillant mes urines dans le flacon prévu à cet effet
- Je remplis le tableau situé sur la dernière page
- Je ramène mon flacon d'urines et ce document au laboratoire de RIA

Aliments consommés	Nombre d'unités consommées par jour	Nombre d'unités au total sur 72h
Tomates		
Chocolat		
Café ou Thé		
Agrumes (oranges)		
Kiwis		
Fruits secs (noix)		
Avocats		
Ananas		
Bananes		
Gruyère ou fromage à pâte cuite		
Autre aliment d'intérêt consommé en quantité importante :		

Annexe 58 : Comparaison des valeurs des catécholamines urinaires chez l'enfant entre notre laboratoire et celui de Biomnis et comparaison au contexte clinique. Données de l'année 2018.





en $\mu\text{mol}/\text{mole}_{\text{créatinine}}$		Dopamine		Norépinéphrine		Epinéphrine		Clinique
Ech	Age	CHU Nantes	Biomnis	CHU Nantes	Biomnis	CHU Nantes	Biomnis	
1	10 ANS	88	50	<3	<3	<3	<4	∅ neuroblastome
2	10 ANS	101	50	7	4	<3	<4	∅ neuroblastome
3	3 ANS	867	939	<3	20	<3	<4	suivi de neuroblastome (07/2017)
4	2 ANS	756	564	40	28	<3	<4	suivi de neuroblastome (08/2016)
5	3 ANS	2485	1415	29	17	<3	<4	suivi de neuroblastome (03/2016)
6	1 AN	1306	955	101	67	<3	<4	tumeur kystique
7	1 AN	728	512	63	41	<3	<4	neuroblastome non différencié non sécrétant
8	8 ANS	356	324	46	29	21	18	corticosurréalome
9	1 AN	1360	1338	88	54	21	18	tumeur kystique
10	1 AN	793	494	<3	25	<3	<4	neuroblastome non différencié non sécrétant
11	6 ANS	495	390	29	20	<3	16	suivi de neuroblastome (10/2014)
12	7 ANS	425	426	23	17	8	5	néphroblastome
13	1 AN	544	558	77	62	<3	<4	suivi de neuroblastome (11/2017)
14	5 ANS	926	641	32	20	<3	<4	suivi de neuroblastome (05/2015)
15	7 ANS	353	249	21	17	<3	<4	suivi de neuroblastome (08/2012)
16	8 ANS	302	178	20	12	<3	<4	suivi de neuroblastome (12/2012)
17	9 ANS	253	211	20	18	<3	<4	suivi de neuroblastome (12/2013)
18	14 ANS	226	207	46	37	4	5	∅ neuroblastome
19	1 AN	182	178	37	36	<3	<4	suivi de neuroblastome (01/2018)
20	3 ANS	704	IT	34	19	<3	<4	suivi de neuroblastome (07/2017)
21	7 ANS	367	329	23	16	<3	<4	suivi de neuroblastome (11/2014)
22	1 AN	611	398	67	43	<3	<4	néphroblastome
23	1 AN	307	168	<3	<3	<3	<4	suivi de neuroblastome (11/2017)
24	5 ANS	84	IT	<3	<3	<3	<4	néphroblastome
25	8 ANS	429	325	29	17	<3	<4	suivi de neuroblastome (09/2013)
26	6 ANS	292	179	35	23	5	<4	suivi de neuroblastome (05/2013)
27	5 ANS	422	258	32	19	<3	<4	suivi de neuroblastome (01/2016)
28	6 ANS	208	156	<3	10	<3	<4	pyélonéphrite
29	2 MOIS	1251	827	<3	59	<3	<4	∅ neuroblastome
30	2 MOIS	976	659	60	33	<3	<4	∅ neuroblastome
31	6 ANS	453	262	15	9	<3	<4	suivi de neuroblastome (10/2014)
32	1 AN	546	478	65	46	<3	<4	néphroblastome
33	14 ANS	35	25	<3	<3	<3	<4	∅ neuroblastome
34	6 ANS	414	333	20	14	<3	<4	suivi de neuroblastome (10/2014)
35	1 AN	984	714	76	44	<3	<4	suivi de neuroblastome (01/2018)
36	1 AN	738	503	74	43	16	9	maladie de Kawasaki

en $\mu\text{mol}/\text{mole}_{\text{créatinine}}$		Dopamine		Norépinéphrine		Epinéphrine		Clinique
Ech	Age	CHU Nantes	Biomnis	CHU Nantes	Biomnis	CHU Nantes	Biomnis	
37	3 ANS	1924	1736	31	23	<3	<4	suivi de neuroblastome (03/2016)
38	1 AN	403	406	<3	33	<3	<4	suivi de neuroblastome (11/2017)
39	1 AN	9357	8522	80	43	<3	<4	neuroblastome
40	8 ANS	629	553	IT	IT	22	10	néphroblastome
41	1 AN	658	359	65	34	<3	<4	suivi de neuroblastome (01/2018)
42	1 AN	661	514	24	21	<3	<4	suivi de neuroblastome (11/2017)
43	8 ANS	422	899	23	18	<3	<4	suivi de neuroblastome (09/2013)
44	1 AN	5005	5240	50	39	<3	<4	suivi de neuroblastome (07/2018)
45	7 JOURS	528	314	32	26	IT	IT	duplication digestive et hémato me surrénalien

Ech : numéro attribué à un échantillon urinaire / VN : valeurs de référence / Ø : symbole signifiant « absence de »

Suivis de tumeur : date du diagnostic indiquée entre parenthèses.

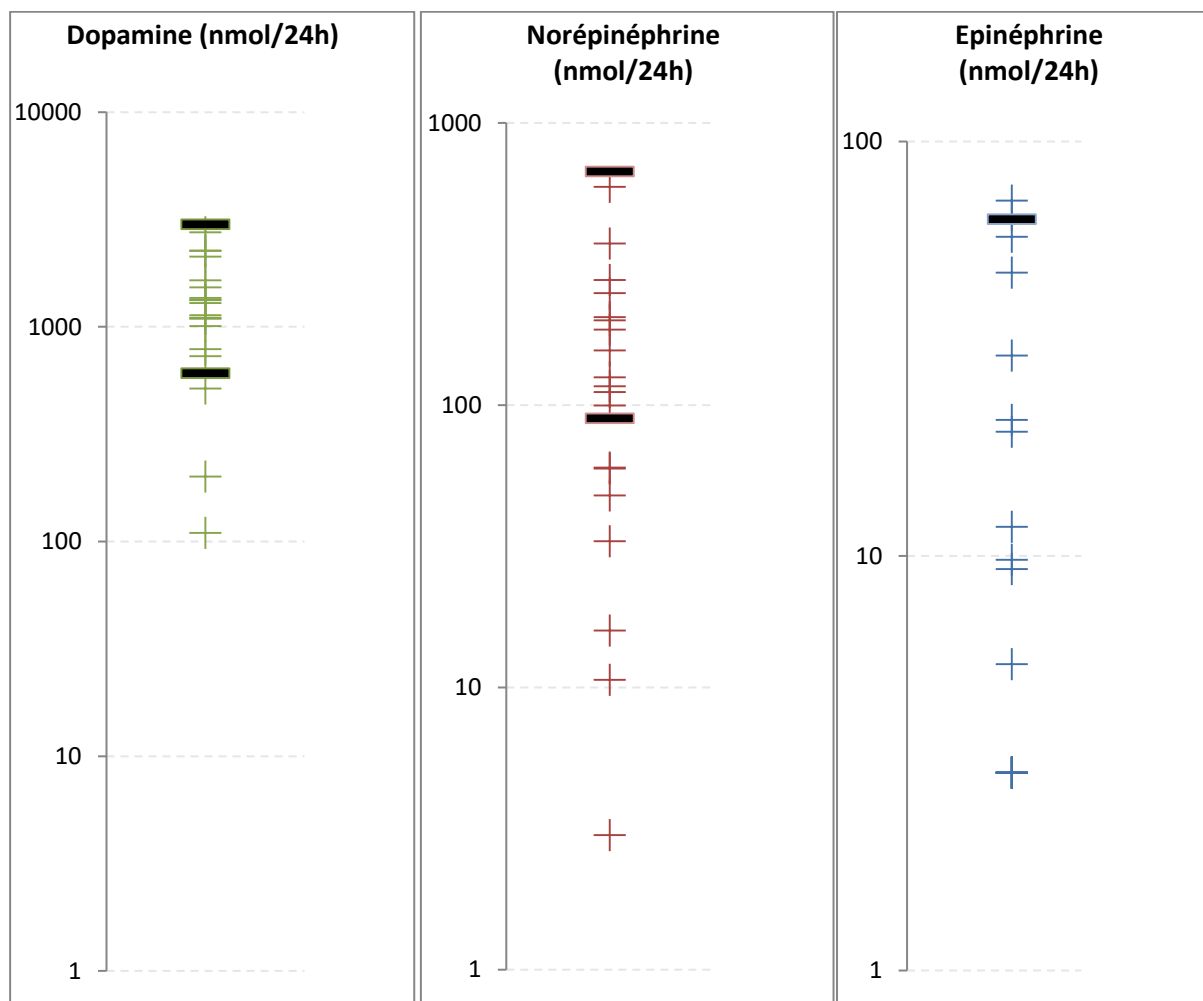
Si diagnostic différentiel mis en évidence, il est mentionné.

	: valeur supérieure à 4N évoquant le diagnostic d'un neuroblastome
	: valeur douteuse comprise entre 2N et 4N
	: valeur comprise entre la limite supérieure de l'intervalle de référence et 2N
	: valeur comprise dans l'intervalle de référence

$\mu\text{mol}/\text{mole}_{\text{créatinine}}$	Dopamine	Norépinéphrine	Epinéphrine
< 1 an	30 - 2280	2 - 371	1 - 89
1 - 2 ans	20 - 1470	3 - 250	1 - 116
3 - 4 ans	20 - 950	1 - 146	1 - 80
5 - 7 ans	10 - 790	1 - 174	1 - 109
8 - 10 ans	10 - 700	2 - 226	1 - 83
11 - 13 ans	0 - 570	1 - 119	1 - 92
14 -19 ans	20 - 490	2 - 118	1 - 38

Valeurs de référence des catécholamines chez l'enfant selon Fraser Davidson et al. (39).

**Annexe 59 : Catécholamines urinaires : résultats patients de 2016 à septembre 2018
(échelle logarithmique).**



Intervalles de référence bornés par les traits épais noirs.

