

# Dosage des catécholamines et métabolites par LCMS/MS

C. Le Goff et E. Hamoir

CHU de Liège

Belgique

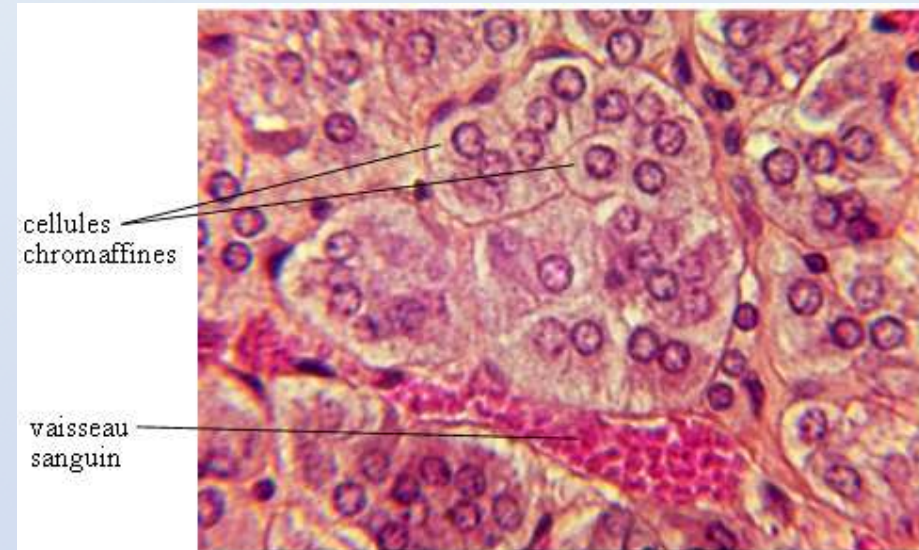
Corata Nancy 25/09/2013

## Définition :

Tumeur svt bénigne de la médullosurrénale qui se manifeste par la sécrétion intermittente ou continue de catécholamines

## Synonyme :

- Médullosurrénalome
- Paragangliome surrénalien
- Chromaffinome
- Phaechromoblastome



# La médullo-surrénale

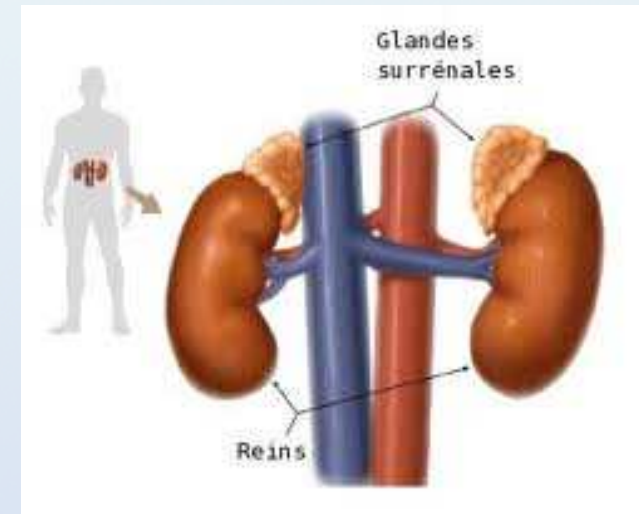
Glandes surrénales = petites glandes paires

3cm X 1cm

Corticosurrénale et médullosurrénale

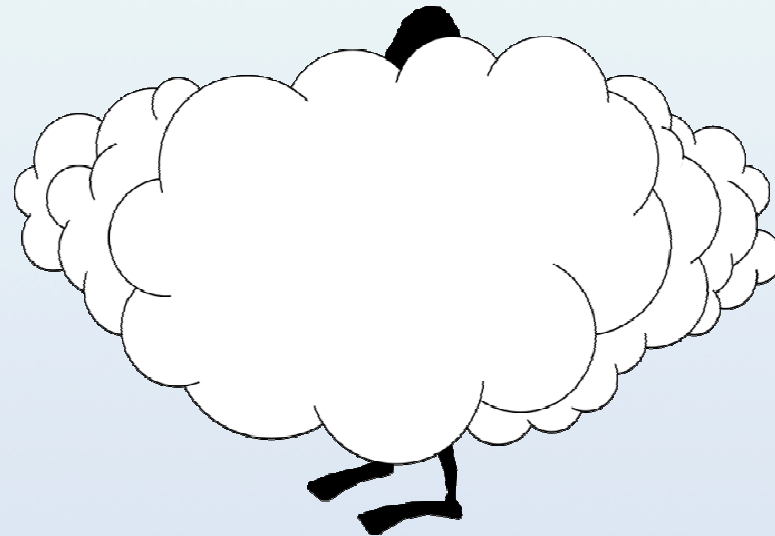
Cellules du cortex : glucocorticoides,  
mineralocorticoides et androgènes surrénaux

Médullosurrénale: catécholamines



# Etiologie phéochromocytome

- Tumeur endocrine → développée à partir tissu chromaffine (issu des chaînes ganglionnaires sympathiques)
- HTA due à la sécrétion de catécholamines ou leurs métabolites
- 75% = au niveau des surrénales
  - 40% à gauche
  - 25% à droite
  - 10% des 2 côtés
- Tumeurs ectopiques :
  - vessie
  - hiles rénaux
  - médiastin post-péricardique
  - cou



« Nothing is known about its true incidence » de graeff, 1964.

Entre 0,1 et 20 par million et par an

Mais HTA est fréquente!

« N'importe quel paragangliome  
peut donner lieu à n'importe quel signe,  
à n'importe quel symptôme,  
chez n'importe quel patient »

Pheochromocytoma, the impressionist tumor.

Ch. Proye et G.W. Geelhoed

1993

# Présentation clinique

- 1 Hypertension (sustained or paroxysmal) with the following:
  - (a) Symptoms (Table 51.1) and signs (Table 51.2) or co-existing disease or syndromes (Table 51.3)
  - (b) Group 3 or 4 retinopathy of unknown cause
  - (c) Weight loss
  - (d) Hyperglycaemia
  - (e) Hypermetabolism without hyperthyroidism
  - (f) Cardiomyopathy
  - (g) Resistance to antihypertensive therapy
  - (h) Orthostatic hypotension (without antihypertensive drugs)
  - (i) Unexplained fever
- 2 Persons with marked hyperlability of blood pressure
- 3 Recurrent attacks of symptoms and signs of pheochromocytoma, even if hypertension not demonstrated
- 4 Severe pressor response during or induced by the following:
  - (a) Anaesthesia induction
  - (b) Intubation
  - (c) Surgery
  - (d) Angiography
  - (e) Parturition
  - (f) Antihypertensive therapy
  - (g) Precipitating factors listed under 'Clinical presentation' in text
- 5 Unexplained circulatory shock
  - (a) During anaesthesia
  - (b) During pregnancy, delivery, or in puerperium
  - (c) During operation or post-operatively
  - (d) Following administration of phenothiazine drugs
- 6 Family history of pheochromocytoma, especially if hypertensive (also screen siblings and children)
- 7 Hypertension with disease or complications sometimes associated with pheochromocytoma (Table 51.1)
- 8 Hyperlabile BP or severe hypertension during pregnancy or apparent pre-eclampsia or eclampsia
- 9 Transient abnormal electrocardiogram during hypertensive episodes
- 10 X-ray evidence of suprarenal mass

- Fasting hyperglycaemia (two-thirds of sustained hypertensives)  
Glycosuria  
Impaired glucose tolerance  
 ↑ BMR (> 20%) (three-fourths of sustained hypertensives)  
 ↑ Plasma FFA (mainly sustained hypertensives) (? ↑ glycerol)  
 Hypercholesterolaemia  
 Anaemia or polycythaemia; ↑ WBC and ESR normal (? ↑ platelets)  
 ↓ Plasma and/or total blood volume  
 ↑ Blood urea < 60 mg/dl in 95%; with or without proteinuria (rarely slight serum creatinine ↑)  
 Hyperreninaemia ± aldosteronism  
 Hypokalaemia  
 ↑ Serum glucagon  
 Hypercalcaemia (caused by pheochromocytoma)  
 Hypoinsulinaemia (rarely hyperinsulinaemia + hypoglycaemia)  
 Hyperamylasaemia  
 Lactic acidosis (↓ pH, ↓  $PO_2$ , ↑ phosphorus)  
 ↑ Serum PTH-like substance, ACTH, VIP, calcitonin, serotonin, gastrin, opioids, MSH, ? ANP, somatostatin (all rarely elaborated by pheochromocytoma)
- If associated with:
- Cushing's syndrome*  
 ↑ Serum ACTH (from pheochromocytoma or medullary thyroid carcinoma)  
 ↑ Plasma cortisol  
 ↑ Urinary steroids
- Hyperparathyroidism*  
 ↑ Serum calcium  
 ↑ Serum parathyroid hormone  
 ↓ Serum phosphate
- Medullary thyroid carcinoma*  
 ↑ Serum thyrocalcitonin  
 ↑ Serum prostaglandin ( $E_2$  and  $F_{2\alpha}$ )  
 ↑ Serum serotonin  
 ↑ Urinary 5-HIAA  
 ↑ Serum histaminase  
 ↑ Serum ACTH

# Quand suspecter un phéochromocytome ?

- Signes ou symptômes de décharge adrénergique
- Hypertension résistante ou inhabituellement sévère
- Hypertension avant l'âge de 20 ans, sans explication
- Syndrome familial (MEN 2, NF1, VHL)
- Histoire familiale de phéochromocytome
- Incidentalome
- Hypertension critique en cours d'anesthésie, de chirurgie, d'angiographie
- Cardiopathie dilatée sans cause évidente

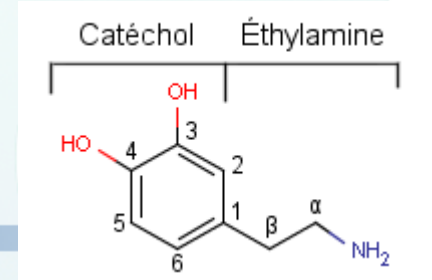


# Présentation clinique

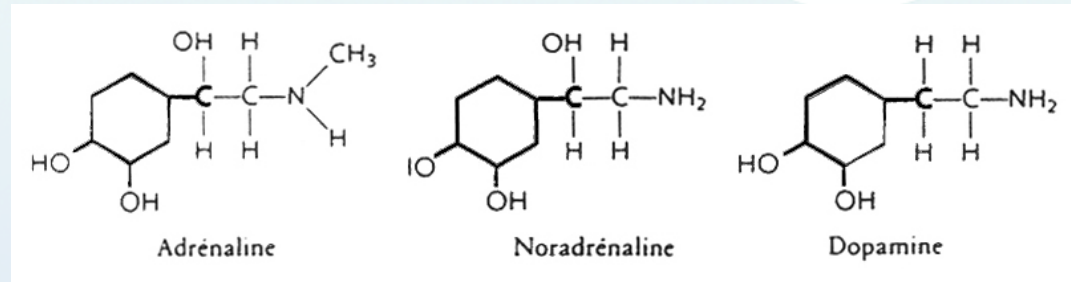


- Favorable
- Curable
- Sauf .....

# Catécholamines



- Les cathécholamines



➔ 3 amines biogènes à noyau catéchol:

- Adrenaline ➔ hormone medullosurrénalienne
  - Noradrenaline
  - Dopamine
- └─ Neurotransmetteurs

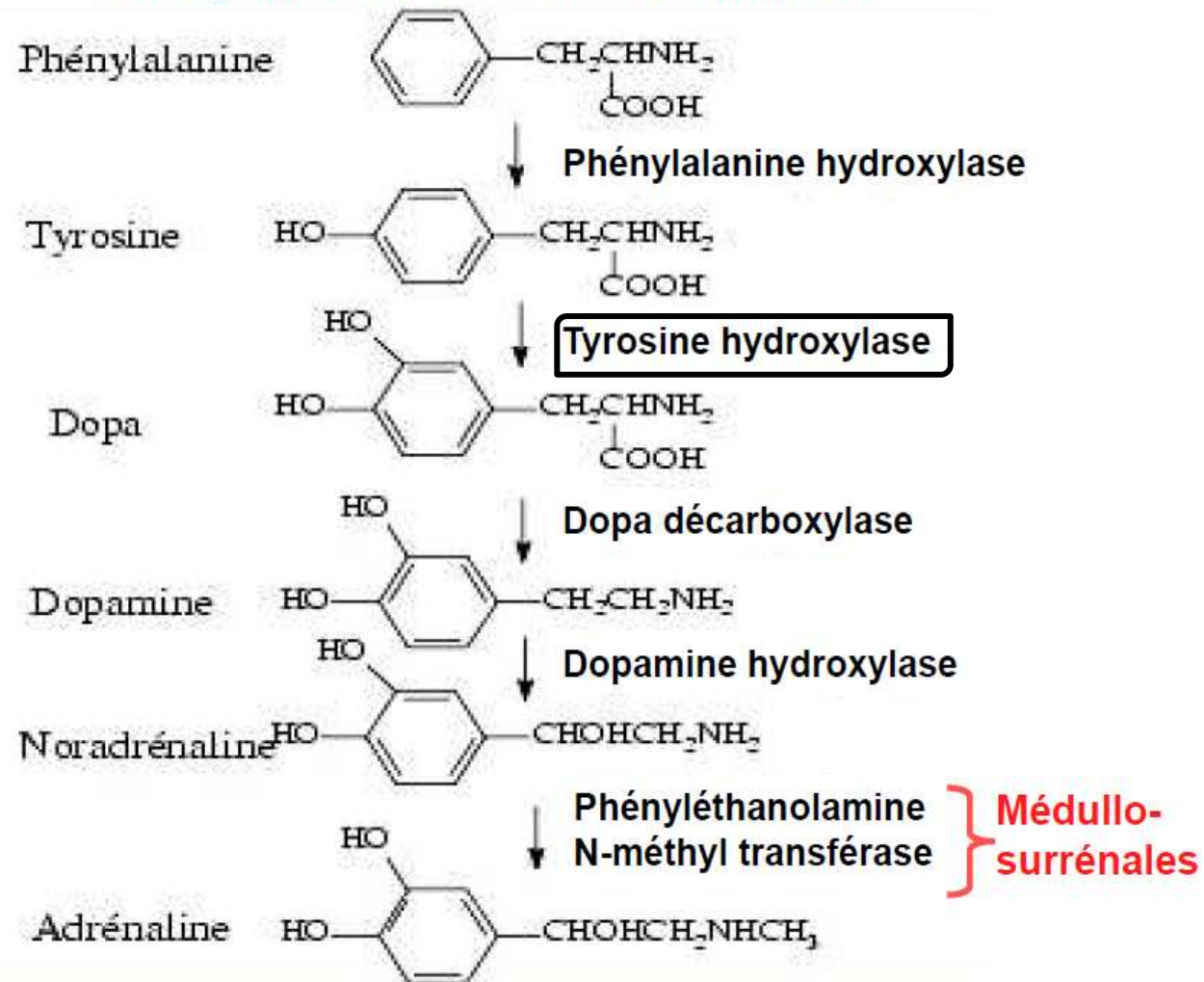
➔ Biosynthèse à partir de la Tyrosine d'origine exogène ou formée à partir de Phénylalanine

Catabolisme sous l'action de 2 enzymes

Qd?

# Synthèse des catécholamines

## Biosynthèse des catécholamines



# Métabolisme

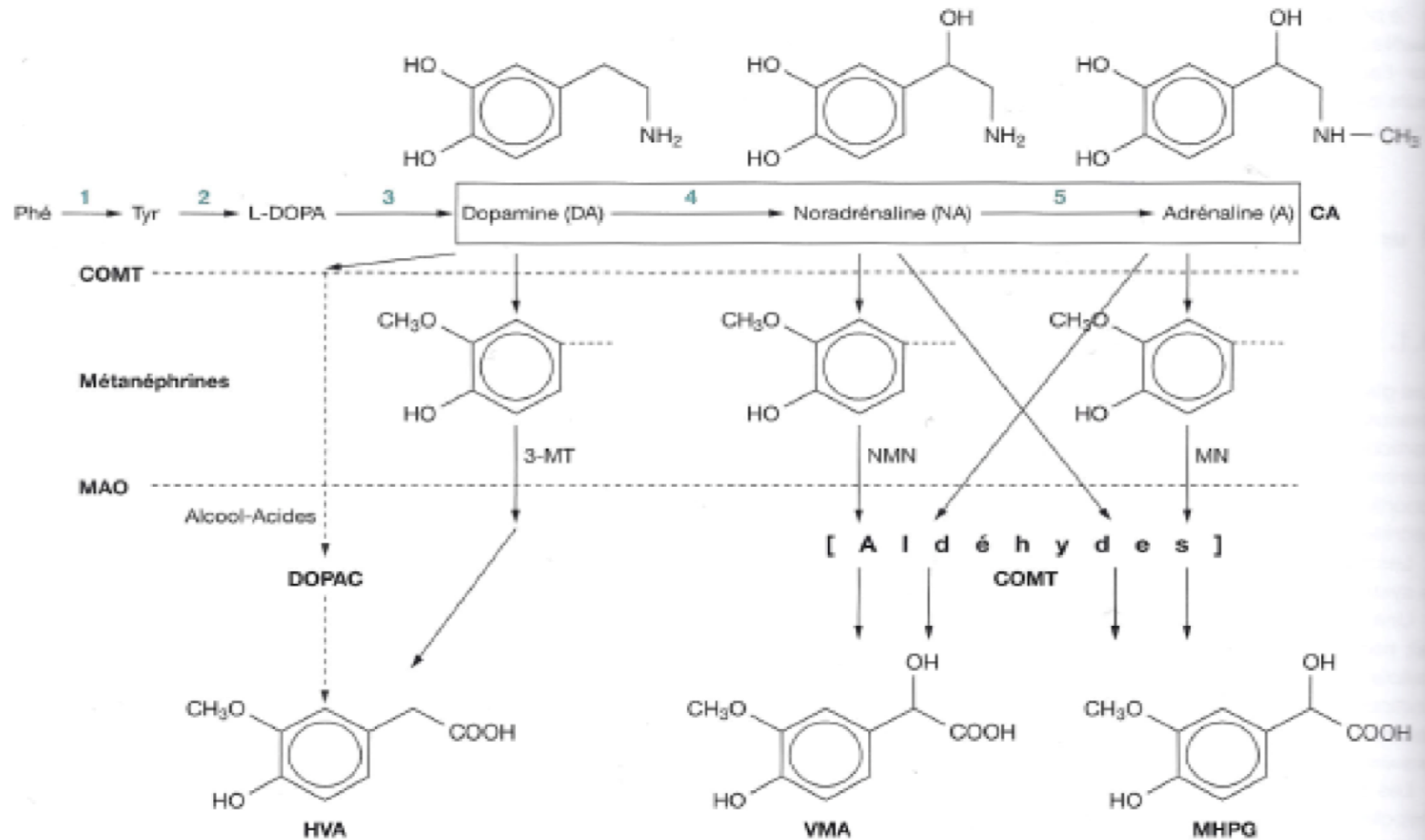


Figure 1 ■ Métabolisme des catécholamines.

(1) : Phénylalanine Hydroxylase, (2) : Tyrosine Hydroxylase, (3) : DOPA décarboxylase, (4) : Dopamine bêta-hydroxylase, (5) : Phényléthanolamine-N-méthyltransférase.

## Dosages sanguins et urinaires

- Catécholamines: Adrénaline, Noradrénaline et Dopamine
- Métanéphrines: métanéphrine (métadrénaline) et normétanéphrine (normétadrénaline) → NEW pour le plasma!!!

# Les tests diagnostiques selon les cliniciens

- Les tests biologiques :
  - les catécholamines urinaires fractionnées de 24 heures
  - les métanéphrines plasmatiques
  - les autres tests...
- L'imagerie par tomodensitométrie et RMN
- L'imagerie par scintigraphie (MIBG, ...)

## Test d'inhibition à la clonidine :

- Positif (dim de la TA) si HTA non tumorale
- Négatif (pas de dim de la TA) si HTA d'origine tumorale

## Test de stimulation :

- dangereux surtout qu'il y a déjà une HTA



## Sang et urines (Milieu acide ou chélateur)

- Catécholamines plasmaticques : tube spécial préparé au laboratoire
- Catécholamines, métanéphrines, VMA urinaires : urines acidifiées !

# Recommandations

- Repos strict 20 minutes avant le prélèvement.
- Les urines doivent être recueillies pendant 24 heures, si possible pendant 3 jours de suite, après une crise hypertensive.
- Un régime alimentaire excluant chocolat, bananes, agrumes et comprenant une consommation modérée de thé et de café dans les 48 heures précédant le prélèvement s'impose
- Stop médicaments
- Catécholamines plasmatiques : à prélever en position couchée
- VMA : élimination urinaire diminue avec l'âge

# Médicaments interférents (catécholamines et métabolites)

## AUGMENTATION

### ANTI-PARKINSONIENS :

- Lévodopa : PROLOPA

### ANTI-HYPERTENSEURS :

- Nifédipine (ADALAT®)
- Bêta-bloquants
- Methyldopa

### ANTI DEPRESSEURS :

- Tricycliques
- Inhibiteurs recapture de la sérotonine
- IMAO (inhibiteurs monoamine oxydase)

### ANTI-PSYCHOTIQUES :

- Phénothiazines
- Chlopromazine

### AUTRES :

- Sympathicomimétiques
- Theophylline

## DIMINUTION

- Clonidine (antagoniste des récepteurs adrénergiques)

# Médicaments interférents (catécholamines et métabolites)

Principales substances pharmacologiques incriminées dans les interférences rencontrées dans les dosages de catécholamines et de leurs dérivés

(COMT : Catéchol-D-méthyl transférase)

**Sympathomimétiques indirects**

- **Cocaïne**
- **Amphétamines anorexigènes**
- **β-agonistes**
  - Terbutaline
  - Salmétérol (Serevent<sup>®</sup>)
  - Salbutamol
  - Éphédrine (Éphédrine Renaudin<sup>®</sup>, Éphédrine Aguetant<sup>®</sup>)
  - Pseudoéphédrine

**Sympathomimétiques directs**

- **Ectasy**
- **Vasoconstricteurs**
  - Phényléthanolamine
  - Phényléphrine (Neosynéphrine AP-HP<sup>®</sup>)
  - Éphédrine (Éphédrine Renaudin<sup>®</sup>, Éphédrine Aguetant<sup>®</sup>)
  - Pseudoéphédrine

**Inhibiteurs du catabolisme des catécholamines**

- **Inhibiteurs de la mono-amine-oxydase : IMAO**
- **Inhibiteurs de la COMT**
  - Entacapone (Comtan<sup>®</sup>)

**Inhibiteurs de la recapture des catécholamines**

- **Antidépresseurs tricycliques**
- **Amphétamines anorexigènes**

**Catécholamines exogènes**

**Paracétamol**

**Antipsychotique**

- **Quétiapine (Seroquel<sup>®</sup>)**

M.d'Herbomez et al.  
Diagnostic biologique des  
phéochromocytomes et  
paragangliomes, Presse Med  
2009;38:927-934

# Interférences !!! (exceptions)

- Stress, exercices physiques : NAx2
- Age : NA augmentation
- Nicotine : Catécholamines +métabolites augmentent
- Aliments (Café, thé, banane, vanille, chocolat) → augmentation

# Conservation

**Table 1. Effect of storage for to pH 4, in 4 different sar**

Study participant	24 h rt as percent of -20° C
F2	88.0
M2	95.0
M3	72.4
M4	86.7

**Table 2. Mean urinary concentrat different samples after collection**

Days at room temperature	
Unpreserved MN (SD), % of initial value	Range
pH 4 MN (SD), % of initial value	Range
Unpreserved NMN (SD), % of initial value	Range
pH 4 NMN (SD), % of initial value	Range

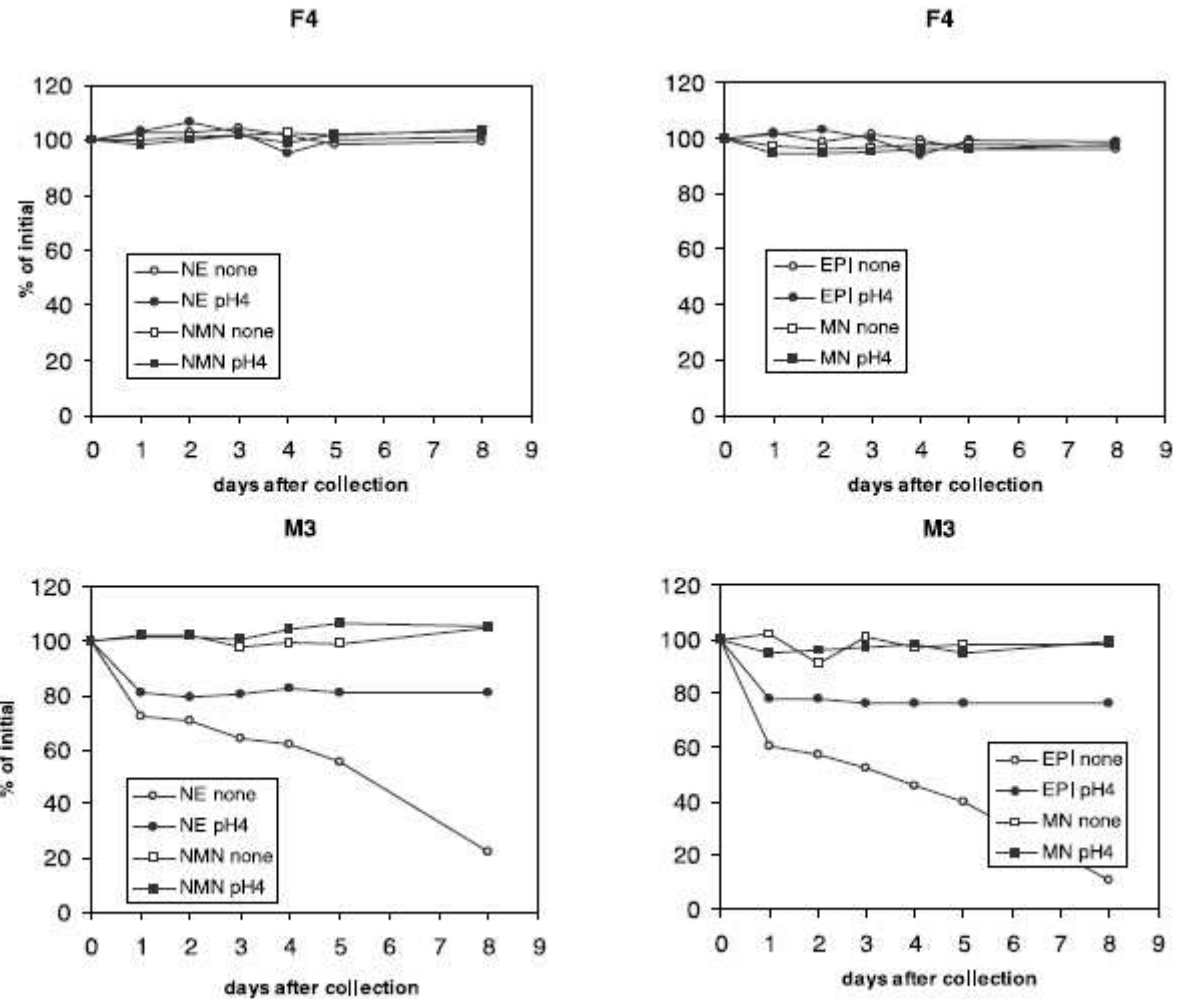


Fig. 1. Two representative patterns of catecholamine and metanephrine concentrations in urine during storage at room temperature for up to 8 days and the effect of acidifying to pH 4 after 24 h. No detectable decay, as in depicted female study participant F4, was encountered in females F1 and F3, and the male M1. Male study participants M2 and M4 and female F2 displayed a pattern similar to the depicted male M3.

# Valeurs de référence CHU Liège

ANALYSES	ECHANTILLON	VALEURS DE REFERENCE				UNITES
Noradréna line	Plasma			0 - 500		ng/L
Adrénaline				0 - 100		ng/L
Dopamine				0 - 145		ng/L
Noradréna line	Urine (HCl)			5 - 60		µg/24H
Adrénaline				3 - 30		µg/24H
Dopamine				0 - 600		µg/24H
Metanéphrines	Urine(HCl)			0-400		µg/24H
Normétanéphrines		<10 ans		<5,7/kg/24h		µg/24H
		<10 ans		<7,1/kg/24h		µg/24H

Selon la Mayo Clinic:

Adrénaline > 35 µg/24h

Noradrénaline > 170 µg/24h

Dopamine > 700 µg/24h

Métanéphrine > 400 µg/24h

Normétanéphrine > 900 µg/24h

- Calculer la sécrétion de 24 h pour chaque échantillon urinaire:  $\mu\text{g}/24 \text{ h} = \mu\text{g}/\text{L} \times \text{L}/24 \text{ h}$
- Conversion:
  - Métanéphrine ( $\mu\text{g}/\text{L}$ )  $\times 5.07 \times 10^{-3} = \mu\text{mol}/\text{L}$
  - Normétanéphrine ( $\mu\text{g}/\text{L}$ )  $\times 5.46 \times 10^{-3} = \mu\text{mol}/\text{L}$



# Cas clinique : exemple

Mme SC (DN : 23/10/1980)

Mère de jumeaux, policière

Symptômes = maux de dos violent avec impotence des MI

Diagnostic = tumeur surrénalienne droite (phéochromocytome surrénalien droit malin) + métastases synchrones au niveau du rachis et du pelvis osseux, ainsi qu'au niveau fémoral et huméral.

Traitement = chirurgie d'exérèse en date du 14/8/2013 + chimio + radiothérapie

		Descriptif	Unité	Normes	-130828-52 28/08/13	-130618-03 18/06/13
					✓	✓
✓	🔍	Noradrénaline plasmatique	ng/L	0 - 500	300	3689 (+)
✓	🔍	Adrénaline plasmatique	ng/L	0 - 100	47	560 (+)
✓	🔍	Dopamine plasmatique	ng/L	0 - 145	56	149 (+)

# Techniques existantes

- Fluorimétrie (EDA) : manque de spécificité et de sensibilité
- Radio-enzymologie: spécificité et sensibilité satisfaisante ms durée +++ (+ radioéléments)
- HPLC: rapide !!!???, sensible et spécifique

## Préparation des échantillons

- Hydrolyse acide
- Extraction sur colonne échangeuse de cations
- Extraction liquide-liquide

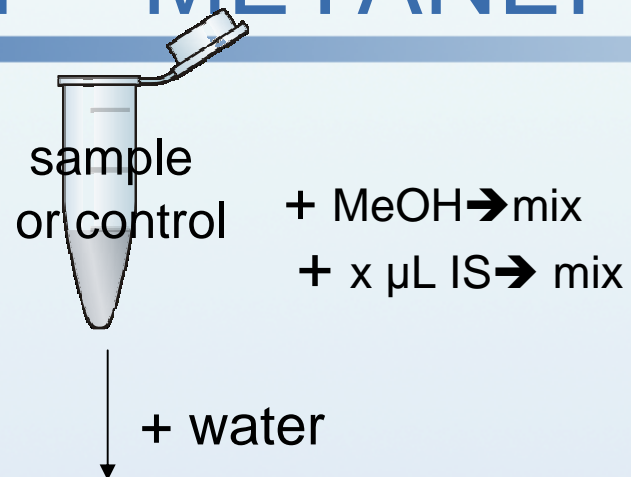
## Séparation chromatographique

- 70 min/ patient sur l'HPLC
- Détecteur électrochimique

## Matériel

- Colonne LiChroCART C18
- Solvants (Acétate de sodium, acide citrique, EDTA et acide sulfonique)

# Nouvelle méthode (iMethod™-METANEPHRINE)

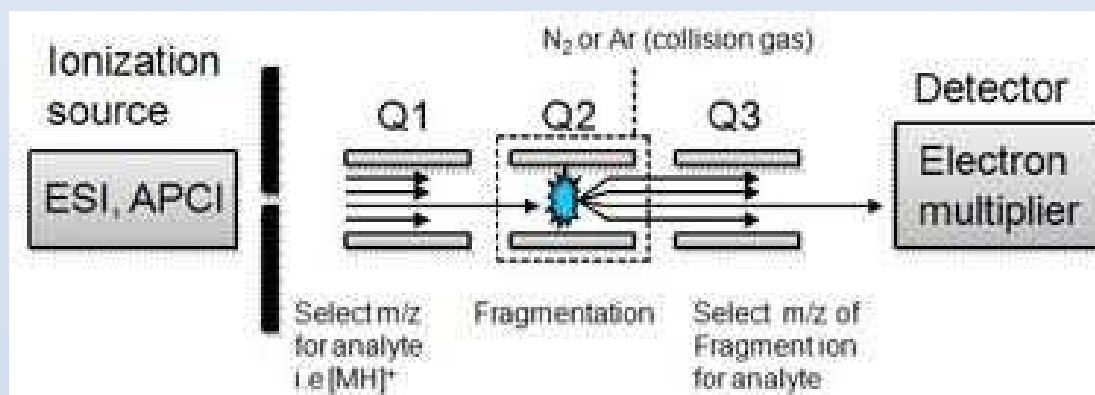
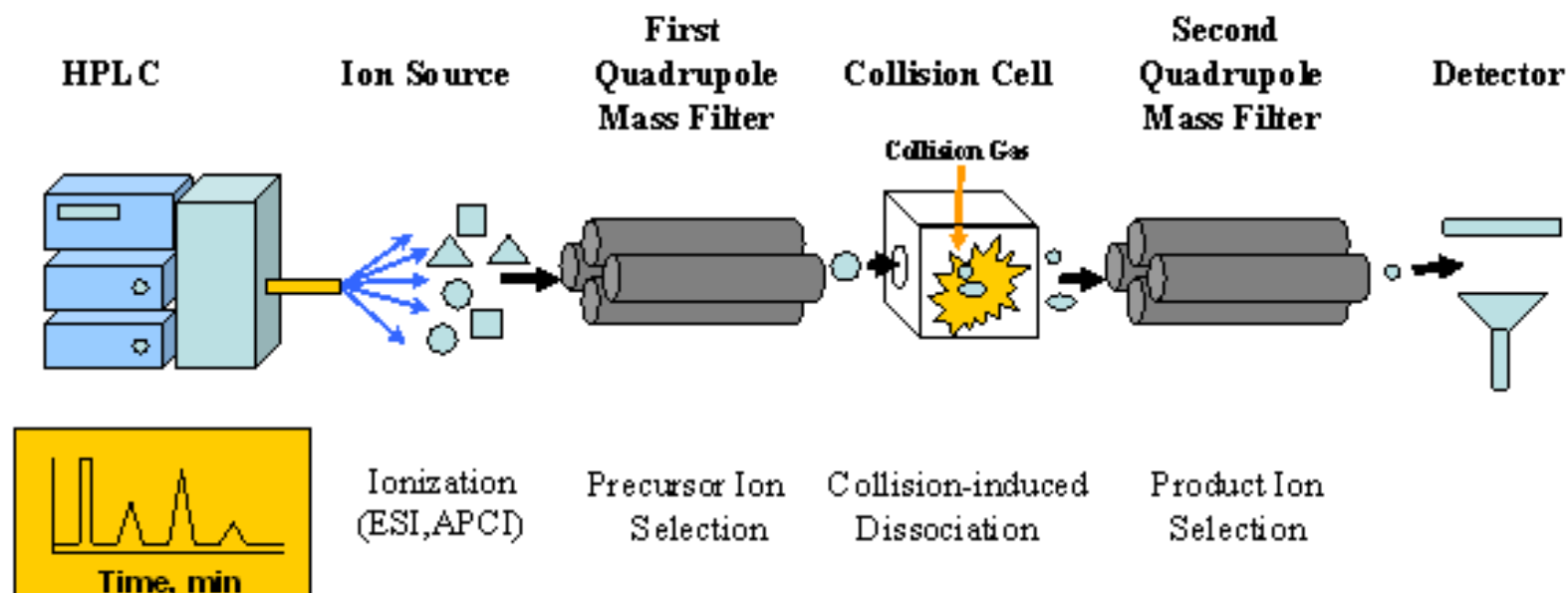


- ✓ SPE Wash solution then water(2x): conditionement
- ✓ Sample
- ✓ Wash (water+wash solution)
- ✓ Elution (SPE Elution solution) → new 96 well plate
- ✓ Dry
- ✓ Reconstitution (Reconstitution solution)



→ LC/MS-MS

# LCMS/MS





# Nouvelle méthode (iMethod™ -METHANEPHRINE)

## LC

- System controller CBM-20A
- 4 pumps LC-20AD (with semi-micro 50 µL mixer)
- Autosampler SIL-20AC
- Column oven CTO-20AC

## Colonne:

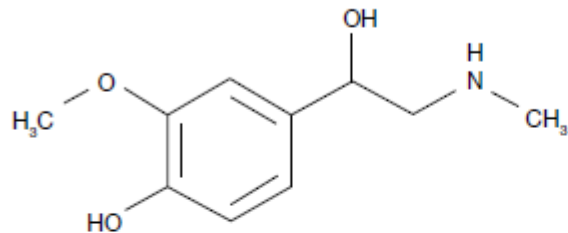
- Colonne C18 pour molécules apolaires: Phenomenex Analytical Column, 2.6 µm, Kinetex HILIC Column, 50 x 2.1 mm

## Solvants:

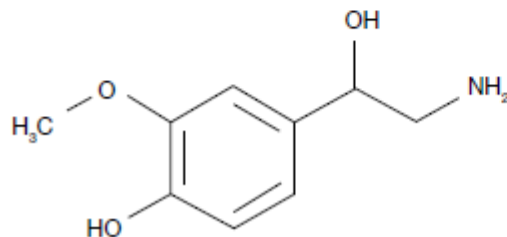
- Mobile Phase A (Ammonium Formate)
- Mobile Phase B (Acetonitrile)
- Needle Rinse (95:5 (v:v)) (Acetonitrile: Water)

## Notre expérience analytique

Metanephrine (MN, log P 0.40, pK<sub>a</sub> 9.25)

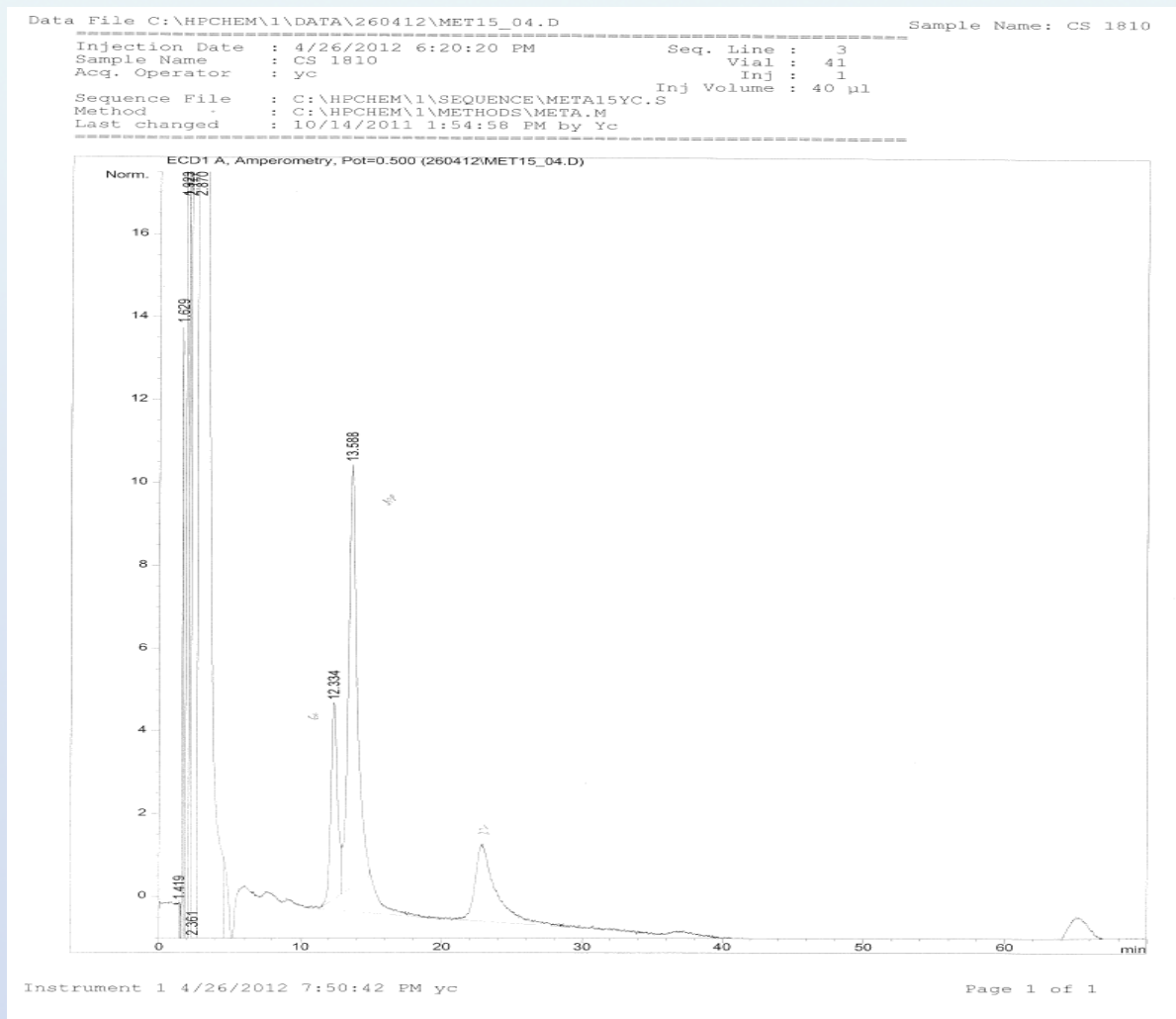


Normetanephrine (NMN, log P -0.47, pK<sub>a</sub> 9.06)

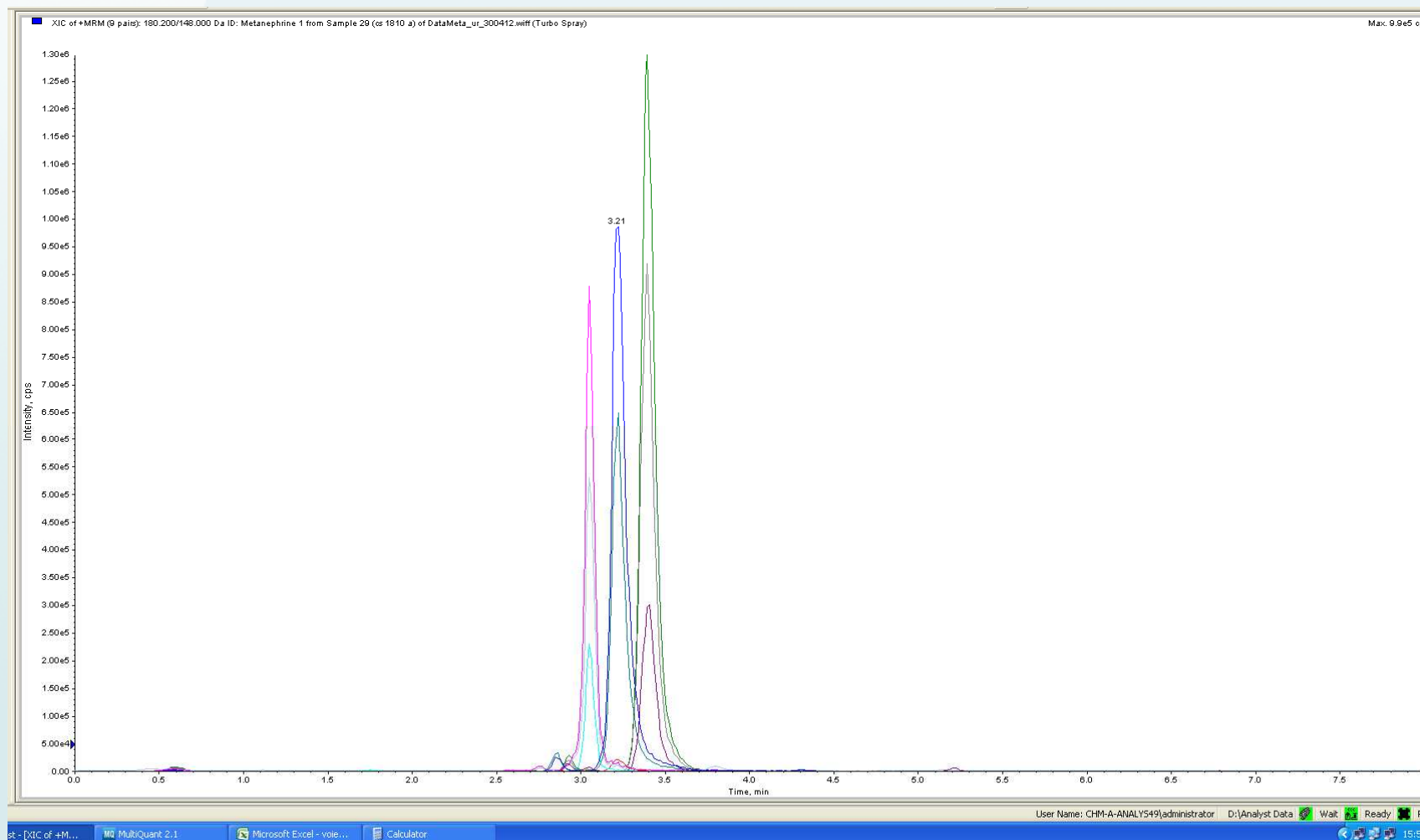




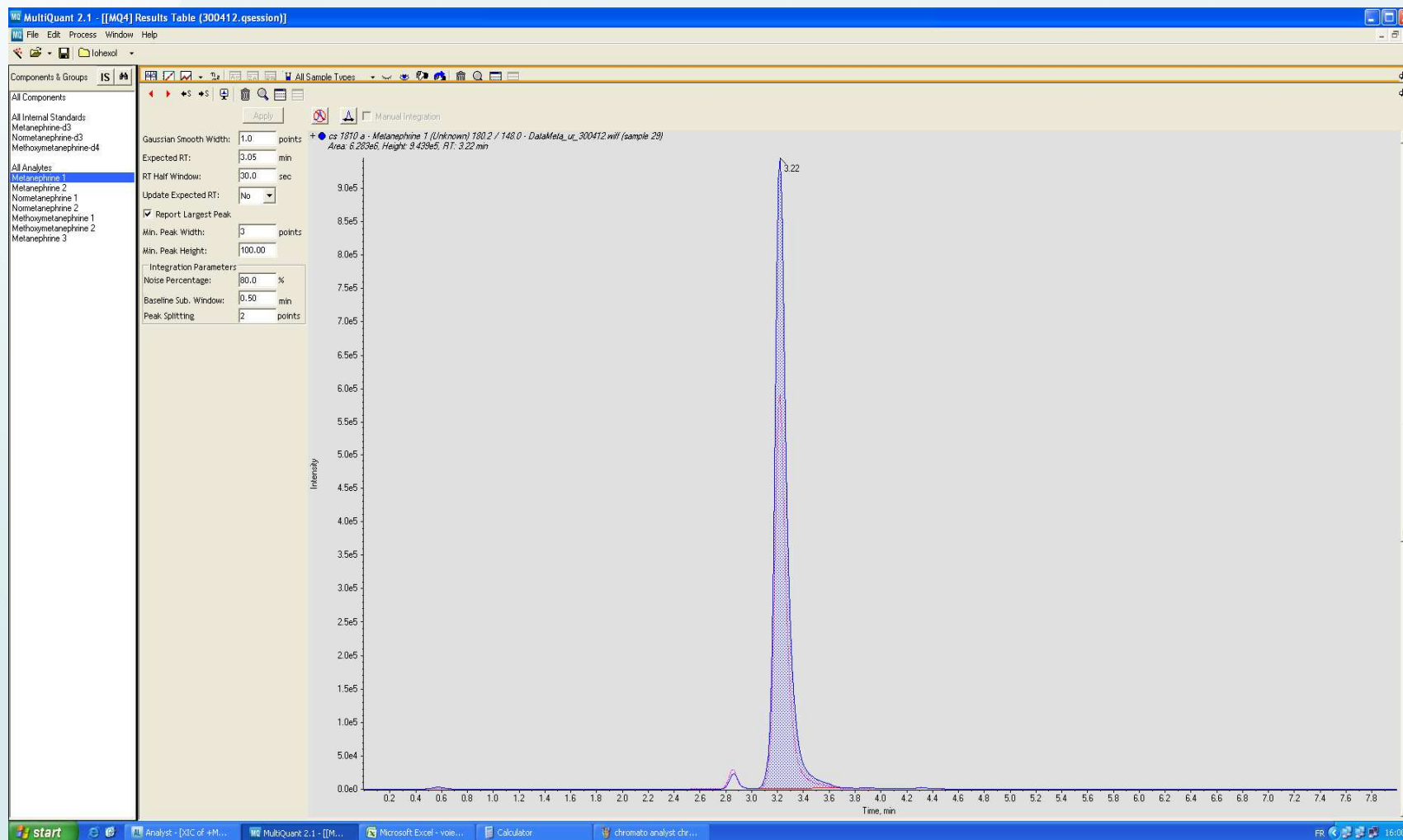
- 1 chromatogramme méthanéphrine et norméthanéphrine en HPLC



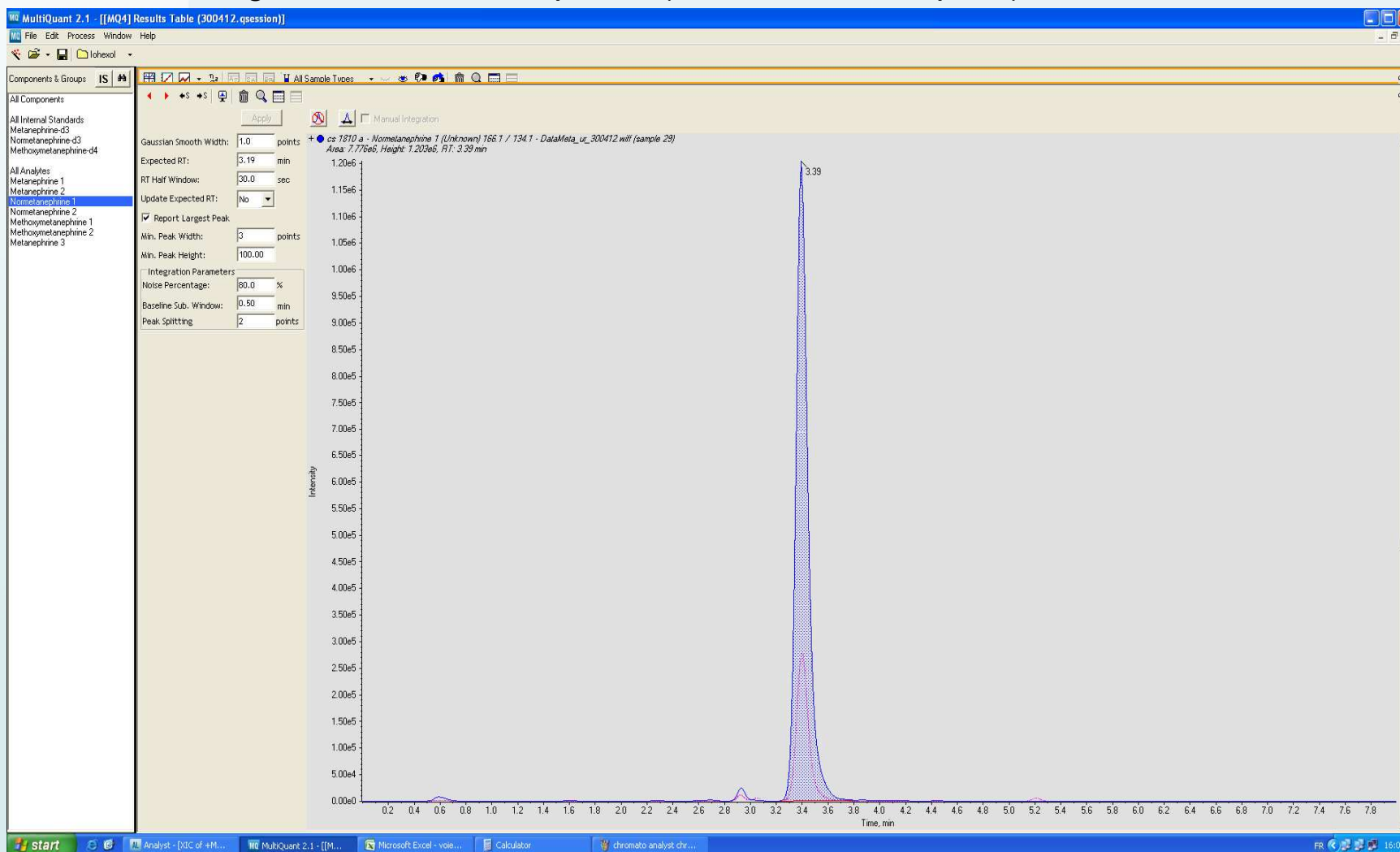
- 1 chromatogramme LC-MS/MS-Analyst



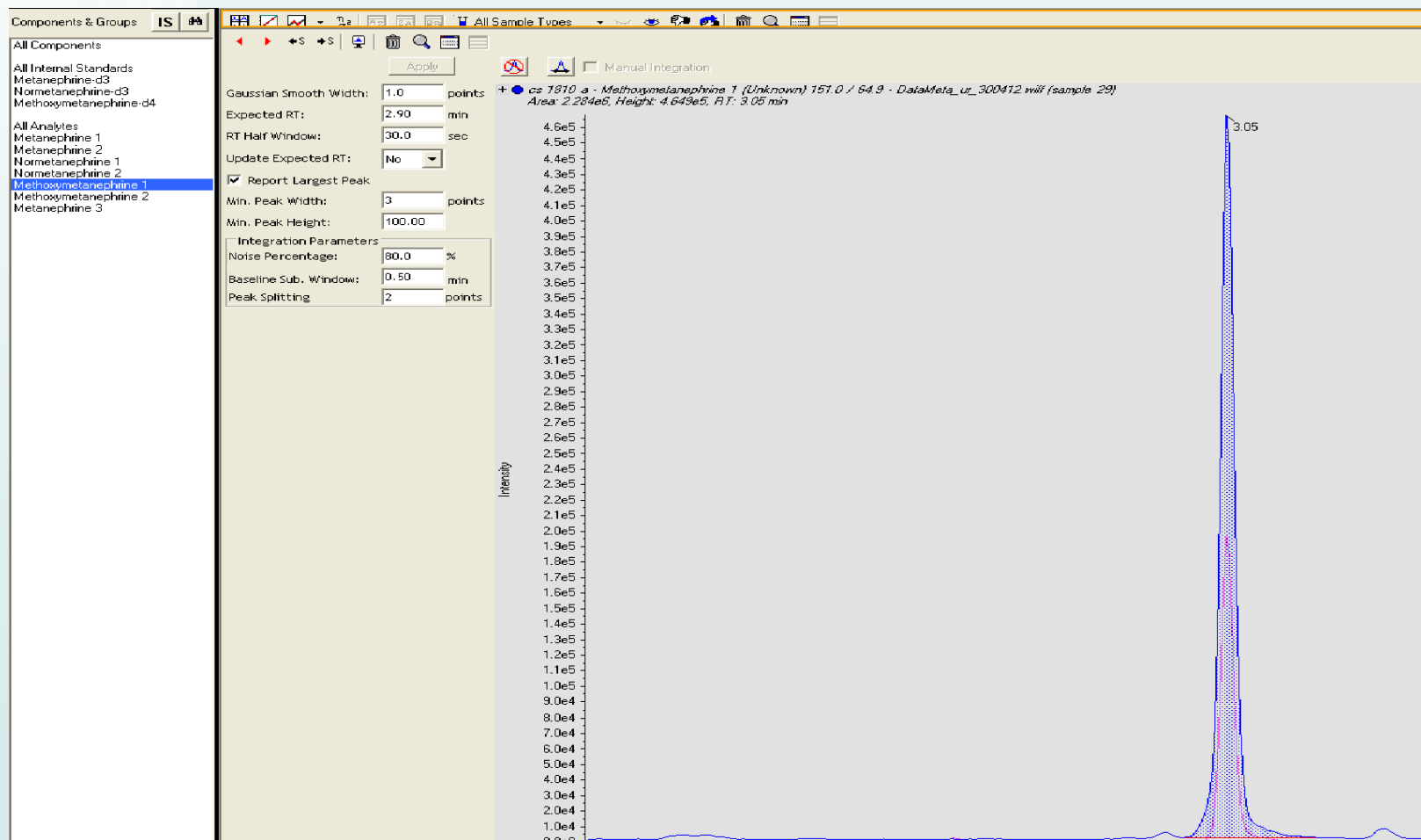
- 1 chromatogramme Méтанéphрине (LCMS/MS-Multiquant)



- 1 chromatogramme Normétanéphrine (LCMS/MS- Multiquant)

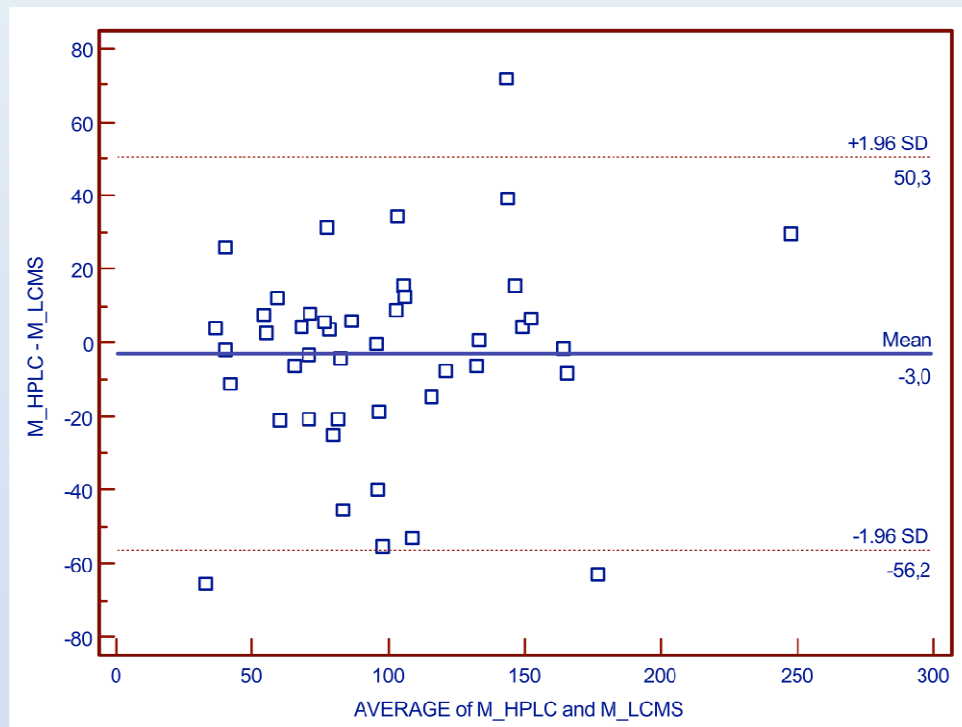


- 1 chromatogramme méthoxymétanéphrine (LCMS/MS-Multiquant)



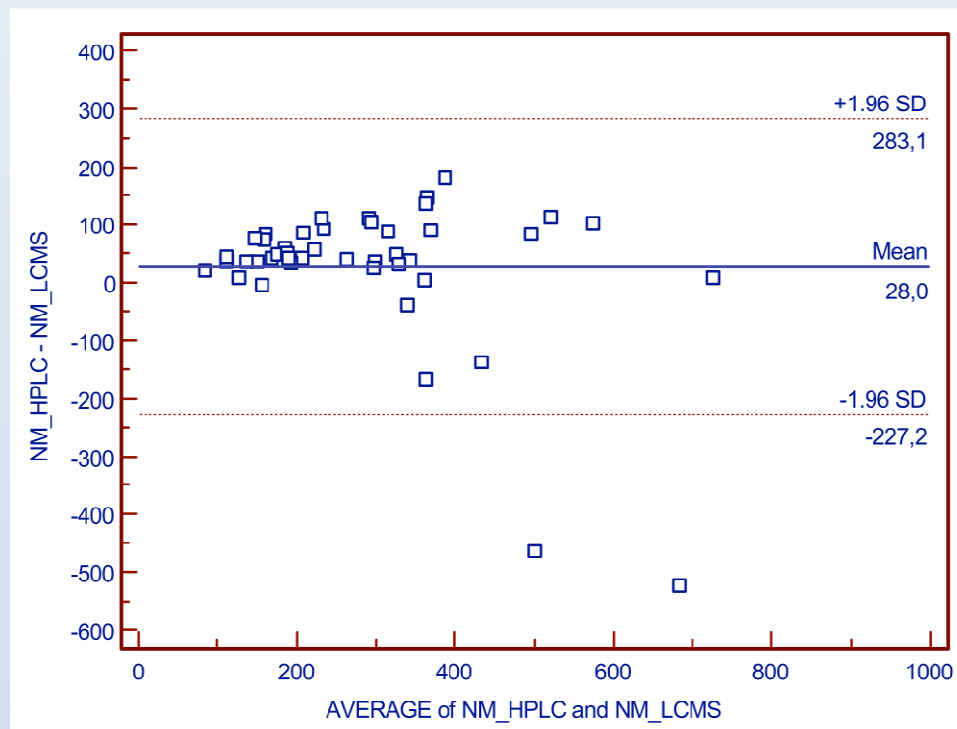
- Corrélation HPLC avec la LCMS/MS (Métanéphrines) → Bland-Altman

N=44



- Corrélation HPLC avec la LCMS/MS (Normétanéphrines) → Bland-Altman

N=44



# Performances méthanéphrines urinaires (CHU)

## HPLC

- LOQ

  - NM < 50 µg/24h

  - M < 20 µg/24h

- Répétabilité:

  - NM: CV 4.4 et 2.2% (52 et 1085 µg/24h)

  - M: CV 3.5 et 2.8 % (21 et 137 µg/24h)

- Reproductibilité

  - NM: 6.3 et 5.2 % (52 et 1085 µg/24h)

  - M: 8.3 et 7% (21 et 137 µg/24h)

- Linéarité:

  - NM → 850 µg/24h

  - M → 350 µg/24h

## LCMSMS

- LOQ

  - NM < 14.5 µg/24h

  - M < 33.8 µg/24h

- Répétabilité:

  - NM: CV 6.8% (71-853 µg/24h)

  - M: CV 8.4% (71-781 µg/24h)

- Reproductibilité

  - NM: CV 11.8% (71-853 µg/24h)

  - M: CV 12.5% (71-781 µg/24h)

- Linéarité:

  - NM → 858 µg/24h

  - M → 781 µg/24h



## HPLC

NM	11H01	11H02	11H03	11H04	11H05	11H06	12H01	12H02
n	40	41	43	45	42	41	44	45
Valeur (nmol/L)	1347	1587	6847	6309	1520	1036	953	1348
Cible (nmol/L)	1042	1600	6757	6693	1594	1017	1013	1450
Biais (%)	29,3	-0,8	1,3	-5,7	-4,6	1,9	-5,9	-7,0
Note	1	TB	TB	TB	TB	TB	TB	TB

M	11H01	11H02	11H03	11H04	11H05	11H06	12H01	12H02
n	40	41	43	45	42	41	44	45
Valeur (nmol/L)	436	505	2593	2563	459	462	435	6395
Cible (nmol/L)	463	479	2681	2652	485	489	453	7014
Biais (%)	-5,8	5,4	-3,3	-3,4	-5,4	-5,5	-4,0	-8,8
Note	TB	TB	TB	TB	TB	TB	TB	TB

## LCMSMS

NM	12H03	12H04	12H05	12H06	13BB01
n	43	39	41	42	43
Valeur (nmol/L)	5975	5868	1219	886	834
Cible (nmol/L)	7002	6813	1435	969	975
Biais (%)	-14,7	-13,9	-15,1	-8,6	-14,5
Note	B-	B-	B-	TB	B-

M	12H03	12H04	12H05	12H06	13BB01
n	43	39	41	42	43
Valeur (nmol/L)	3283	3189	7356	535	507
Cible (nmol/L)	2868	2840	7300	463	473
Biais (%)	14,5	12,3	0,8	15,6	7,2
Note	B+	TB	TB	B+	TB

NM	LC	LCMS
Lot	2008	1511
Période	25/06/08- 02/11/10	06/08/12- 08/03/13
Moyenne ( $\mu\text{g}/24\text{H}$ )	1115	952
Moyenne cible ( $\mu\text{g}/24\text{H}$ )	951	992
Biais (%)	<b>17.2</b>	<b>4.0</b>
n	112	25

M	LC	LCMS
Lot	2008	1511
Période	25/06/08- 02/11/10	06/08/12- 08/03/13
Moyenne ( $\mu\text{g}/24\text{H}$ )	379	389
Moyenne cible ( $\mu\text{g}/24\text{H}$ )	332	363
Biais (%)	<b>14.2</b>	<b>7.2</b>
n	110	25

MultiQuant 2.1 - [[SignalFinder1] Results Table (catecho130913..qsession)]

File Edit Process Window Help

Catecholamines

Components & Groups IS #

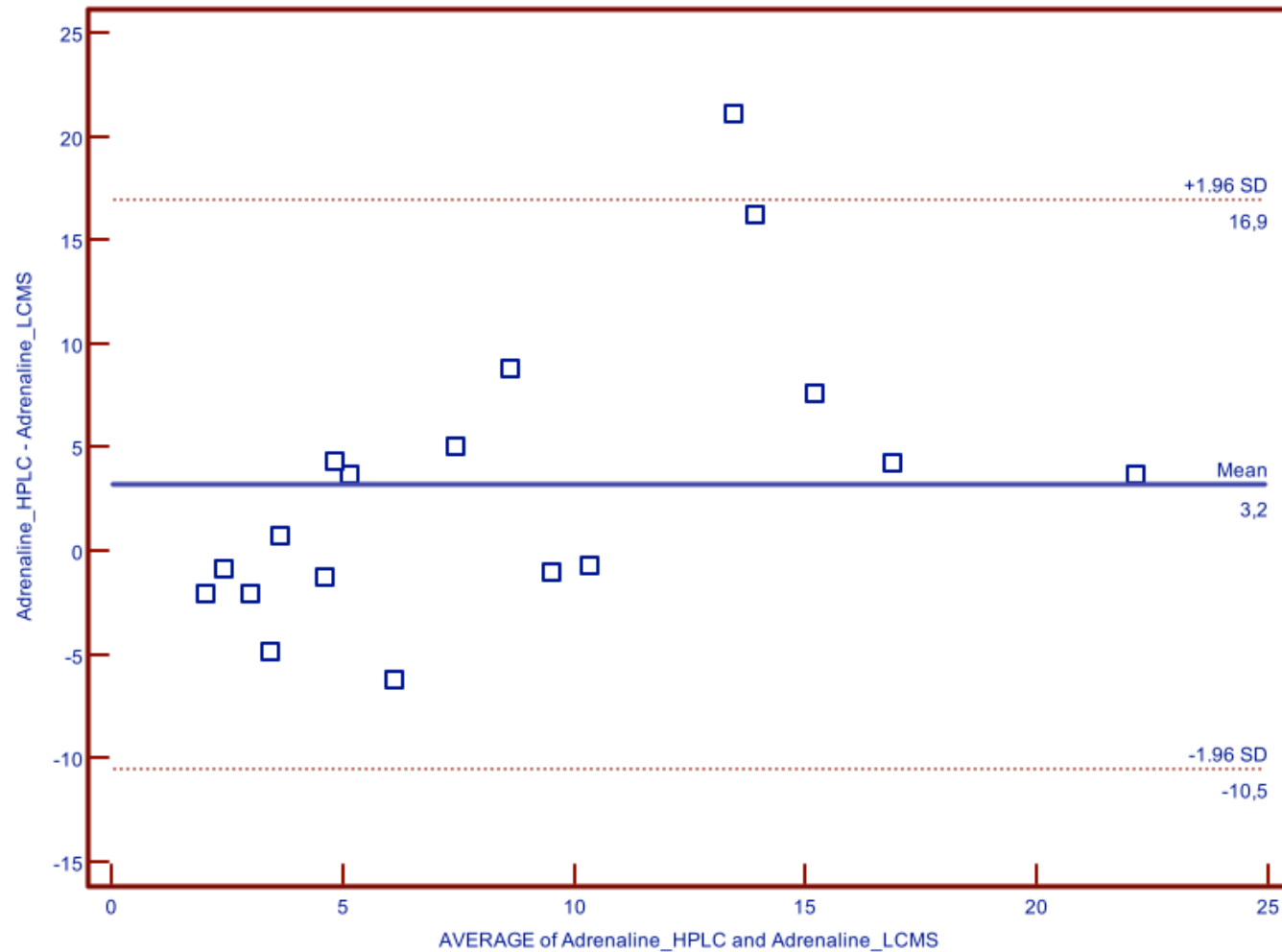
Index	Sample Name	Sample Type	IS	Component Name	Mass Info	IS Name	Actual Concentration	Area	IS Area	Area Ratio	Height	IS Height	Retention Time	Used	Calculated Concentration	Accuracy
109	11-0814-0203	Unknown	<input type="checkbox"/>	Dopamine 1	154.1 / 90.9	Dopamine d4	N/A	2.149e6	1.518e6	1.416	4.866e5	3.799e5	1.38	<input checked="" type="checkbox"/>	264.242	N/A
122	11-0814-5059	Unknown	<input type="checkbox"/>	Dopamine 1	154.1 / 90.9	Dopamine d4	N/A	1.480e7	2.116e6	6.997	2.842e6	4.352e5	1.37	<input checked="" type="checkbox"/>	567.338	N/A
135	50-0814-0007	Unknown	<input type="checkbox"/>	Dopamine 1	154.1 / 90.9	Dopamine d4	N/A	3.571e6	2.471e6	1.445	8.209e5	5.466e5	1.37	<input checked="" type="checkbox"/>	117.206	N/A
148	11-0816-0102	Unknown	<input type="checkbox"/>	Dopamine 1	154.1 / 90.9	Dopamine d4	N/A	4.385e6	2.403e6	1.824	9.785e5	5.503e5	1.37	<input checked="" type="checkbox"/>	275.223	N/A
161	11-0816-0105	Unknown	<input type="checkbox"/>	Dopamine 1	154.1 / 90.9	Dopamine d4	N/A	3.547e6	1.650e6	2.149	8.604e5	3.548e5	1.38	<input checked="" type="checkbox"/>	122.021	N/A
174	11-0816-0173	Unknown	<input type="checkbox"/>	Dopamine 1	154.1 / 90.9	Dopamine d4	N/A	4.759e5	2.168e6	0.220	1.059e5	4.993e5	1.37	<input checked="" type="checkbox"/>	28.573	N/A
187	11-0816-0175	Unknown	<input type="checkbox"/>	Dopamine 1	154.1 / 90.9	Dopamine d4	N/A	5.494e6	2.779e6	1.977	1.256e6	5.807e5	1.37	<input checked="" type="checkbox"/>	243.743	N/A
200	11-0819-0003	Unknown	<input type="checkbox"/>	Dopamine 1	154.1 / 90.9	Dopamine d4	N/A	5.528e6	1.931e6	2.777	1.544e6	5.900e5	1.14	<input checked="" type="checkbox"/>	382.881	N/A
213	11-0819-0185	Unknown	<input type="checkbox"/>	Dopamine 1	154.1 / 90.9	Dopamine d4	N/A	7.844e6	2.022e6	3.879	1.669e6	4.499e5	1.37	<input checked="" type="checkbox"/>	377.470	N/A
226	11-0816-5249	Unknown	<input type="checkbox"/>	Dopamine 1	154.1 / 90.9	Dopamine d4	N/A	3.592e6	2.634e6	1.333	8.800e5	6.569e5	1.35	<input checked="" type="checkbox"/>	210.903	N/A
239	11-0816-5250	Unknown	<input type="checkbox"/>	Dopamine 1	154.1 / 90.9	Dopamine d4	N/A	3.101e6	2.734e6	1.134	8.664e5	7.494e5	1.38	<input checked="" type="checkbox"/>	166.529	N/A
252	11-0820-0315	Unknown	<input type="checkbox"/>	Dopamine 1	154.1 / 90.9	Dopamine d4	N/A	2.185e6	2.805e6	0.779	4.790e5	5.929e5	1.36	<input checked="" type="checkbox"/>	195.938	N/A

Manual Integration  
 Expected RT: 1.34 min  
 RT Half Window: 30.0 sec  
 Update Expected RT: No  
 Report Largest Peak  
 Min. Peak Height: 0.00  
 S/N Threshold: 2.0  
 Integration Parameters  
 Confidence Threshold: 50.0 %  
 Use Global Baseline  
 Allow Non-Linear Baseline

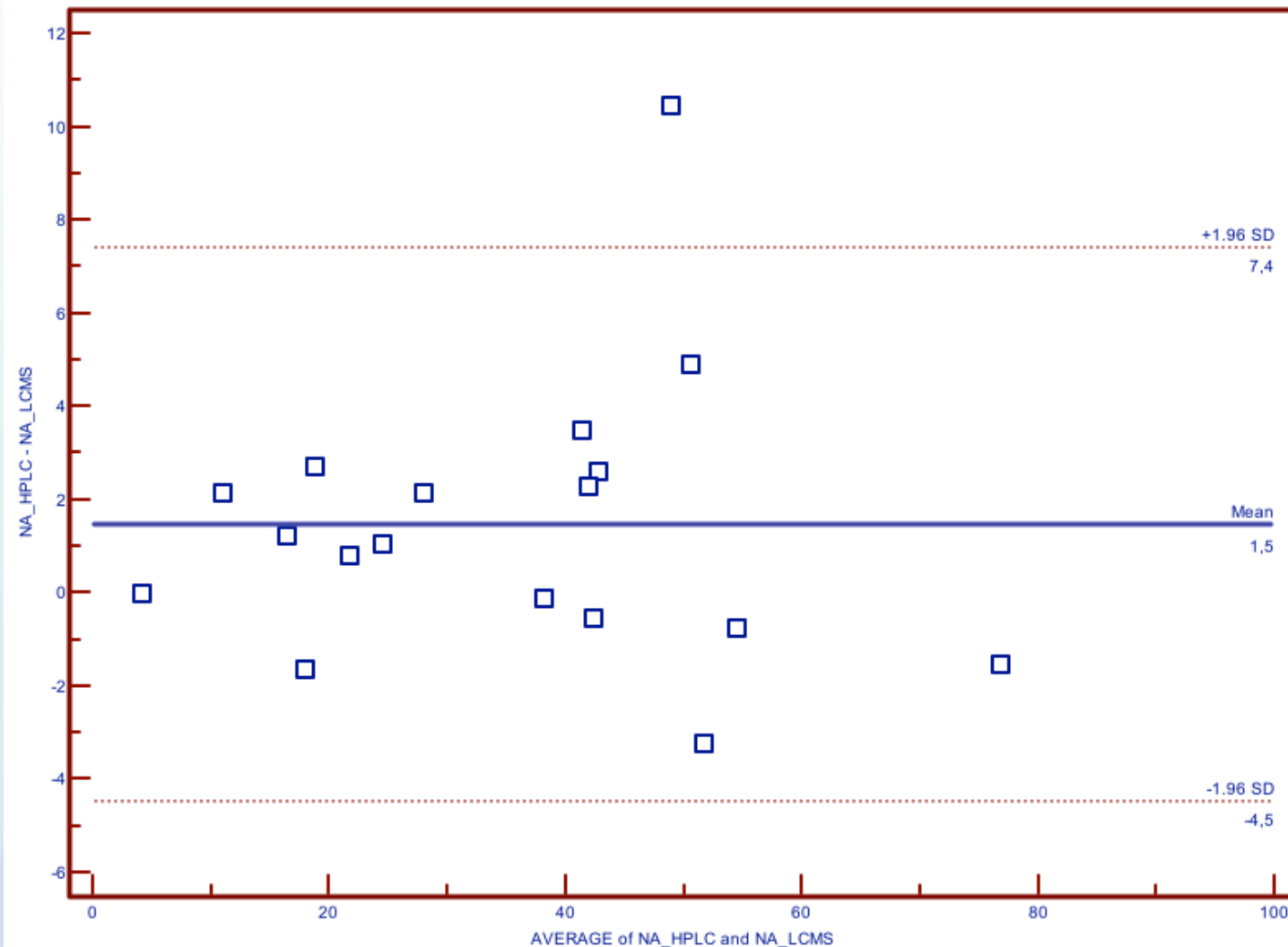
+ 11-0814-5059 - Dopamine 1 (Unknown) 154.1 / 90.9 - Datacatecho\_130913.wif (sample 10)  
 Area: 1.480e7, Height: 2.842e6, RT: 1.37 min

Regression  
 Calibration for Dopamine 1:  $y = 0.01233x + -7.03924e-4$  ( $r = 0.99623$ ) (weighting:  $1/x^2$ )

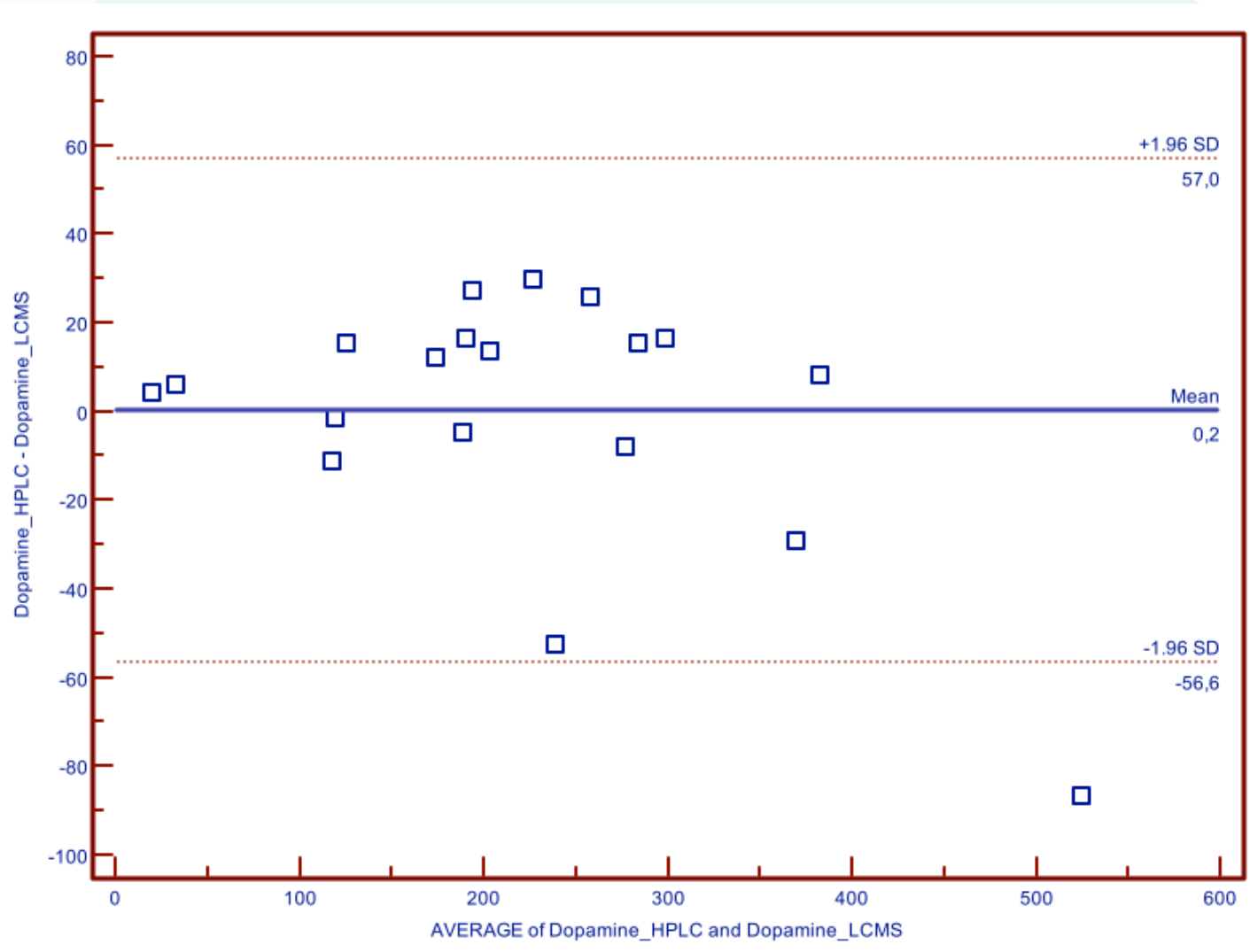
# Adrénaline



# Noradrénaline



# Dopamine



- Gain de temps:
  - Préparation de l'échantillon
- 8 h → 4 h
- Analyse
- 70 min/échantillon → 8 min/échantillon
- ➔ Temps dégagé pour d'autres développements



**Merci pour votre attention!**