



HAL
open science

Apports du suivi thérapeutique pharmacologique de la dexaméthasone dans les tests de freination

Aurélien Schrapp

► **To cite this version:**

Aurélien Schrapp. Apports du suivi thérapeutique pharmacologique de la dexaméthasone dans les tests de freination. Sciences pharmaceutiques. 2018. dumas-01932524

HAL Id: dumas-01932524

<https://dumas.ccsd.cnrs.fr/dumas-01932524>

Submitted on 23 Nov 2018

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

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

UNIVERSITÉ DE ROUEN
UFR DE MÉDECINE ET DE PHARMACIE

Année 2018

N°

THÈSE

Pour le DIPLÔME D'ÉTAT DE DOCTEUR EN PHARMACIE
MÉMOIRE DE DIPLÔME D'ÉTUDES SPÉCIALISÉES DE BIOLOGIE MÉDICALE

Présentée et soutenue publiquement le 9 Octobre 2018

Par

SCHRAPP Aurélien

Né le 22 Octobre 1988, à Saint Cyr l'Ecole

**Apports du suivi thérapeutique pharmacologique
de la dexaméthasone dans les tests de freination**

Président du jury : Pr Michel GUERBET, PU

Membres du jury : Pr Hervé LEFEBVRE, PU-PH

Dr Fabien LAMOUREUX, PH

Dr Frédéric ZIEGLER, MCU-PH

Dr Valéry BRUNEL, PH

ANNEE UNIVERSITAIRE 2017 - 2018

U.F.R. SANTÉ DE ROUEN

DOYEN : **Professeur Pierre FREGER**

ASSESEURS : **Professeur Michel GUERBET**
Professeur Benoit VEBER
Professeur Pascal JOLY
Professeur Stéphane MARRET

I - MEDECINE

PROFESSEURS DES UNIVERSITES – PRATICIENS HOSPITALIERS

Mr Frédéric ANSELME	HCN	Cardiologie
Mme Gisèle APTER	Havre	Pédopsychiatrie
Mme Isabelle AUQUIT AUCKBUR	HCN	Chirurgie plastique
Mr Fabrice BAUER	HCN	Cardiologie
Mme Soumeya BEKRI	HCN	Biochimie et biologie moléculaire
Mr Ygal BENHAMOU	HCN	Médecine interne
Mr Jacques BENICHOU	HCN	Bio statistiques et informatique médicale
Mr Olivier BOYER	UFR	Immunologie
Mme Sophie CANDON	HCN	Immunologie
Mr François CARON	HCN	Maladies infectieuses et tropicales
Mr Philippe CHASSAGNE (<i>détachement</i>)	HCN	Médecine interne (gériatrie) – Détachement
Mr Vincent COMPERE	HCN	Anesthésiologie et réanimation chirurgicale
Mr Jean-Nicolas CORNU	HCN	Urologie
Mr Antoine CUVELIER	HB	Pneumologie
Mr Pierre CZERNICHOW (<i>surnombre</i>)	HCH	Epidémiologie, économie de la santé
Mr Jean-Nicolas DACHER	HCN	Radiologie et imagerie médicale
Mr Stéfan DARMONI	HCN	Informatique médicale et techniques de communication
Mr Pierre DECHELOTTE	HCN	Nutrition
Mr Stéphane DERREY	HCN	Neurochirurgie

Mr Frédéric DI FIORE	CB	Cancérologie
Mr Fabien DOGUET	HCN	Chirurgie Cardio Vasculaire
Mr Jean DOUCET	SJ	Thérapeutique - Médecine interne et gériatrie
Mr Bernard DUBRAY	CB	Radiothérapie
Mr Philippe DUCROTTE	HCN	Hépatogastro-entérologie
Mr Frank DUJARDIN	HCN	Chirurgie orthopédique - Traumatologie
Mr Fabrice DUPARC	HCN	Anatomie - Chirurgie orthopédique et traumatologique
Mr Eric DURAND	HCN	Cardiologie
Mr Bertrand DUREUIL	HCN	Anesthésiologie et réanimation chirurgicale
Mme Hélène ELTCHANINOFF	HCN	Cardiologie
Mr Manuel ETIENNE	HCN	Maladies infectieuses et tropicales
Mr Thierry FREBOURG	UFR	Génétique
Mr Pierre FREGER	HCN	Anatomie - Neurochirurgie
Mr Jean François GEHANNO	HCN	Médecine et santé au travail
Mr Emmanuel GERARDIN	HCN	Imagerie médicale
Mme Priscille GERARDIN	HCN	Pédopsychiatrie
M. Guillaume GOURCEROL	HCN	Physiologie
Mr Dominique GUERROT	HCN	Néphrologie
Mr Olivier GUILLIN	HCN	Psychiatrie Adultes
Mr Didier HANNEQUIN	HCN	Neurologie
Mr Fabrice JARDIN	CB	Hématologie
Mr Luc-Marie JOLY	HCN	Médecine d'urgence
Mr Pascal JOLY	HCN	Dermato – Vénérologie
Mme Bouchra LAMIA	Havre	Pneumologie
Mme Annie LAQUERRIERE	HCN	Anatomie et cytologie pathologiques
Mr Vincent LAUDENBACH	HCN	Anesthésie et réanimation chirurgicale
Mr Joël LECHEVALLIER	HCN	Chirurgie infantile
Mr Hervé LEFEBVRE	HB	Endocrinologie et maladies métaboliques
Mr Thierry LEQUERRE	HB	Rhumatologie
Mme Anne-Marie LEROI	HCN	Physiologie
Mr Hervé LEVESQUE	HB	Médecine interne
Mme Agnès LIARD-ZMUDA	HCN	Chirurgie Infantile
Mr Pierre Yves LITZLER	HCN	Chirurgie cardiaque
Mr Bertrand MACE	HCN	Histologie, embryologie, cytogénétique
M. David MALTETE	HCN	Neurologie
Mr Christophe MARGUET	HCN	Pédiatrie
Mme Isabelle MARIE	HB	Médecine interne
Mr Jean-Paul MARIE	HCN	Oto-rhino-laryngologie

Mr Loïc MARPEAU	HCN	Gynécologie - Obstétrique
Mr Stéphane MARRET	HCN	Pédiatrie
Mme Véronique MERLE	HCN	Epidémiologie
Mr Pierre MICHEL	HCN	Hépatogastro-entérologie
M. Benoit MISSET	HCN	Réanimation Médicale
Mr Jean-François MUIR (<i>sumombre</i>)	HB	Pneumologie
Mr Marc MURAINÉ	HCN	Ophtalmologie
Mr Philippe MUSETTE	HCN	Dermatologie - Vénérologie
Mr Christophe PEILLON	HCN	Chirurgie générale
Mr Christian PFISTER	HCN	Urologie
Mr Jean-Christophe PLANTIER	HCN	Bactériologie - Virologie
Mr Didier PLISSONNIER	HCN	Chirurgie vasculaire
Mr Gaëtan PREVOST	HCN	Endocrinologie
Mr Jean-Christophe RICHARD (<i>détachement</i>)	HCN	Réanimation médicale - Médecine d'urgence
Mr Vincent RICHARD	UFR	Pharmacologie
Mme Nathalie RIVES	HCN	Biologie du développement et de la reproduction
Mr Horace ROMAN	HCN	Gynécologie - Obstétrique
Mr Jean-Christophe SABOURIN	HCN	Anatomie - Pathologie
Mr Guillaume SAVOYE	HCN	Hépatogastrologie
Mme Céline SAVOYE-COLLET	HCN	Imagerie médicale
Mme Pascale SCHNEIDER	HCN	Pédiatrie
Mr Michel SCOTTE	HCN	Chirurgie digestive
Mme Fabienne TAMION	HCN	Thérapeutique
Mr Luc THIBERVILLE	HCN	Pneumologie
Mr Christian THUILLEZ (<i>sumombre</i>)	HB	Pharmacologie
Mr Hervé TILLY	CB	Hématologie et transfusion
M. Gilles TOURNEL	HCN	Médecine Légale
Mr Olivier TROST	HCN	Chirurgie Maxillo-Faciale
Mr Jean-Jacques TUECH	HCN	Chirurgie digestive
Mr Jean-Pierre VANNIER (<i>sumombre</i>)	HCN	Pédiatrie génétique
Mr Benoît VEBER	HCN	Anesthésiologie - Réanimation chirurgicale
Mr Pierre VERA	CB	Biophysique et traitement de l'image
Mr Eric VERIN	HB	Service Santé Réadaptation
Mr Eric VERSPYCK	HCN	Gynécologie obstétrique
Mr Olivier VITTECOQ	HB	Rhumatologie
Mme Marie-Laure WELTER	HCN	Physiologie

MAITRES DE CONFERENCES DES UNIVERSITES – PRATICIENS HOSPITALIERS

Mme Noëlle BARBIER-FREBOURG	HCN	Bactériologie – Virologie
Mme Carole BRASSE LAGNEL	HCN	Biochimie
Mme Valérie BRIDOUX HUYBRECHTS	HCN	Chirurgie Vasculaire
Mr Gérard BUCHONNET	HCN	Hématologie
Mme Mireille CASTANET	HCN	Pédiatrie
Mme Nathalie CHASTAN	HCN	Neurophysiologie
Mme Sophie CLAEYSSENS	HCN	Biochimie et biologie moléculaire
Mr Moïse COEFFIER	HCN	Nutrition
Mr Serge JACQUOT	UFR	Immunologie
Mr Joël LADNER	HCN	Epidémiologie, économie de la santé
Mr Jean-Baptiste LATOUCHE	UFR	Biologie cellulaire
Mr Thomas MOUREZ	HCN	Virologie
Mr Gaël NICOLAS	HCN	Génétique
Mme Muriel QUILLARD	HCN	Biochimie et biologie moléculaire
Mme Laëtitia ROLLIN	HCN	Médecine du Travail
Mr Mathieu SALAUN	HCN	Pneumologie
Mme Pascale SAUGIER-VEBER	HCN	Génétique
Mme Anne-Claire TOBENAS-DUJARDIN	HCN	Anatomie
Mr David WALLON	HCN	Neurologie

PROFESSEUR AGREGE OU CERTIFIE

Mr Thierry WABLE	UFR	Communication
Mme Mélanie AUVRAY-HAMEL	UFR	Anglais

II - PHARMACIE

PROFESSEURS

Mr Thierry BESSON	Chimie Thérapeutique
Mr Roland CAPRON (PU-PH)	Biophysique
Mr Jean COSTENTIN (Professeur émérite)	Pharmacologie
Mme Isabelle DUBUS	Biochimie
Mr Loïc FAVENNEC (PU-PH)	Parasitologie
Mr Jean Pierre GOULLE (Professeur émérite)	Toxicologie
Mr Michel GUERBET	Toxicologie
Mme Isabelle LEROUX - NICOLLET	Physiologie
Mme Christelle MONTEIL	Toxicologie
Mme Martine PESTEL-CARON (PU-PH)	Microbiologie
Mr Rémi VARIN (PU-PH)	Pharmacie clinique
Mr Jean-Marie VAUGEOIS	Pharmacologie
Mr Philippe VERITE	Chimie analytique

MAITRES DE CONFERENCES

Mme Cécile BARBOT	Chimie Générale et Minérale
Mr Jérémy BELLIEN (MCU-PH)	Pharmacologie
Mr Frédéric BOUNOURE	Pharmacie Galénique
Mr Abdeslam CHAGRAOUI	Physiologie
Mme Camille CHARBONNIER (LE CLEZIO)	Statistiques
Mme Elizabeth CHOSSON	Botanique
Mme Marie Catherine CONCE-CHEMTOB	Législation pharmaceutique et économie de la santé
Mme Cécile CORBIERE	Biochimie
Mr Eric DITTMAR	Biophysique
Mme Nathalie DOURMAP	Pharmacologie
Mme Isabelle DUBUC	Pharmacologie
Mme Dominique DUTERTE- BOUCHER	Pharmacologie
Mr Abdelhakim ELOMRI	Pharmacognosie
Mr François ESTOUR	Chimie Organique
Mr Gilles GARGALA (MCU-PH)	Parasitologie

Mme Nejla EL GHARBI-HAMZA	Chimie analytique
Mme Marie-Laure GROULT	Botanique
Mr Hervé HUE	Biophysique et mathématiques
Mme Laetitia LE GOFF	Parasitologie – Immunologie
Mme Hong LU	Biologie
M. Jérémie MARTINET (MCU-PH)	Immunologie
Mme Marine MALLETER	Toxicologie
Mme Sabine MENAGER	Chimie organique
Mme Tiphaine ROGEZ-FLORENT	Chimie analytique
Mr Mohamed SKIBA	Pharmacie galénique
Mme Malika SKIBA	Pharmacie galénique
Mme Christine THARASSE	Chimie thérapeutique
Mr Frédéric ZIEGLER	Biochimie

PROFESSEURS ASSOCIES

Mme Cécile GUERARD-DETUNCQ	Pharmacie officinale
Mr Jean-François HOUIVET	Pharmacie officinale

PROFESSEUR CERTIFIE

Mme Mathilde GUERIN	Anglais
----------------------------	---------

ASSISTANT HOSPITALO-UNIVERSITAIRE

Mme Anaïs SOARES	Bactériologie
-------------------------	---------------

ATTACHES TEMPORAIRES D'ENSEIGNEMENT ET DE RECHERCHE

Mme Anne-Sophie CHAMPY	Pharmacognosie
M. Jonathan HEDOUIN	Chimie Organique
Mme Barbara LAMY-PELLETER	Pharmacie Galénique

LISTE DES RESPONSABLES DES DISCIPLINES PHARMACEUTIQUES

Mme Cécile BARBOT	Chimie Générale et minérale
Mr Thierry BESSON	Chimie thérapeutique
Mr Roland CAPRON	Biophysique
Mme Marie-Catherine CONCE-CHEMTOB	Législation et économie de la santé
Mme Elisabeth CHOSSON	Botanique
Mme Isabelle DUBUS	Biochimie
Mr Abdelhakim ELOMRI	Pharmacognosie
Mr Loïc FAVENNEC	Parasitologie
Mr Michel GUERBET	Toxicologie
Mr François ESTOUR	Chimie organique
Mme Isabelle LEROUX-NICOLLET	Physiologie
Mme Martine PESTEL-CARON	Microbiologie
Mr Mohamed SKIBA	Pharmacie galénique
Mr Rémi VARIN	Pharmacie clinique
M. Jean-Marie VAUGEOIS	Pharmacologie
Mr Philippe VERITE	Chimie analytique

ENSEIGNANTS MONO-APPARTENANTS

PROFESSEURS

Mr Serguei FETISSOV (med)	Physiologie (ADEN)
Mr Paul MULDER (phar)	Sciences du Médicament
Mme Su RUAN (med)	Génie Informatique

MAITRES DE CONFERENCES

Mr Sahil ADRIOUCH (med)	Biochimie et biologie moléculaire (Unité Inserm 905)
Mme Gaëlle BOUGEARD-DENOYELLE (med)	Biochimie et biologie moléculaire (UMR 1079)
Mme Carine CLEREN (med)	Neurosciences (Néovasc)
M. Sylvain FRAINEAU (med)	Physiologie (Inserm U 1096)
Mme Pascaline GAILDRAT (med)	Génétique moléculaire humaine (UMR 1079)
Mr Nicolas GUEROUT (med)	Chirurgie Expérimentale
Mme Rachel LETELLIER (med)	Physiologie
Mme Christine RONDANINO (med)	Physiologie de la reproduction
Mr Antoine OUVRARD-PASCAUD (med)	Physiologie (Unité Inserm 1076)
Mr Frédéric PASQUET	Sciences du langage, orthophonie
Mme Isabelle TOURNIER (med)	Biochimie (UMR 1079)

CHEF DES SERVICES ADMINISTRATIFS : Mme Véronique **DELAFONTAINE**

HCN - Hôpital Charles Nicolle

HB - Hôpital de BOIS GUILLAUME

CB - Centre Henri Becquerel

CHS - Centre Hospitalier Spécialisé du Rouvray

CRMPR - Centre Régional de Médecine Physique et de Réadaptation

SJ - Saint Julien Rouen

« L'Université de Rouen et l'UFR de Médecine et de Pharmacie de Rouen n'entendent donner aucune approbation ni improbation aux opinions émises dans cette thèse. Ces opinions sont propres à leurs auteurs. »

Remerciements

A mon jury :

A Monsieur le Professeur **Michel Guerbet**,

Je vous remercie de me faire l'honneur de présider ce jury. Je vous prie de trouver ici l'expression de ma sincère gratitude.

A Monsieur le Professeur **Hervé Lefebvre**,

Je vous remercie d'avoir répondu positivement pour juger ce travail, vous me faites l'honneur d'apporter votre expertise à l'évaluation de ce travail et je vous prie de recevoir toute ma reconnaissance et mon plus grand respect.

A Monsieur le Docteur **Valery Brunel**,

Merci de m'accorder ta confiance, ta parole est d'or et ton savoir n'a d'égal que la pertinence de tes propos. Je te suis reconnaissant pour tout et tacherai de te donner entière satisfaction à l'avenir.

A Monsieur le Docteur **Frédéric Ziegler**, mon co-directeur,

Merci d'avoir participé à ce travail et d'alimenter mes connaissances débutantes en hormonologie, ta personnalité est un précieux atout au quotidien.

A Monsieur le Docteur **Fabien Lamoureux**, mon directeur,

Il y a des rencontres qui changent une vie, mon internat n'aurait pas été pareil sans toi, merci d'avoir accepté d'encadrer ce travail malgré les innombrables sollicitations dont tu fais l'objet. Quel plaisir de travailler et de discuter ensemble, j'espère que ce n'est pas fini.

A Sylvie, pour ses cours de cytologie dans la bonne humeur, j'espère par ailleurs que tu aimes maintenant Star Wars autant que Kévin.

A Kévin, merci pour tes réponses pertinentes à toutes les questions que j'avais pendant l'internat, si la génétique te passe, le Ministère sera sûrement ravi de t'avoir à sa tête.

Aux Villepreusiens, Benj mon ami de toujours et compagnon de voyage au moral sans failles. Kev, le pirate des mers calmes, Kent tu n'as pas changé, Fred mon copain à 110dB, Mike l'artiste, Vince l'inimitable, Guix la force tranquille, Jo le virtuose du calembourg, Ben l'ours des alpes suisses, Xav l'astrophysicien des veillées tardives, et Baz, le meilleur (des cascadeurs).

A Gwendoline, la boîte de 6 (plutôt de 4) qui vient aussi d'Alsace, merci pour ta bonne humeur inaltérable et le semestre passé à tes côtés.

A William, merci de m'avoir fait connaître les joies de l'ERG, je suis certain de ne pas être épileptique maintenant.

Au Professeur et Capitaine Olivier Boyer, pour m'avoir fait naviguer 6 mois dans le bateau de l'immunologie, Marc Aurèle vous attend en 2019.

A Jérémie, merci pour tes enseignements d'immunologie, et je n'oublierai pas ce fameux test d'activation des basophiles à la fin de ta cérémonie de mariage.

A Cédric, pour ton humour Normand, on ne peut pas rire de tout mais tu arrives à faire rire tout le monde.

A Tony, merci pour la transmission de ton savoir chromatographique, tu ne manques jamais une transition, j'espère que les colonnes ne nous sépareront pas de ci-tôt !

A Muriel, merci pour être certainement à l'origine de mes passions biochimiques.

A Sophie, merci pour la rigueur et l'énergie dont tu fais preuve en pratique, j'espère en avoir absorbé une millimole.

A François, merci de me faire partager ton puit de science pharmaco-biochimique au quotidien.

Aux jeunes qui prennent la relève de l'IBC, Guillaume, Marion C, Marion D, François, DJ Fiston, Tania, Tanguy Scorsese, Pierre, Jennifer et tous ceux que j'oublie.

Au GDAM, merci d'être l'alchimie particulière qui m'a fait passer tant de bons moments.

A Bertrand, finalement éloigné de nos utopies officinales, toi la veuve et l'orphelin, moi la science. Au moins la CNAM a trouvé son directeur de conscience.

A Laurent, parce que tu es à la toxicologie ce que Dave Grohl est au rock.

A Auriane, Wassim et Clément, pour m'avoir aidé au recueil des données de ce travail.

Aux techniciens de Pharmacologie, David, Nancy, Marina, Mamie Pat', Sophie, Caro... Pour avoir toujours été là pour mes demandes au labo et m'avoir préparé tous ces litres de phase mobile, je ne suis pas qu'une pelleuse mais aussi un siphon vous voyez.

Aux techniciens de biochimie, le futur groupe des métalleux, les sages des protéines, les maîtres du Cobas, les magiciens de l'hormonologie.

A Paul Billoir, pour avoir rétabli l'équilibre dans la force.

A Thomas, merci pour tes conseils avisés et tes lignes de codes révisées.

A Polo, mon partenaire de défis sportifs démesurés.

A Rémi, merci pour avoir forgé une partie de mon caractère.

A Marcel Patoulatchi, le temps se contracte mais ton humour est intact.

A Victor, merci pour le meilleur, et le pire, de mon internat. Dans le travail et dans la fête tu es toujours là !

A Valentin, pour ce semestre d'hémato et ces semaines (trop courtes) à l'EFS.

A Julien, le super héros de la psychiatrie.

Au Docteur Agnès Lahary, pour sa bienveillance chronique à mon égard.

A Morgan, le petit frère que j'aurais aimé avoir.

To Mike, I hope that the instruments Thermo sold us are as reliable as your legs, thanks for the whiskey basin trail, good luck for your 100miles.

To Pawan, my friend, I miss my running mate, I will be there for your Nobel Prize ceremony.

To Ritin, thank you for teaching me the Lumos spell.

To Kristin & Eric, Travis President!

To Apurva, dear Master Jedi, thank you for teaching me a "bit" of code.

To Victoria, thank you, so much patience in one unique person.

To Krystine, I appreciated working with you, even if we didn't go that far.

A Patrick, Le rêve américain c'est grâce à toi.

A Sandrine, pour tous les verres de Cristalline qu'on a partagés.

A Benoît Berby, the best of the best.

A Maud, la plus rock&roll des généticiennes, les bases d'AT/CG étaient bien alignées, les guitares amplifiées, mais la PCR n'a pas fonctionné sur moi, merci pour ces bons moments en immuno.

A Benoît Déchelotte, la réflexion de ce travail a commencé avec toi ce soir de garde. Je n'ai pas encore trouvé quelque chose que tu fais mal mais je vais continuer à chercher.

Au Dr Hélène Girot pour sa personnalité agréable avec qui j'aime échanger.

Aux biologistes que j'ai eu la chance de côtoyer pendant cet internat, le Dr Buchonnet, Dr Wils, Dr Lenormand, Dr Jouen, Dr Jacquot, Dr Lemée, merci pour vos enseignements

A Jules, si tu n'existais pas il faudrait t'inventer. Loin du cœur mais pas loin de mes pensées.

A Fred, pour être toujours de bon conseil en toute occasion.

A Papa et Maman, pour tout...

A Elsa, tu es comme la biologie, il faut du temps pour la comprendre, mais quand tu commences à toucher l'immensité de sa beauté, tu réalises qu'il faudra une vie pour la connaître...

Sommaire

Abréviations :	
Liste des tableaux :	
Liste des illustrations :	
1. Introduction	1
2. Hypercorticismes	3
2.1 Rappels de physiologie	3
2.1.1 Physiologie de l'axe corticotrope	3
2.1.2 Physiologie de la glande surrénale	5
2.2 Glucocorticoïdes	6
2.3 Syndrome de Cushing	7
2.3.1 Présentation	7
2.3.3 Traitement	14
2.3.4 Test de freination	15
2.3.4.1 Dexaméthasone	16
3. Travaux personnels	24
3.1 Objectifs de l'étude	24
3.2 Matériel et méthodes	25
3.2.1 Population étudiée	25
3.3. Dosages	25
3.3.1. Prélèvement et phase pré-analytique	25
3.3.2. Dosage du cortisol	25
3.3.3. Dosage de l'ACTH	26
3.3.4. Méthode de dosage de la dexaméthasone	26
3.3.5. Analyse statistique	30
3.3.6. Intervalle ou valeurs de référence	31
4. Résultats	32
4.1. Validation analytique de la méthode de dosage HPLC-MS/MS de la dexaméthasone plasmatique	32
4.2. Application sur une série de patients	39
4.2.1 Caractéristiques de la population	39
4.2.2. Cortisol post test de freination dans les groupes de patients avec ou sans freination efficace	41
4.2.3. Cortisol libre urinaire dans les groupes de patients avec ou sans freination efficace	42
4.2.4. Cortisol salivaire dans les groupes de patients avec ou sans freination efficace	43
4.2.5. Concentrations plasmatiques de Dexaméthasone dans les groupes de patients avec ou sans freination efficace	44
4.2.6. Cycles journaliers d'ACTH dans les groupes de patients avec ou sans freination efficace	46
4.2.7. Corrélation entre les concentrations sériques de cortisol et plasmatiques de dexaméthasone	47
4.2.8. Estimation de l'intervalle de référence des concentrations plasmatiques résiduelles de dexaméthasone	48
4.2.9. Corrélation entre concentrations plasmatiques résiduelles de dexaméthasone et résultat du test de freination	49
5. Discussion	50
6. Conclusion	55
7. References	56

Abréviations :

11 β -HSD2 : Hydroxysteroid 11-beta-dehydrogenase 2

ACTH : Adrénocorticotrophine

CBG : Cortisol Binding Globulin

CE : Cell Entry

CIQ : Contrôle Interne de Qualité

CLSI : Clinical and Laboratory Standard Institute

COFRAC : Comité Français d'Accréditation

COX-2 : Cyclo oxygénase de type 2

CRH : Cortisol Releasing Hormone

CRH-R1 : Cortisol Releasing Hormone Receptor 1

CRH-R2 : Cortisol Releasing Hormone Receptor 2

CV : Coefficient de Variation

CXP : Cell Exit Potential

DP : Declustering Potential

ECLIA : Electrochimiluminescence

EP : Entry Potential

GABA : Acide Gamma Amino Butyrique

GR : Glucocorticoid Receptor

HHS : Hypothalamo-Hypophyso-Surrénalien

HPLC-MS/MS : Chromatographie liquide haute performance couplée à la spectrométrie de masse en tandem

IL1 : Interleukine 1

IL6 : Interleukine 6

LOQ : Limite basse de quantification

MC2R : Melanocortin Receptor 2

MRM : Multiple Reaction Monitoring

NF- κ B : Nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells

NOS : NO synthase

RIA : Radio-Immuno Analyse

ROC : Receiver Operator Characteristic

SNR : Rapport signal sur bruit

StAR : Steroid Acute Regulatory protein

TNF : Tumor Necrosis Factor

Liste des tableaux :

Tableau 1 : Conditions affectant la clairance du cortisol.

Tableau 2 : Paramètres à valider pour une méthode quantitative selon le SH GTA-04.

Tableau 3 : Paramètres MS/MS des transitions suivies pour la méthode de dosage de la dexaméthasone.

Tableau 4 : Ratio MRM des différents calibrants.

Tableau 5 : Evaluation de la limite de quantification de la méthode de dosage de la dexaméthasone.

Tableau 6 : Evaluation de la répétabilité de la méthode de dosage de la dexaméthasone.

Tableau 7 : Evaluation de la fidélité intermédiaire de la méthode de dosage de la dexaméthasone.

Tableau 8 : Evaluation de l'effet matrice sur la méthode de dosage de la dexaméthasone.

Tableau 9 : Evaluation de l'effet de trois cycles de congélation/décongélation sur la méthode de dosage de la dexaméthasone.

Tableau 10 : Caractéristiques démographiques et cliniques de la population étudiée (moyenne \pm écart type si non spécifié).

Liste des illustrations :

Figure 1 : Schéma de l'axe corticotrope. Adapté de Yehuda et al.

Figure 2 : (A) Schéma anatomique de la glande surrénale. (B) Coupe transversale microscopique de la glande surrénale

Figure 3 : Symptômes observés dans le syndrome de Cushing.

Figure 4 : Logigramme pour le diagnostic du syndrome de Cushing, adapté de Nieman.

Figure 5 : Numérotation et structure chimique des dérivés stéroïdiens. (A) Numérotation et structure chimique du cholestérol. (B) Structure chimique du cortisol. (C) Structure chimique de la dexaméthasone.

Figure 6 : Schéma de la voie de synthèse du cortisol, adapté de Michal et Schomburg.

Figure 7 : Métabolisme du cortisol, d'après Burtis.

Figure 8 : Structure chimique de la dexaméthasone-D4.

[Figure 9](#) : Schéma des gradients chromatographiques retenus pour la méthode de dosage de la dexaméthasone développée au laboratoire. (A) Ligne de chargement de l'échantillon. (B) Ligne analytique. La commutation de vanne a lieu à 0,6min et 2,5min.

[Figure 10](#) : Rapport des signaux des transitions de quantification et de confirmation en MRM.

[Figure 11](#) : Courbe de calibration de la méthode 0,5-10ng/mL, 7 points + blanc.

[Figure 12](#) : Rapport du signal sur bruit à la limite de quantification (LOQ).

[Figure 13](#) : Structure chimique de la bétaméthasone, groupement méthyl C16 en bêta (rouge).

[Figure 14](#) : Organigramme de l'étude.

[Figure 15](#) : Concentrations en cortisol sérique à 8H dans la population étudiée.

[Figure 16](#) : Concentrations de cortisol libre urinaire dans les groupes de patients freinés et non freinés.

[Figure 17](#) : Concentrations en cortisol salivaire dans les groupes freinés et non freinés.

[Figure 18](#) : Concentrations plasmatiques de dexaméthasone à 8H entre les patients freinés et non freinés.

[Figure 19](#) : Corrélation entre la concentration plasmatique résiduelle de dexaméthasone et l'IMC des patients de la population étudiée.

[Figure 20](#) : Concentration plasmatique d'ACTH suivant l'heure de prélèvement pour les groupes de patients freinés et non freinés.

[Figure 21](#) : Corrélation entre les concentrations sériques de cortisol et plasmatiques de dexaméthasone.

[Figure 22](#) : Répartition de la concentration plasmatique résiduelle de dexaméthasone dans la population étudiée (bleu) et densité de probabilité (rouge) montrant une répartition log-normale.

[Figure 23](#) : Courbe ROC de la relation entre le résultat du test de freination et des concentrations résiduelles plasmatiques de la dexaméthasone.

1. Introduction

Le syndrome de Cushing est défini comme une hypersécrétion chronique du principal glucocorticoïde endogène, le cortisol, par les glandes surrénales (hypercortisolisme ou hypercorticisme). Il a été décrit initialement par un médecin américain, le docteur Harvey Cushing, en 1932 et comprend un ensemble de symptômes relatifs à cette sécrétion augmentée de cortisol. Des adénomes hypophysaires sont le plus souvent à l'origine de cette pathologie, par stimulation indirecte. Cependant, les symptômes cliniques d'un excès de glucocorticoïdes sont assez fréquemment retrouvés dans la population générale du fait de nombreuses pathologies pouvant causer des signes cliniques semblables, telles que l'obésité, l'éthylisme chronique ou des pathologies endocriniennes multiples. Dans ce contexte, les hypersécrétions avérées de glucocorticoïdes endogènes, c'est-à-dire les syndromes de Cushing « vrais » restent rares.

Des tests de laboratoire spécifiques permettent de détecter ces perturbations clinico-biologiques. Parmi ces tests, le test de freination à la dexaméthasone est un outil dynamique majeur visant à évaluer la capacité de freination de la sécrétion de cortisol par un rétrocontrôle négatif sur l'axe hypothalamo-hypophyso-surrénalien (HHS) après administration de ce médicament. Lorsque la concentration plasmatique de cortisol demeure élevée malgré l'administration de dexaméthasone à des doses suffisantes, une dérégulation hormonale de cet axe peut être évoquée. Dans la majorité des cas, le résultat du test est négatif, avec une freination efficace de la sécrétion du cortisol par la dexaméthasone, en dehors de tout adénome hypophysaire, démontrant ainsi l'intérêt du test de freination dans le diagnostic différentiel du syndrome de Cushing. Cependant, dans un nombre non négligeable de cas et en l'absence de syndrome de Cushing avéré, la freination de la sécrétion du cortisol par la dexaméthasone demeure inefficace.

Une explication à cette variabilité interindividuelle de réponse à la dexaméthasone pourrait provenir d'une exposition insuffisante, notamment du fait d'un défaut d'observance de la prise du médicament, d'un défaut d'absorption digestive de la dexaméthasone, d'interactions médicamenteuses, d'une pharmacodynamie retardée de celle-ci ou encore de perturbations d'ordre pharmacogénétique concernant son transport, son métabolisme ou son activité pharmacologique.

Au cours de ce travail de thèse, nous nous sommes intéressés au suivi thérapeutique pharmacologique des concentrations résiduelles de dexaméthasone au cours des tests de freination de la sécrétion du cortisol. Après avoir développé et validé une méthodologie hautement spécifique de dosage de la dexaméthasone par chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse en tandem (HPLC-MS/MS), nous avons évalué la relation entre l'exposition à ce médicament et la sécrétion du cortisol dans une cohorte de patients admis dans le service d'Endocrinologie du CHU de Rouen.

2. Hypercorticismes

2.1 Rappels de physiologie

2.1.1 Physiologie de l'axe corticotrope

L'axe hypothalamo-hypophyso-surrénalien est responsable de la production des glucocorticoïdes, hormones stéroïdes impliquées dans de nombreux processus physiologiques. L'HHS se compose de trois parties : l'hypothalamus, l'hypophyse et les corticosurrénales ([Figure 1](#)). Il permet par le biais de ses différents médiateurs hormonaux et mécanismes de rétrocontrôle de réguler finement la concentration du cortisol, principal glucocorticoïde, dans la circulation sanguine ([1](#)).

Au niveau supérieur de l'axe HHS, l'hypothalamus sécrète la *Cortisol Releasing Hormone* (CRH), au niveau du système porte hypothalamo-hypophysaire, elle stimule la production d'adrénocorticotrophine (ACTH) par l'antéhypophyse ([2](#)). Il existe deux récepteurs différents à la CRH (CRH-R1 et CRH-R2). La CRH entraîne des effets corticotropes (endocrines, immuns, réponse au stress etc.) exclusivement par l'action sur CRH-R1 tandis que le CRH-R2 est localisé principalement au niveau cérébral et serait impliqué dans la régulation de la réponse au stress ([3](#)).

L'ACTH circule de manière systémique pour se fixer sur ses récepteurs MC2R (*MelaCortin Receptor 2*) situés sur les cellules du cortex surrénalien et stimule la production de cortisol par la partie corticale de la glande surrénale ([4](#)). Le cortisol sécrété entraîne un rétrocontrôle négatif sur les sécrétions de CRH et d'ACTH, respectivement par l'hypothalamus et l'antéhypophyse. Cette imbrication mutuelle conduit à une stabilité de l'ensemble de l'axe hormonal.

La concentration de cortisol dans la circulation sanguine varie selon un cycle nyctéméral (ou cycle circadien) et l'activité physique. Chez le sujet sain, le minimum de concentration plasmatique de cortisol est observé vers minuit et le maximum est généralement observé vers 8 heures le matin. L'ACTH suit le même rythme de sécrétion avec un léger décalage temporel, qui découle de sa capacité de rétrocontrôle. La sécrétion de l'ACTH dépend de la sécrétion de la CRH. Par ailleurs, le cycle circadien est initialement calibré sur 25 heures par les composants moléculaires, récepteurs et facteurs de transcription au niveau hypothalamique mais est réajusté

par l'exposition ophtalmique au cycle diurne. Ce rythme peut être modifié pour les personnes possédant un mode de vie désynchronisé des cycles solaires ou même aboli en conditions pathologiques.

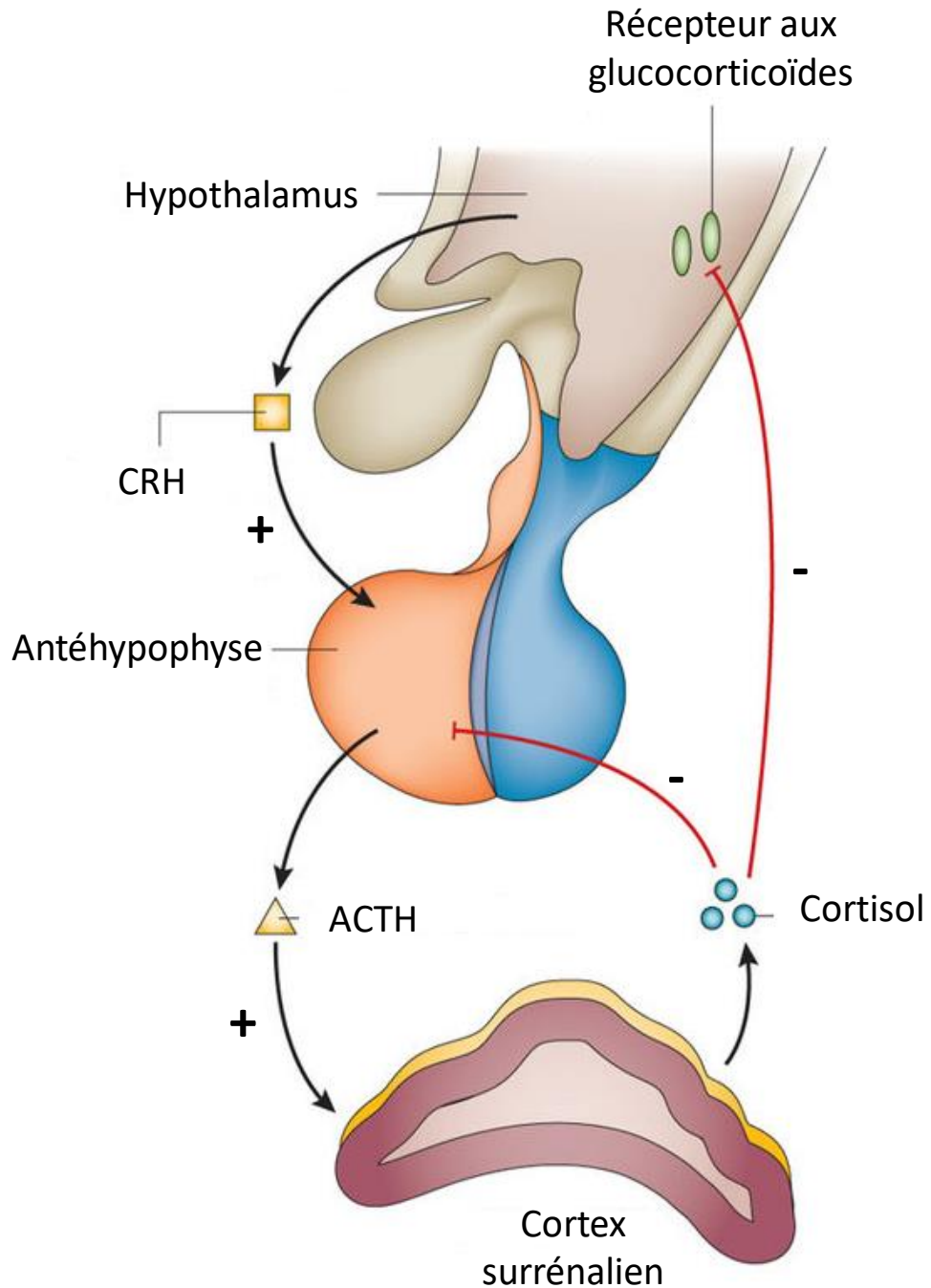


Figure 1: Schéma de l'axe corticotrope. Adapté de Yehuda et al. (2).

D'autres médiateurs peuvent moduler la régulation de l'axe HHS. Des neurotransmetteurs possèdent notamment une capacité à stimuler ou à freiner l'axe HHS. L'acétylcholine, la 5-hydroxy-tryptamine et la noradrénaline présentent une action stimulante sur l'hypothalamus et augmentent la sécrétion de la CRH tandis que le GABA réfreine l'axe HHS (5). Les cytokines IL-1, IL-6 et le TNF présentent également la capacité de stimuler directement l'axe HHS et établissent un lien entre le système neuroendocrine et le système immunitaire (6). En conséquence, certaines conditions pathologiques immunitaires, psychiatriques ou inflammatoires sont susceptibles d'entraîner des désordres corticotropes.

2.1.2 Physiologie de la glande surrénale

Les glandes surrénales sont situées à l'extrémité supérieure des deux reins. Elles sont de forme pyramidale et mesurent environ 2 à 3 cm de large (Figure 2A). Chez l'individu sain leur poids est d'environ 4 grammes, sans variation liée à l'âge (même chez le nouveau-né), au sexe ou au poids. Chaque glande est composée de deux parties : au centre, la médullosurrénale qui assure la production de catécholamines et autour le cortex qui constitue la corticosurrénale.

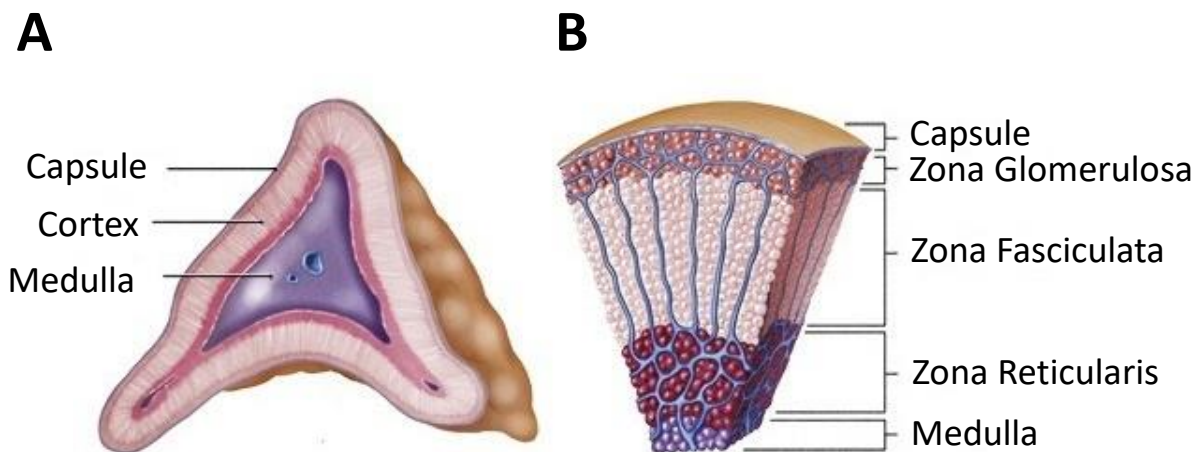


Figure 2 : (A) Schéma anatomique de la glande surrénale. (B) Coupe transversale microscopique de la glande surrénale

Les corticosurrénales assurent la production des hormones stéroïdes. Chacune d'elle se décompose en 3 couches concentriques, dans la partie la plus externe, la *zona glomerulosa*, constitue 15% du cortex puis la *zona fasciculata* pour 75% et enfin la *zona reticularis* au niveau le plus profond. Chaque couche est responsable de la synthèse plus ou moins spécifique d'un type d'hormone stéroïde : minéralocorticoïdes dans la *zona glomerulosa*, glucocorticoïdes dans la *zona fasciculata* et androgènes dans la *zona reticularis* ([Figure 2B](#)).

2.2 Glucocorticoïdes

On appelle glucocorticoïdes les stéroïdes synthétiques ou naturels avec un effet comparable au cortisol ([7](#)). Le cortisol est une hormone jouant un rôle physiologique majeur en affectant de nombreux tissus dans l'organisme. L'action des glucocorticoïdes a lieu grâce à la liaison au *Glucocorticoid Receptor* (GR) présent dans de nombreux tissus ([8](#)).

Sur le métabolisme, ils jouent un rôle majeur en stimulant la synthèse des enzymes néogluco-géniques au niveau hépatique (glucose-6-phosphatase et phospho-énol pyruvate carboxykinase), en augmentant le contenu en glycogène hépatique et en inhibant la glycogène phosphorylase à la fois dans le muscle et le tissu adipeux, ce qui contribue à augmenter les niveaux de glucose circulant. Ils stimulent la protéolyse dans le muscle et les tissus conjonctifs, et augmentent la libération de glycérol et d'acides gras dans le tissu adipeux. Il fournit par cet effet les substrats nécessaires à la néogluco-génèse hépatique. Sous l'action des glucocorticoïdes, le catabolisme protéique entraîne un amincissement de la peau et une fragilité des tissus conjonctifs, ainsi qu'une dégradation du collagène osseux associée à une ostéoporose. De manière générale, ils entraînent donc un catabolisme cellulaire.

Une surexposition aux glucocorticoïdes provoque la redistribution du tissu adipeux vers le tronc, le cou et le visage. A noter qu'ils augmentent aussi l'appétit, et par conséquent entraînent une prise de poids. Les glucocorticoïdes participent au maintien du tonus vasculaire et de la fonction cardiaque, bloquent la libération d'histamine et stabilisent les membranes lysosomales ([9](#)).

Sur l'humeur, en cas de surexposition ils sont susceptibles d'entraîner des modifications psychologiques de type accès maniaque pouvant aller jusqu'à la psychose.

Les glucocorticoïdes sont également de puissants agents anti inflammatoires par l'inhibition nucléaire de la voie NF- κ B ([10](#)). L'effet anti-inflammatoire passe aussi par la répression des gènes de la cyclo-oxygénase 2 (COX-2), de la NO synthase inductible (NOS), des interleukines IL1 -2 -6,

TNF alpha, interféron gamma et *E-selectin*. Cet effet anti-inflammatoire s'accompagne d'une composante immunosuppressive par diminution du recrutement des cellules immunitaires associé à une diminution d'expression de cytokines pro-inflammatoires.

Enfin, la plupart des glucocorticoïdes possèdent de manière concomitante des effets minéralocorticoïdes, mais amoindris *in situ* pour le cortisol, par l'existence de 11 β -HSD2 (*Hydroxysteroid 11-beta dehydrogenase 2*) qui inactive le cortisol en cortisone.

La production endogène normale de cortisol varie de 6 à 14 mg/m² par 24 heures ce qui correspond chez l'adulte à environ 10 à 20 mg/ jour en moyenne. De 80 à 90 % du cortisol est transporté par la *Cortisol Binding Globulin* (CBG), 7% est faiblement lié à l'albumine et donc 2 à 3% circule sous forme libre. Lorsque la sécrétion de cortisol augmente la fraction de cortisol libre est plus importante et est éliminée dans les urines [\(11\)](#). Les niveaux de CBG augmentent en réponse aux œstrogènes : au cours de la grossesse les concentrations de CBG augmentent régulièrement d'un facteur 2-3. De façon similaire, certains patients atteints de syndromes inflammatoires et/ou infectieux chroniques tels qu'une hépatite chronique peuvent présenter une augmentation de CBG. Au contraire dans les syndromes néphrotiques, les cirrhoses et les hyperthyroïdies, les niveaux de CBG sont généralement diminués. Le rôle physiologique de l'axe HHS est d'amortir ces variations en maintenant des concentrations de cortisol libre relativement constantes.

2.3 Syndrome de Cushing

2.3.1 Présentation

Le syndrome de Cushing décrit l'ensemble des signes clinico-biologiques et des symptômes résultant d'un excès prolongé d'exposition aux glucocorticoïdes. La présence d'un adénome hypophysaire sécrétant de l'ACTH est appelée maladie de Cushing. D'un point de vue épidémiologique, l'incidence du syndrome de Cushing est estimée entre 0,7 et 2,4 cas/million/an pour une prévalence de 1/26 000 en Europe [\(12\)](#). Le syndrome de Cushing est par conséquent une maladie relativement rare. Les symptômes et les signes cliniques du syndrome de Cushing sont rencontrés fréquemment dans la population générale alors que les hypercorticismes avérés sont rares [\(13\)](#).

La présentation clinique du syndrome est dictée par les effets biologiques d'une sécrétion inappropriée de glucocorticoïdes : sur chaque cible l'excès hormonal est à l'origine d'une manifestation particulière ([Figure 3](#)). Par ailleurs, des symptômes de la maladie de Cushing peuvent être observés chez des patients présentant une fonction surrénalienne normale ([14](#)).

L'incidence des différentes manifestations cliniques au cours du syndrome de Cushing sont :

- Obésité **90%**
- Hypertension **85%**
- Hyperglycémie et intolérance au glucose (diabète secondaire) **80%**
- Dysfonctionnement gonadique **76%**
- Hirsutisme, Acné **72%**
- Vergetures et peau atrophiée **67%**
- Faiblesse musculaire **65%**
- Ostéoporose **55%**
- Ecchymoses faciles **55%**
- Désordres psychiatriques **50%**

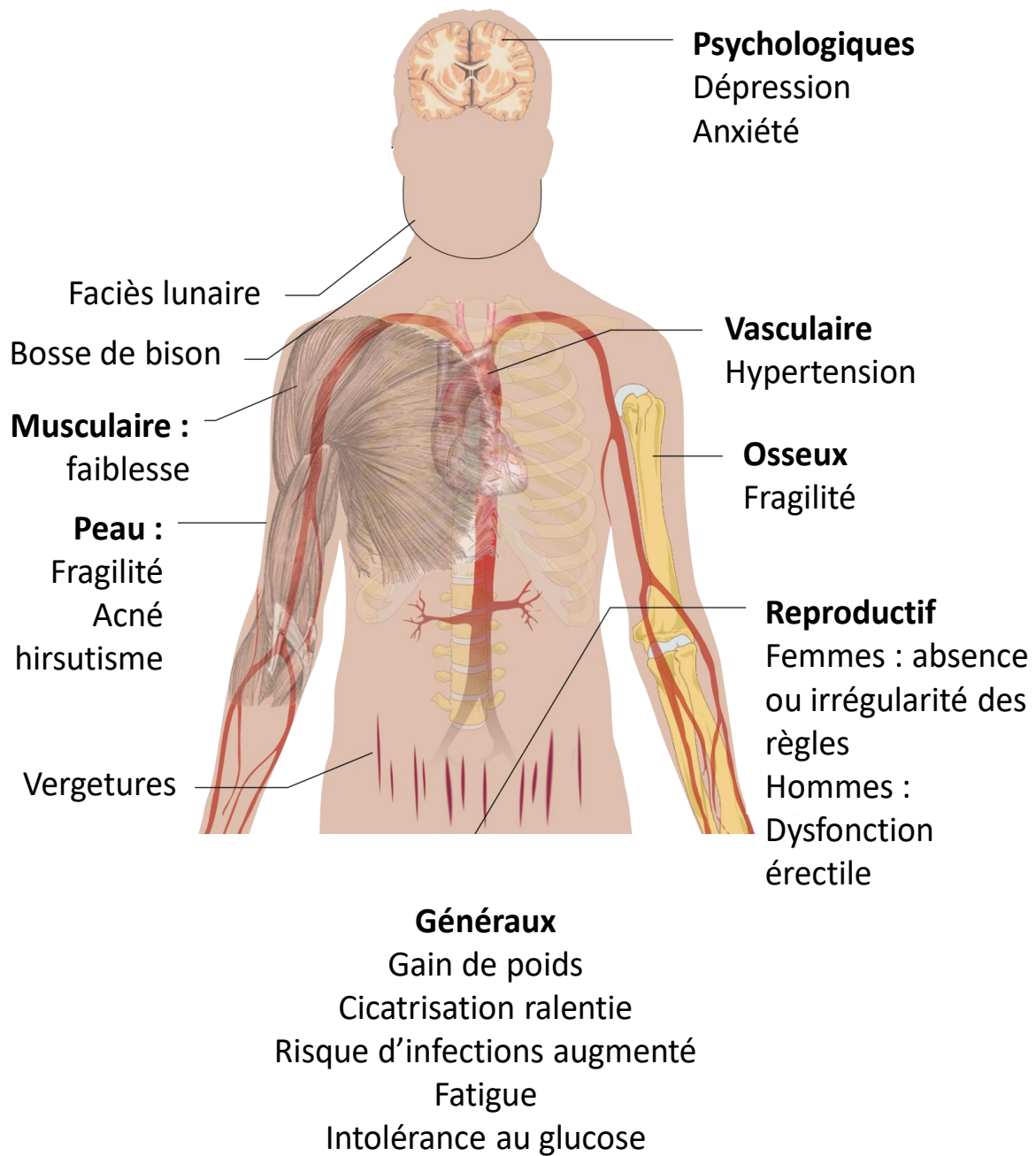


Figure 3 : Symptômes observés dans le syndrome de Cushing.

La classification des syndromes de Cushing s'effectue selon leur dépendance en une sécrétion d'ACTH. On distingue les syndromes de Cushing ACTH-dépendant, pour lesquels l'ACTH est à l'origine d'une production surrénalienne de cortisol augmentée, des syndromes de Cushing ACTH-indépendant, au cours desquels on observe une sécrétion autonome du cortisol par les corticosurrénales en l'absence de stimulation par l'ACTH. En terme de fréquence, les causes du syndrome de Cushing sont [\(5\)](#):

Cushing ACTH-dépendant :

- Maladie de Cushing **68%**
- Sécrétion ectopique d'ACTH (cancers bronchiques à petites cellules ou médullaire de la thyroïde, tumeur thymique, pancréatique et phéochromocytome) **15%**

Cushing ACTH-indépendant :

- Hyperplasie nodulaire des surrénales **9%**
- Adénome surrénalien **5%**
- Carcinome surrénalien **3%**
- Tumeur adrénocorticale **<1%**

Dans les sécrétions ectopiques d'ACTH la présentation clinique du patient est classiquement dominée par un tableau de cancer (amaigrissement, inflammation, douleur, altération de l'état général...). Dans ce cas, le patient ne présente généralement pas les symptômes cliniques du syndrome de Cushing comme l'obésité androïde, ceci du fait de la cinétique d'apparition généralement rapide et agressive dans le cas de la majorité des cancers à sécrétion ectopique d'ACTH.

Avec le développement et les progrès de l'imagerie médicale au cours des dernières décennies, notamment grâce au recours à l'imagerie par résonance magnétique (IRM), de nombreuses masses de localisation surrénalienne sont découvertes de manière fortuite. En l'absence de tableau clinique évocateur, ces masses nécessitent alors des explorations complémentaires (qu'elles soient cliniques, biologiques et/ou par imagerie médicale).

Au CHU de Rouen, en 2013 l'équipe de l'unité INSERM U982 a démontré l'existence d'une production intra-surrénalienne d'ACTH et une régulation paracrine de la sécrétion de cortisol

dans une série de 30 cas d'hyperplasie macronodulaire bilatérale des surrénales [\(15\)](#). En effet, les concentrations circulantes d'ACTH mesurées chez ces patients étaient supérieures dans la veine surrénale par rapport à celles observées dans la circulation périphérique. Ces résultats pourraient remettre en cause la classification traditionnelle des syndromes de Cushing dits ACTH-indépendant.

Certains cas de Cushing dits épisodiques ont également été décrits. Dans ces cas, l'hypercorticisme n'est pas constant dans le temps. A titre d'exemple, dans de rares cas de tumeurs surrénaliennes sécrétant du cortisol et exprimant des récepteurs à l'incrétine, l'hypercorticisme peut n'être observé qu'au cours des périodes postprandiales [\(16\)](#).

2.3.2 Diagnostic

La suspicion d'un syndrome de Cushing sur la base d'arguments cliniques chez un patient présentant des symptômes multiples ou progressifs doit entraîner une exploration approfondie. Malgré le fait que le tableau clinique d'un syndrome de Cushing soit typique lorsque qu'il est exprimé dans sa globalité, les formes cliniques sont généralement variées et le diagnostic peut être difficile pour les présentations incomplètes ou les formes atypiques de cette maladie [\(17\)](#).

Le diagnostic biologique initial du syndrome de Cushing présente une difficulté car aucun test disponible à ce jour ne possède de performances suffisantes, en termes de sensibilité et de spécificité diagnostiques, pour détecter un hypercorticisme à lui seul [\(18\)](#). L'absence de signes pathognomoniques comme dans certaines pathologies a conduit à l'élaboration de tests multiparamétriques et dynamiques plus spécifiques.

Les recommandations internationales actuelles définissent un panel de trois tests biologiques avec un niveau de preuve important dans l'établissement du diagnostic de syndrome de Cushing [\(18\)](#) :

- Cortisol libre urinaire élevé (recueil sur 24h), sur au moins 2 mesures indépendantes.
- Cortisol salivaire à minuit élevé, sur au moins 2 mesures indépendantes.
- Test de freination de la sécrétion du cortisol négatif après administration de dexaméthasone (1mg/ 24h).

La recommandation de prise en charge diagnostique appliquée face à une suspicion de syndrome de Cushing est détaillée sur la [Figure 4](#).

Par ailleurs, les réponses variables de l'axe corticotrope peuvent conduire à des résultats aléatoires de ces différentes explorations biologiques, sans modification pathologique évidente, et complique l'interprétation des tests [\(19\)](#).

La comparaison des concentrations d'ACTH dans le sang des sinus pétreux inférieurs par rapport à celles retrouvées dans la circulation périphérique permet d'objectiver de manière évidente la source d'une hypersécrétion d'ACTH [\(20,21\)](#). Un rapport de concentration (sinus : périphérique) < 1,4 atteste de la localisation hypophysaire d'un adénome sécrétant de l'ACTH.

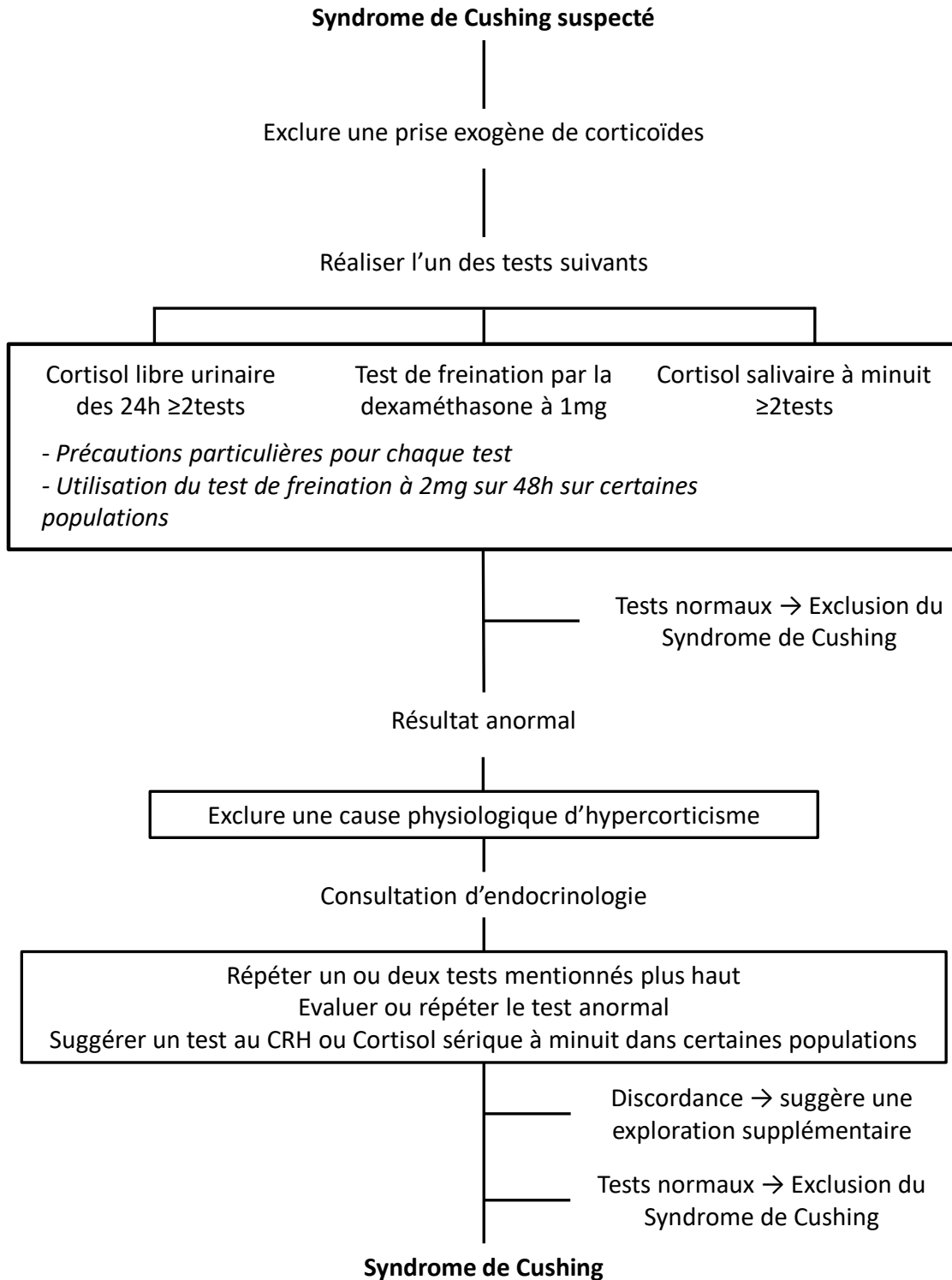


Figure 4 : Logigramme pour le diagnostic du syndrome de Cushing, adapté de Nieman (18).

Cependant, la localisation anatomique du prélèvement par cathétérisme des sinus pétreux inférieurs et les variations anatomiques entre les différents individus en font une méthode particulièrement invasive et délicate à pratiquer.

Le cortisol libre urinaire fournit un index de la fraction active du cortisol contrairement à la mesure du cortisol plasmatique qui correspond à la forme totale (fraction libre et liée aux protéines). Par conséquent le cortisol libre urinaire n'est pas affecté par les niveaux de CBG. De façon générale, il est admis qu'une concentration de cortisol libre urinaire <138 nmol/L exclut un syndrome de Cushing (hors syndrome cyclique). La spécificité du test est de 90% lorsque celui-ci est correctement réalisé [\(22\)](#).

La mesure du cortisol salivaire permet d'estimer la fraction libre du cortisol et n'est donc pas affectée par les niveaux de CBG. Le seuil décisionnel de ce paramètre est variable selon les études, la valeur seuil de 4 nmol/L est généralement utilisée [\(23–25\)](#). Les conditions de recueil doivent être optimales, en particulier absence de consommation de nourriture ou de boisson pendant les 30 minutes précédant le prélèvement. Les performances sont selon les études comprises entre 92 – 100% de sensibilité et 93 – 100% de spécificité [\(26\)](#).

Compte tenu de la valeur diagnostique insuffisante de chaque test lorsqu'ils sont considérés indépendamment, il est parfois nécessaire de les associer et/ou de les multiplier. Enfin si la suspicion est importante d'emblée il est recommandé de pratiquer plusieurs tests.

2.3.3 Traitement

Le traitement du syndrome de Cushing a pour but de diminuer la concentration de glucocorticoïdes circulants. Cela consiste dans la plupart des cas à traiter la cause sous-jacente, exérèse chirurgicale pour les adénomes hypophysaires, surrénalectomie ou chimiothérapie spécifique pour les sécrétions ectopiques d'ACTH. Dans certains cas, l'administration d'un médicament inhibant la synthèse du cortisol comme le kétoconazole ou le mitotane peuvent être utilisés de manière efficace.

2.3.4 Test de freination

Le test de freination de la sécrétion du cortisol a été développé dans les années 60 pour explorer la « freinabilité » de l'axe corticotrope [\(27,28\)](#). La dexaméthasone est un puissant glucocorticoïde de synthèse qui possède la capacité de « freiner », par rétrocontrôle négatif la sécrétion d'ACTH en se fixant sur le récepteur hypophysaire aux glucocorticoïdes (GR ou GCR, *Glucocorticoid Receptor*). Cette freination est absente chez les patients atteints de syndrome de Cushing dans sa forme typique.

Pour la réalisation de ce test, les patients reçoivent une dose de dexaméthasone de 1mg entre 23h et minuit. Un prélèvement sanguin est ensuite réalisé à 8 heures le matin suivant pour mesurer la concentration de cortisol au pic journalier, compte tenu du cycle nyctéméral. Chez le patient sain la concentration de cortisol sérique à 8h est alors généralement inférieure à 50 nmol/L. Ce seuil actuellement recommandé fournit des performances décisionnelles intéressantes avec une sensibilité de 95% et une spécificité de 80% [\(29\)](#).

Cependant, un échec de la freination du cortisol par la dexaméthasone peut être observé dans de nombreuses situations physio-pathologiques. Chez des patients souffrant de dépression, d'un stress important, de diabète, d'anorexie et/ou sous traitement œstrogénique. Des traitements inducteurs de cytochromes P450 (phénytoïne, rifampicine) et impliqués dans le métabolisme de la dexaméthasone sont également susceptibles de diminuer la biodisponibilité de la dexaméthasone et de conduire à l'échec du test de freination [\(30\)](#). Réciproquement, les patients recevant des traitements co-substrats de la dexaméthasone sont susceptibles d'augmenter leur exposition et donc son effet au cours du test (cimétidine, fluoxétine, diltiazem, inhibiteurs calciques, antirétroviraux, inhibiteurs de la pompe à protons etc.) [\(12\)](#). Enfin, les taux de faux positifs avoisinent les 50% pour les femmes sous contraception orale, en partie du fait d'une augmentation physiologique de CBG [\(31\)](#).

2.3.4.1 Dexaméthasone

Structure chimique des stéroïdes et de la dexaméthasone

Les stéroïdes partagent une structure commune de base dérivée du cholestérol : le noyau cyclopentano-perhydrophenanthrene. Il combine trois cycles à six carbones (phénanthrène), rattaché à un cyclopentane ([Figure 5A](#)), et résulte de la condensation de plusieurs unités de squalène à cinq carbones ([32](#)).

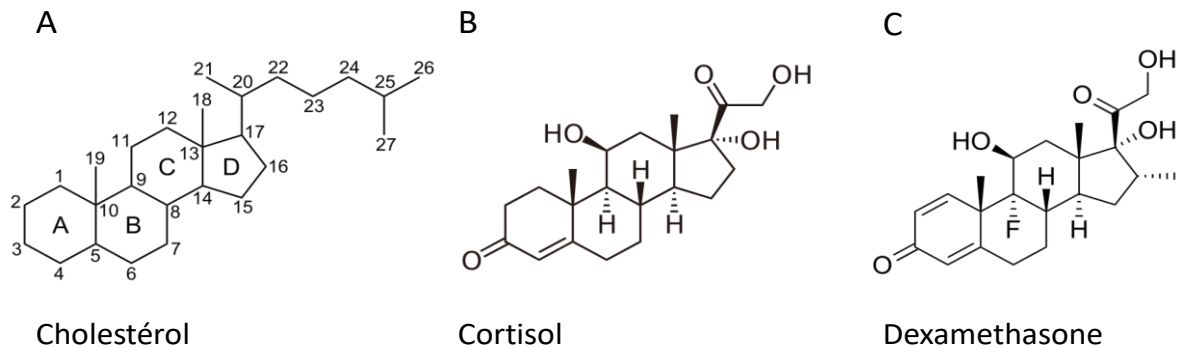


Figure 5 : Numérotation et structure chimique des dérivés stéroïdiens. (A) Numérotation et structure chimique du cholestérol. (B) Structure chimique du cortisol. (C) Structure chimique de la dexaméthasone.

La molécule servant de base à la synthèse des stéroïdes est le cholestérol, il est capté par la glande surrénale au moyen des récepteurs au LDL présents à la surface de la membrane des cellules. L'étape limitante de la synthèse du cortisol ([Figure 5B](#), [figure 6](#)) est le transport intracellulaire du cholestérol aux sites de stéroïdogénèse par la protéine *Steroid Acute Regulatory Protein* (StAR) qui est sous le contrôle de l'ACTH ([33](#)). Les cellules du cortex surrénalien assurent aussi la synthèse du cholestérol *de novo* à partir d'acétyl-CoA pour pallier aux éventuelles variations d'apport.

La numérotation des atomes de carbone se fait selon la [figure 5A](#). Les glucocorticoïdes sont dérivés du noyau pregnane et comportent généralement 21 atomes de carbone. Lorsque les groupements annexes sont liés à ce noyau, il existe deux orientations possibles : en avant du plan on qualifie la molécule de configuration en « β » et en arrière du plan en « α ».

L'ajout de groupements ou d'atomes sur le squelette permet de synthétiser des dérivés de synthèse avec l'activité souhaitée. Notamment, le fluor en position 9α de la dexaméthasone

augmente son pouvoir glucocorticoïde tout en préservant une activité minéralocorticoïde limitée ([Figure 5C](#)).

La connaissance des propriétés physico-chimiques de la dexaméthasone est indispensable au développement d'une méthode de dosage chromatographique. Sa masse molaire est de 392,5 g/mol, sa solubilité dans l'eau est de 0,05 mg/mL et son logP est de 1,93, ce qui en fait une molécule lipophile. Son pKa acide est de 12,42. La structure chimique contient deux insaturations avec des liaisons sur des orbitales π - π , conjuguées à une double liaison sur un atome d'oxygène. Cette particularité peut être exploitée pour une interaction avec la phase stationnaire de chromatographie.

Pharmacologie et pharmacocinétique

Après administration orale, la dexaméthasone est rapidement absorbée et le pic des concentrations plasmatiques est atteint 1 à 2 heures après la prise. Sa demi-vie d'élimination est de 6 heures avec une demi-vie biologique estimée entre 36 et 54 heures. L'élimination se fait principalement par voie rénale après formation de dérivés hydroxylés par métabolisme hépatique ([34](#)). La dexaméthasone est métabolisée principalement par le CYP3A4. Sa cible biologique est le récepteur GR ([35](#)).

L'absorption digestive de la dexaméthasone est susceptible d'être modifiée par différentes situations, les maladies inflammatoires chroniques de l'intestin, les antécédents de chirurgie bariatrique ou encore les infections du tube digestif.

Le foie est le site principal de métabolisme des stéroïdes. Les étapes biochimiques importantes sont la neutralisation de l'activité hormonale des composés, par addition d'un groupement hydroxyle, une déshydrogénation, une réduction (cortisol en dihydrocortisol) ou la conjugaison à un groupement hydrophile (acide glucuronique ou sulfate). La plupart des stéroïdes et métabolites sont excrétés dans les urines sous forme de sulfo- et glucurono-conjugués. Moins de 2% du cortisol est excrété sous forme libre au niveau urinaire.

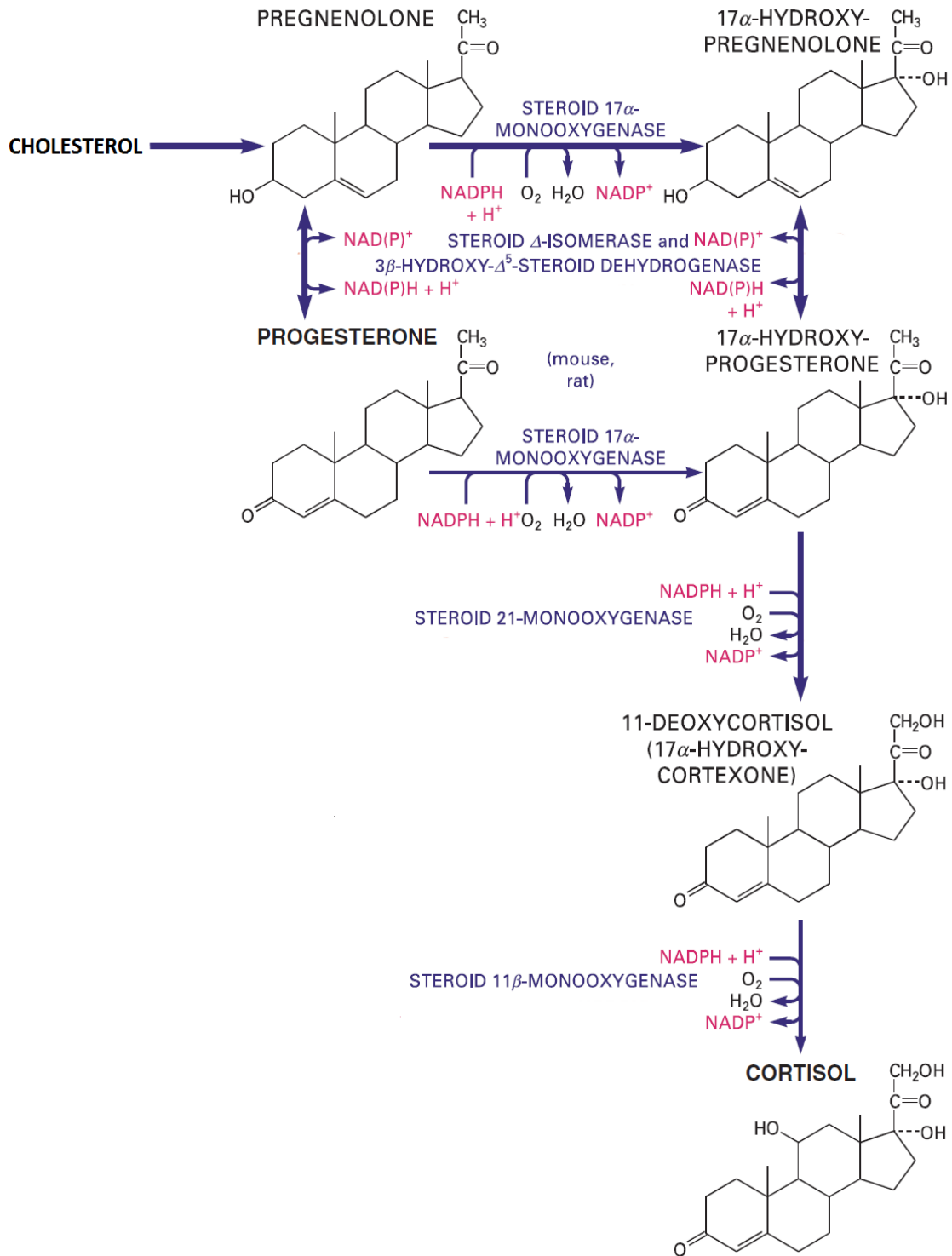


Figure 6 : Schéma de la voie de synthèse du cortisol, adapté de Michal et Schomburg [36].

Le cortisol est métabolisé en partie en cortisone par oxydation du groupement 11- β -hydroxy. La réduction de la double liaison C4-C5 forme du dihydrocortisol ou de la dihydrocortisone. La suite du métabolisme comprend une réduction de la fonction cétone en C3 pour donner du tetrahydrocortisol et de la tetrahydrocortisone, puis une transformation par la 20- α et 20- β déshydrogénase en cortol et cortolone ([Figure 7](#)) (5). La glucuronidation des métabolites aura plutôt lieu sur le 3- α OH tandis que la sulfoconjugaison est plus importante en 21-OH. De par sa liaison à la *Cortisol Binding Globulin* (CBG), le cortisol est métabolisé lentement (demi-vie de 100 min). Les métabolites du cortisol (95%) sont excrétés sous forme de glucurono- ou sulfo-conjugués, le glucuronide est prédominant.

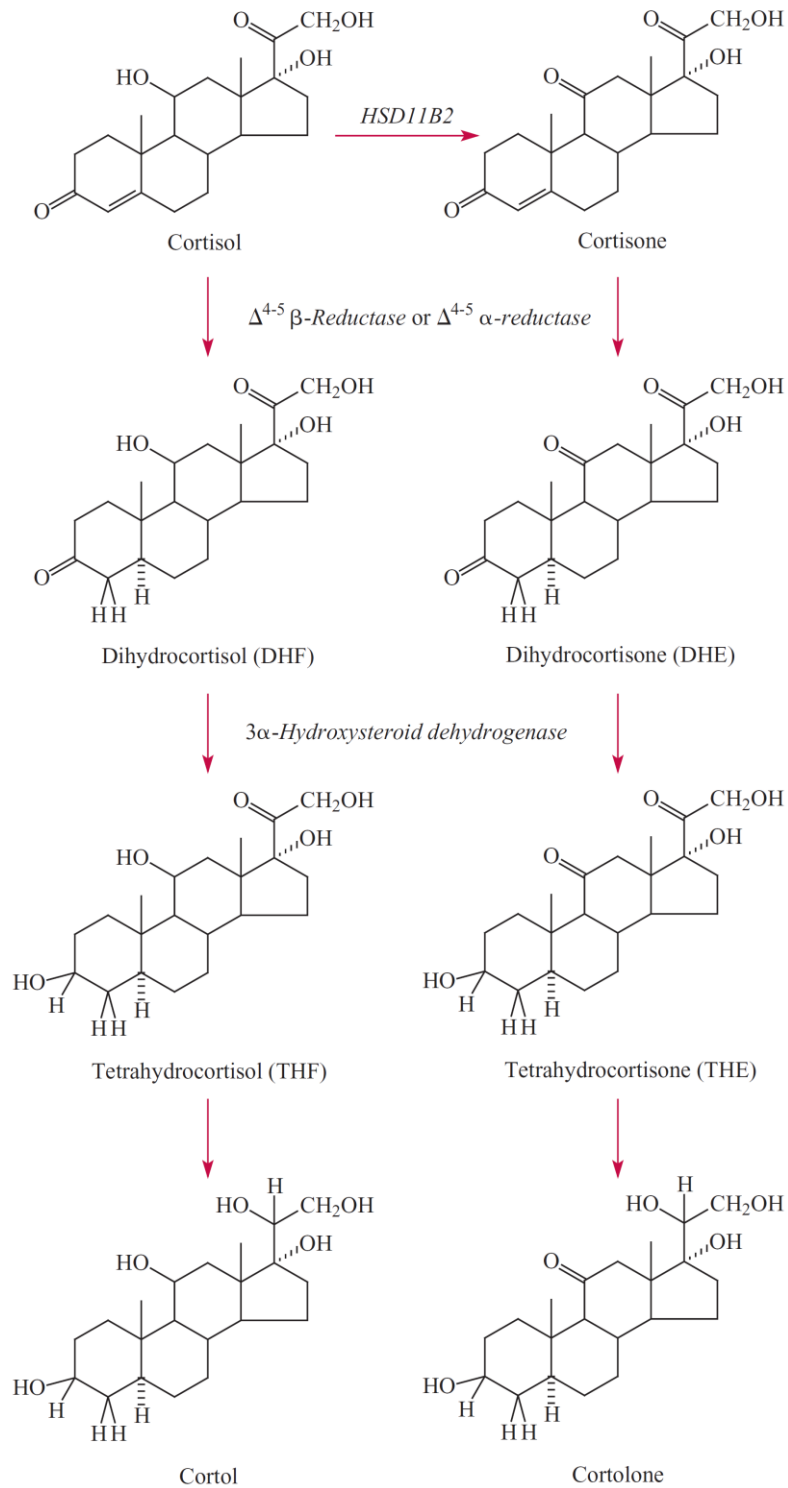


Figure 7 : Métabolisme du cortisol, d'après Burtis (5).

La compréhension du métabolisme du cortisol est importante dans l'interprétation des tests biologiques développés afin d'évaluer l'altération de sa production et de la fonction

surrénalienne. De plus, les 6- β -hydroxylases et les voies métaboliques de certains médicaments sont communes au cortisol et à certains stéroïdes ce qui peut en modifier la clairance et l'excrétion urinaire. Le métabolisme des glucocorticoïdes synthétiques comme la prednisolone ou la dexaméthasone est notablement augmenté par les médicaments inducteurs hépatiques. La connaissance des comédications du patient est donc particulièrement importante pour l'interprétation des tests et l'évaluation correcte de l'axe HHS (37). Les conditions affectant la clairance du cortisol sont résumées dans le [tableau 1](#).

Tableau 1 : Conditions affectant la clairance du cortisol.

Endocrinopathie	Clairance du Cortisol	Mécanisme
Hyperthyroïdie	Augmentée	Inhibition de la 11-beta HSD1 et stimulation de la 5-alpha reductase and 5-beta reductase
Hypothyroïdie	Diminuée	Inhibition de la 11-beta HSD1 et stimulation de la 5-alpha reductase and 5-beta reductase
Acromégalie	Augmentée	Inhibition de la 11-beta HSD1 hépatique
Syndrome de Cushing	Augmentée	Induction de la 6 beta-hydroxylase
Dysfonction d'organe		
Maladie hépatique chronique (y compris cirrhose alcoolique)	Diminuée	Baisse du métabolisme du cortisol
Maladie Rénale	Diminuée	Baisse de la conversion rénale : cortisol → cortisone
Médicaments/Toxiques		
Alcoolisme aigu	Diminuée	—
Rifampicine	Augmentée	Induction de la 6 beta-hydroxylase
Phénytoïne	Augmentée	Induction de la 6 beta-hydroxylase
Phénobarbital	Augmentée	Induction oxydases mixtes hépatiques
Autres		
Vieillessement	Diminuée	La baisse de la clairance est compensée par la baisse de sécrétion
Jeûne	Diminuée	Compensé par une baisse de la sécrétion
Anorexie nerveuse	Diminuée	—

Dosage

Dans diverses situations au cours desquelles l'exposition à la dexaméthasone pourrait être un problème pour la freination, certains laboratoires réalisent un dosage de la dexaméthasone plasmatique résiduelle parallèlement à la mesure du cortisol plasmatique, soit 9 heures après administration de la dexaméthasone. Cette mesure permet d'évaluer une éventuelle modification de la clairance ou de la biodisponibilité de la dexaméthasone et de compléter l'exploration en cas de suspicion de faux positif et de faux négatif [\(38,39\)](#). Les valeurs de référence proposées dans la littérature pour les concentrations résiduelles de dexaméthasone H+9 heures après la prise sont variables. En 1982 Meikle *et al.* recommandaient un seuil inférieur de 2,2 ng/mL, puis en 2012 Asvold *et al.* préconisaient 2,0 ng/mL et enfin en 2017 Ueland *et al.* concluaient à un seuil de 1,3 ng/mL pour expliquer une absence de freination efficace. On observe que les valeurs sont constamment en décroissance, et ce, associé à l'augmentation de spécificité des méthodes, RIA et chromatographie sur papier, RIA et extraction liquide et enfin HPLC-MS/MS, respectivement. La dexaméthasone a été sélectionnée initialement parce qu'elle possédait une forte activité glucocorticoïde et ne provoquait pas de réaction croisée significative avec les immuno-dosages du cortisol. Cette évolution chronologique des seuils met en évidence un manque de spécificité des méthodes RIA malgré une sensibilité satisfaisante (probable réactivité croisée de la mesure avec des métabolites de la dexaméthasone et/ou des composés endogènes).

Le dosage de certains stéroïdes et de leurs dérivés, de par leurs faibles concentrations circulantes (de l'ordre du ng voire du pg/mL), nécessitait jusqu'à récemment l'utilisation de techniques immunologiques comme la radio-immuno analyse (RIA) ou la chimiluminescence. Cependant, avec l'amélioration des techniques et des performances analytiques ces analyses sont désormais réalisables par techniques de chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse en tandem (HPLC-MS/MS ou LC-MS/MS). L'amélioration de la spécificité des dosages par cette méthode a conduit à une réévaluation des valeurs de références pour de nombreux paramètres [\(40\)](#). Meikle (1973) et Caro (1978) utilisaient la chromatographie sur papier suivi de la RIA pour doser la dexaméthasone mais le manque de spécificité entraîné par les réactions croisées a probablement influencé l'établissement des seuils de décision pour les valeurs de seuils décisionnels de la dexaméthasone plasmatique [\(41-43\)](#). En RIA, le degré de réactivité croisée avec

la 11-Desoxycorticostérone, la corticostérone, et la prednisone variant de 1 à 5% en fonction de la méthode utilisée [\(44\)](#). Sur des échantillons appariés la RIA a d'ailleurs présenté une spécificité inférieure à la LC-MS/MS (86 vs 94%,) [\(45\)](#).

Bien que la chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (GC/MS) ait longtemps été considérée comme étant la méthode de référence pour mesurer les composés organiques, la LC-MS/MS devient de plus en plus accessible et communément utilisée. Les techniques LC-MS/MS possèdent notamment l'avantage d'offrir une moindre préparation des échantillons, une excellente spécificité et une sensibilité suffisante. La LC-MS/MS est donc aujourd'hui considérée comme la méthode de choix pour l'établissement de profils stéroïdiens [\(46\)](#).

Par ailleurs, en LC-MS/MS, il existe une difficulté à transposer les méthodes établies dans d'autres laboratoires. De nombreux paramètres vont être modifiés localement, l'appareillage, que ce soit la pompe ou le détecteur, mais encore la ligne fluidique, le type et le fournisseur de la colonne chromatographique. Ce sont autant de paramètres fournissant des facteurs de variabilité. C'est pourquoi les instances du comité français d'accréditation (COFRAC) exigent le plus souvent une validation de méthode sur site (« portée B »), afin d'en justifier les performances.

L'absorption variable et le métabolisme de la dexaméthasone peuvent influencer le résultat des tests de freination. Les médicaments inducteurs ou inhibiteurs du CYP3A4, une consommation alcoolique peuvent modifier la clairance et/ou biodisponibilité de la dexaméthasone et ainsi modifier les concentrations retrouvées au niveau plasmatique [\(47\)](#).

3. Travaux personnels

3.1 Objectifs de l'étude

Les objectifs de ce travail étaient :

- (1) De développer et de valider conformément aux exigences internationales une méthode de dosage de la dexaméthasone plasmatique par HPLC-MS/MS.
- (2) De déterminer les valeurs usuelles des concentrations plasmatiques de dexaméthasone résiduelle (à 8H) au cours des tests de freination de l'axe corticotrope par 1mg de dexaméthasone.
- (3) D'étudier la corrélation existant entre le résultat du test de freination et les autres tests diagnostiques du syndrome de Cushing.
- (4) D'évaluer les intérêts et limites de ce dosage.

3.2 Matériel et méthodes

3.2.1 Population étudiée

Des données démographiques, cliniques et biologiques ont été collectées de manière rétrospective sur 320 patients ayant bénéficié d'un test de freination dans le service d'endocrinologie du CHU de Rouen entre septembre 2014 et septembre 2016. Pour l'ensemble des patients étudiés, la dose de 1mg de dexaméthasone (Dectancyl®) a été administrée à 23h et un prélèvement veineux a été effectué à 8h le lendemain matin pour réalisation d'un dosage de dexaméthasone. Les covariables étudiées incluaient le sexe, l'âge et l'indice de masse corporelle, le résultat du dosage de cortisol libre urinaire sur un recueil de 24h, et les dosages d'ACTH sur cycle de 24h avec une valeur toutes les 4h (minuit, 4h, 8h, 12h, 16h, 20h).

3.3. Dosages

3.3.1. Prélèvement et phase pré-analytique

Le sang a été prélevé sur tube hépariné BD™ Vacutainer® LH (dexaméthasone), BD™ Vacutainer® sec avec activateur de coagulation (cortisol), Salivette® (cortisol, Sarstedt, Allemagne) et tube BD™ Vacutainer® EDTA (ACTH) puis transporté dans les délais préconisés par les laboratoires de Pharmacologie et de Biochimie du CHU de Rouen. Le plasma était ensuite centrifugé à 1700 g pendant 10 minutes à température ambiante. Le cortisol libre urinaire était analysé après collection des urines de 24h aliquotées sur tube neutre après mesure du volume des 24h.

3.3.2. Dosage du cortisol

Le cortisol salivaire et sérique a été dosé sur un automate Roche Cobas® 8000 module e602 (Roche Diagnostics, Meylan, France) au moyen du kit Roche Elecsys™ Cortisol II. Le principe du dosage utilise une méthode par compétition avec détection par électrochimiluminescence indirecte (ECLIA). L'intervalle de mesure de la méthode est de 1,5 – 1 750 nmol/L [\(48\)](#). Le cortisol libre urinaire des patients admis de septembre 2014 à septembre 2015 ont été dosés sur plateforme Roche Cobas® 8000 module e602 de manière au identique au cortisol sérique, pour les patients admis de octobre 2015 à septembre 2016 le dosage a été effectué sur automate Liaison XL.

3.3.3. Dosage de l'ACTH

L'ACTH a été dosé sur automate Roche Cobas® 8000 module e602 (Roche Diagnostics, Meylan, France) au moyen du kit Roche Elecsys™ ACTH. Le principe du dosage consiste en une méthode en « sandwich » avec détection par ECLIA. L'intervalle de mesure de la méthode était 1,00-2000 pg/mL [\(49\)](#).

3.3.4. Méthode de dosage de la dexaméthasone

Les concentrations de dexaméthasone ont été déterminées en utilisant une méthode HPLC-MS/MS, avec extraction en ligne des analytes (2D-LC-MS/MS), développée au sein du laboratoire Pharmacologie-Toxicologie et Pharmacogénétique du CHU de Rouen. Le système LC-MS/MS comprend une pompe quaternaire et une pompe binaire (LC-20AD/AB, Shimadzu®, Marnes La Vallée, France), un passeur d'échantillon automatique (SIL-20AC, Shimadzu®, Marnes La Vallée, France®), un four à colonne (Shimadzu® CTO-20AC®, Marnes La Vallée, France) et un spectromètre de masse 4500 QTRAP (Sciex®, Les Ulis, France) équipé avec une source Turbo Ion Spray®.

Les étapes de la préparation d'échantillon ont compris la précipitation des protéines plasmatiques en mixant 100 µL de plasma avec 200 µL de méthanol contenant un analogue marqué au deutérium de la dexaméthasone comme standard interne (dexaméthasone-D4 2,5 ng/ml dans le méthanol, Alsachim, Illkirch, France, [figure 8](#)). Cinquante microlitres du surnageant déprotéinisé ont été directement injectés dans le système chromatographique. L'ensemble des étalons et contrôles ont été obtenus par surcharge d'échantillons de sérum humain, vérifiés vierges en médicament et provenant de l'établissement français du sang avec un standard de dexaméthasone (Cerilliant, Round Rock, TX USA).

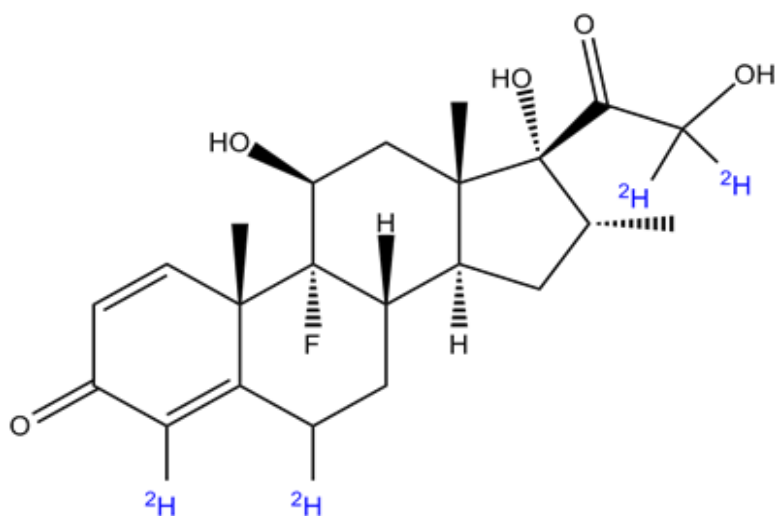


Figure 8 : Structure chimique de la dexaméthasone-D4.

Conditions chromatographiques

La purification de l'échantillon a été effectuée en ligne sur le système chromatographique en utilisant une cartouche Oasis HLB 25 μ m (Waters®, Saint-Quentin-en-Yvelines, France) avec une phase de chargement composée de 2 mmol/L de formate d'ammonium (Sigma Aldrich, St. Quentin Fallavier) dans H₂O (Carlo Erba, Val de Reuil, France). La séparation chromatographique a été réalisée sur une colonne Raptor Biphenyl 2,7 μ m 50x3 mm (Restek®, Lisses, France) à 40°C et la phase mobile était constituée de **(A)** Méthanol/Tampon formate d'ammonium 0,2% (Carlo Erba, Val de Reuil, France) + **(B)** H₂O/Acide formique 0,2% (Merck Millipore, Billerica, USA) à un débit de 0,7 mL/min ([Figure 9](#)).

Le gradient de phase mobile analytique était constitué d'une première phase de 0 à 1min de 20% de A, puis un gradient de 20 à 60% jusqu'à 1min, 60 à 100% de 1min à 1min20, 100% de 1min20 à 2min20, 100 à 20% de 2,2min et 2,3 et enfin 100% de 2,3min à 4min.

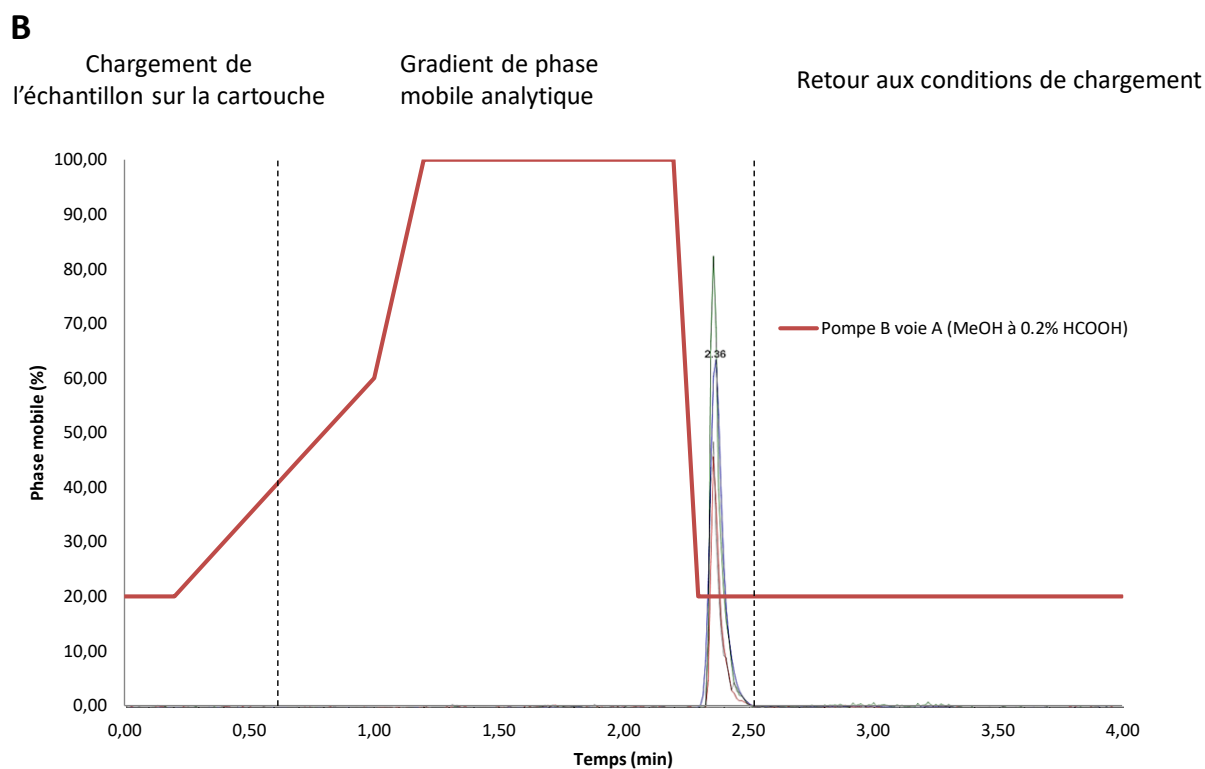
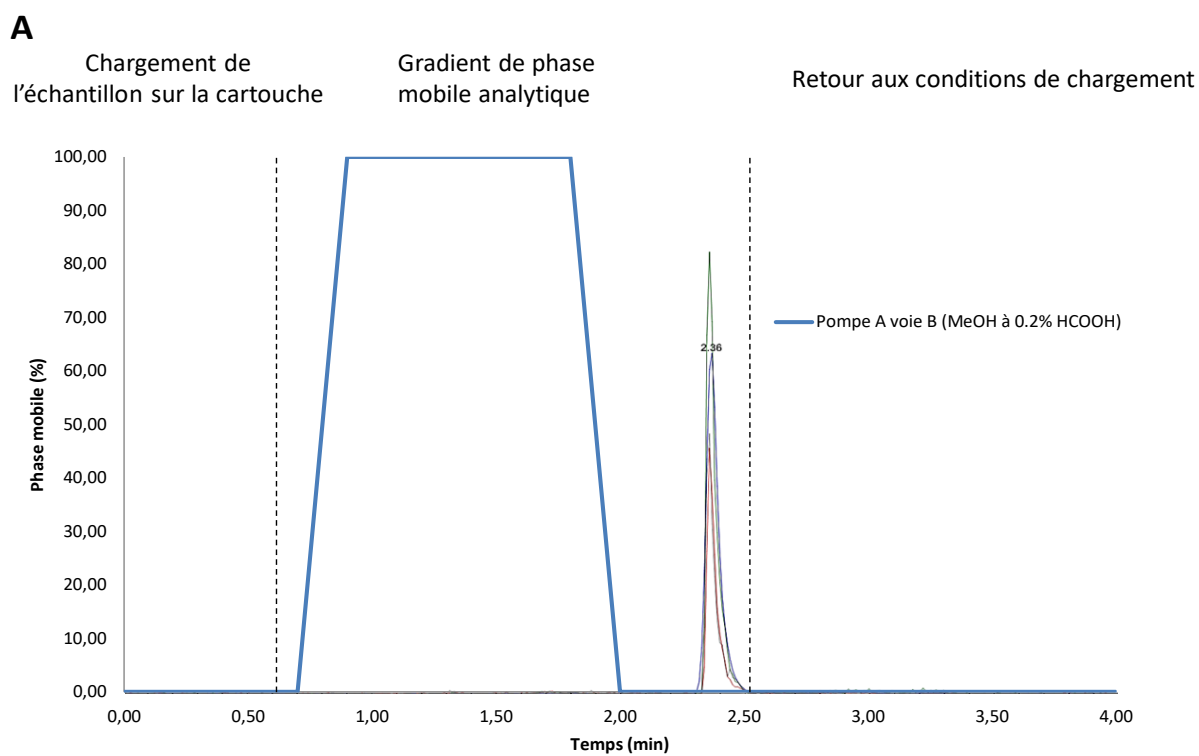


Figure 9 : Schéma des gradients chromatographiques retenus pour la méthode de dosage de la dexaméthasone développée au laboratoire. (A) Ligne de chargement de l'échantillon. (B) Ligne analytique. La commutation de vanne a lieu à 0,6min et 2,5min.

Paramètres MS/MS

Après l'optimisation des paramètres MS/MS du système, la détection et la quantification de la dexaméthasone ont été réalisées en mode *Multiple Reaction Monitoring (MRM)* en utilisant la dexaméthasone et la dexaméthasone-D4 protonées $[M+H]^+$ comme ions (m/z 393,2 et 397,2, respectivement). Les transitions mesurées étaient m/z 393,2 \rightarrow 373,1, m/z 393,2 \rightarrow 355,1 et m/z 397,2 \rightarrow 359,0 pour la quantification, la confirmation et le standard interne respectivement.

La méthode de dosage a été validée selon les recommandations internationales de la *Food and Drug Administration (FDA)* et de l'*European Medical Agency (EMA)*. Elle a satisfait tous les critères de qualité, incluant la sélectivité, la précision intra et inter essai, la linéarité, les limites basses et hautes de quantification, l'effet matrice et la stabilité (50,51). De plus, ces recommandations permettent à la méthode de valider les critères d'accréditation en portée B de la norme ISO 15189 et du GTA-04 (Tableau 2) (52,53).

Tableau 2 : Paramètres à valider pour une méthode quantitative selon le SH-GTA-04.

Paramètres à vérifier et/ou à connaître	Méthode Quantitative	
	Bibliographie	Validation Portée de type B
Spécificité analytique	oui	oui
Sensibilité diagnostique	oui	oui
Fidélité	oui	oui
Justesse	oui	oui
Intervalle de mesure	oui	oui
Incertitudes	oui	oui
Contamination inter-échantillons	oui	oui
Stabilité des réactifs	oui	oui
Robustesse	non	si besoin
Interférences	oui	oui
Intervalle de référence	oui	oui
Comparaison avec une méthode déjà utilisée au laboratoire	oui	oui
Analyse des discordances	oui	oui

L'analyse en spectrométrie de masse triple quadripôles comprend un certain nombre de composants et de paramètres physico-chimiques à optimiser pour chaque analyte. Outre les

transitions MRM, différents potentiels sont appliqués afin de guider les ions moléculaires lors de leur sélection par les quadripôles, le *Declustering Potential* (DP), l'*Entry Potential* (EP), le *Cell Entry* (CE) *Potential* et le *CellExitPotential* (CXP). Enfin le *dwell time*, est le temps alloué par cycle au suivi de chaque couple de transition, il peut s'apparenter à un temps d'exposition en photographie. Le choix d'un *dwell time* élevé augmente le signal mais au détriment du nombre de mesures par unité de temps. Il est nécessaire de mesurer au moins 20 points d'un pic chromatographique pour avoir une quantification fiable.

Les transitions MRM ainsi que les paramètres retenus pour la méthode de dosage de la dexaméthasone sont résumés dans le [tableau 3](#) :

Tableau 3 : Paramètres MS/MS des transitions suivies pour la méthode de dosage de la dexaméthasone.

Ion Précurseur (m/z)	Ion Fragment (m/z)	Dwell Time (ms)	Nom	DP	EP	CE	CXP
397,2	359,0	300	Dexaméthasone-D4	55	10	13	28
393,2	373,1	300	Dexaméthasone-1 [†]	55	10	13	26
393,2	355,1	300	Dexaméthasone-2 [‡]	55	10	19	16

†Transition de quantification

‡Transition de confirmation

3.3.5. Analyse statistique

Les analyses statistiques ont été effectuées au moyen des logiciels R et Graphpad Prism V7 ([54,55](#)). La corrélation entre les concentrations de cortisol et de dexaméthasone a été explorée au moyen de la fonction « lm » (*linear mixed effect model*) sur le logiciel R et du coefficient de corrélation de Pearson. La normalité de la répartition des concentrations a été vérifiée en utilisant le test de Shapiro-Wilk et les outliers ont été retirés par la méthode des distances de *Cook*. Les courbes *Receiver Operating Characteristic* (ROC) ont été générées avec le package R « *pROC* » ([56](#)). Un risque $\alpha < 5\%$ était considéré comme statistiquement significatif.

3.3.6. Intervalle ou valeurs de référence

La détermination des intervalles de référence pour une valeur biologique se fait par l'analyse d'un nombre suffisant de valeurs. Les recommandations éditées par le *Clinical and Laboratory Standard Institute* (CLSI) dans le guide C28-A2/3 préconisent l'utilisation de 120 valeurs pour chaque paramètre [\(57\)](#). Pour une analyse paramétrique ces données doivent être normalement distribuées, de manière native ou après transformation mathématique. Suivant le type de variable biologique et l'utilisation clinique (marqueur d'urgence, dépistage, test dynamique etc.) l'intervalle sera déterminé de manière uni ou bilatérale avec une valeur de percentile différente. Ici, dans le cadre du suivi thérapeutique pharmacologique, il apparaît que l'utilisation d'un intervalle de confiance bilatéral à 95% s'avère-le plus cohérent.

4. Résultats

4.1. Validation analytique de la méthode de dosage HPLC-MS/MS de la dexaméthasone plasmatique

Spécificité

Aucune interférence significative au temps de rétention attendu n'a été retrouvée sur les six sérums étudiés, de même que pour l'analogue deutéré dexaméthasone-D4. Par conséquent, cette méthode de dosage est spécifique. De plus, pour les sept points de la gamme d'étalonnage, les ratios d'intensité MRM obtenus (surface de la transition de confirmation sur la surface de la transition de quantification, [figure 10](#)) sont reproductibles (CV < 15% sur l'ensemble de la gamme, [tableau 4](#))

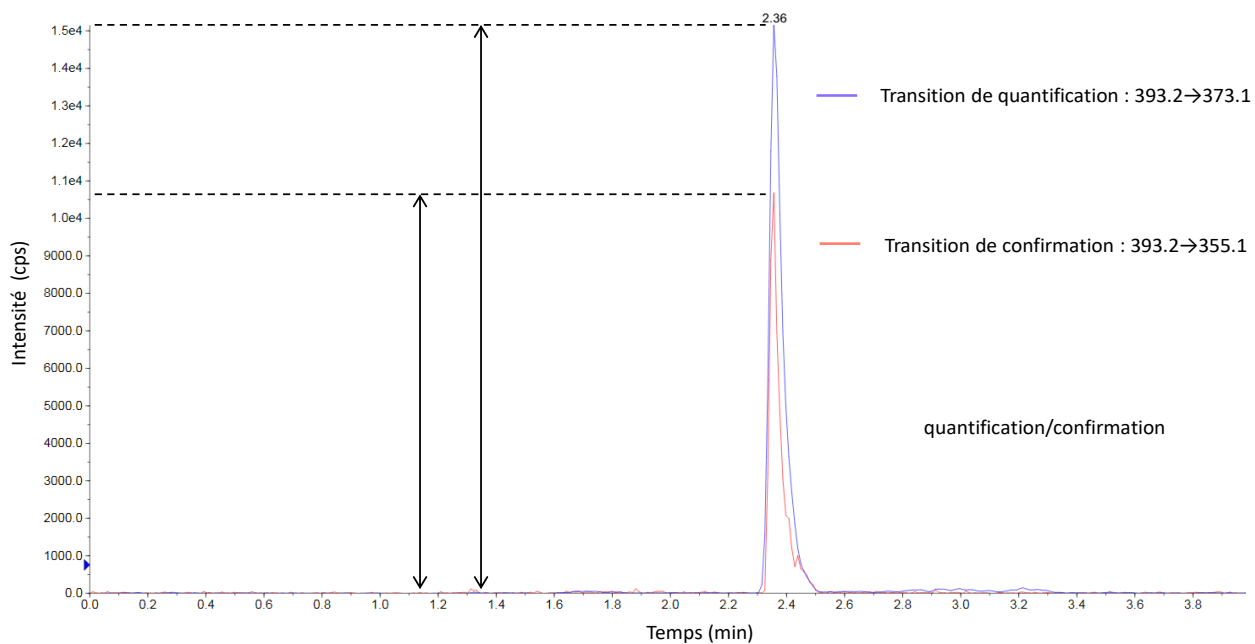


Figure 10 : Rapport des signaux des transitions de quantification et de confirmation en MRM.

Tableau 4 : Ratio MRM des différents calibrants.

	Cal 1	Cal 2	Cal 3	Cal 4	Cal 5	Cal 6	Cal 7	Moyenne (ng/mL)	CV (%)
Ratios surfaces MRM (dexaméthasone-1/dexaméthasone-2)	1,90	1,79	1,90	1,72	1,92	1,90	1,75	1,84	4,57

Linéarité de la méthode

L'étude de la fonction réponse nous a permis d'établir que la meilleure courbe de calibration est obtenue pour une régression en 1/x ([Figure 11](#)). Celle-ci présente l'intérêt d'être en meilleure adéquation avec la courbe de détection du capteur électronique et de mieux pondérer les faibles concentrations de calibrants obtenus par dilutions en cascade des solutions standardisées ([58](#)).

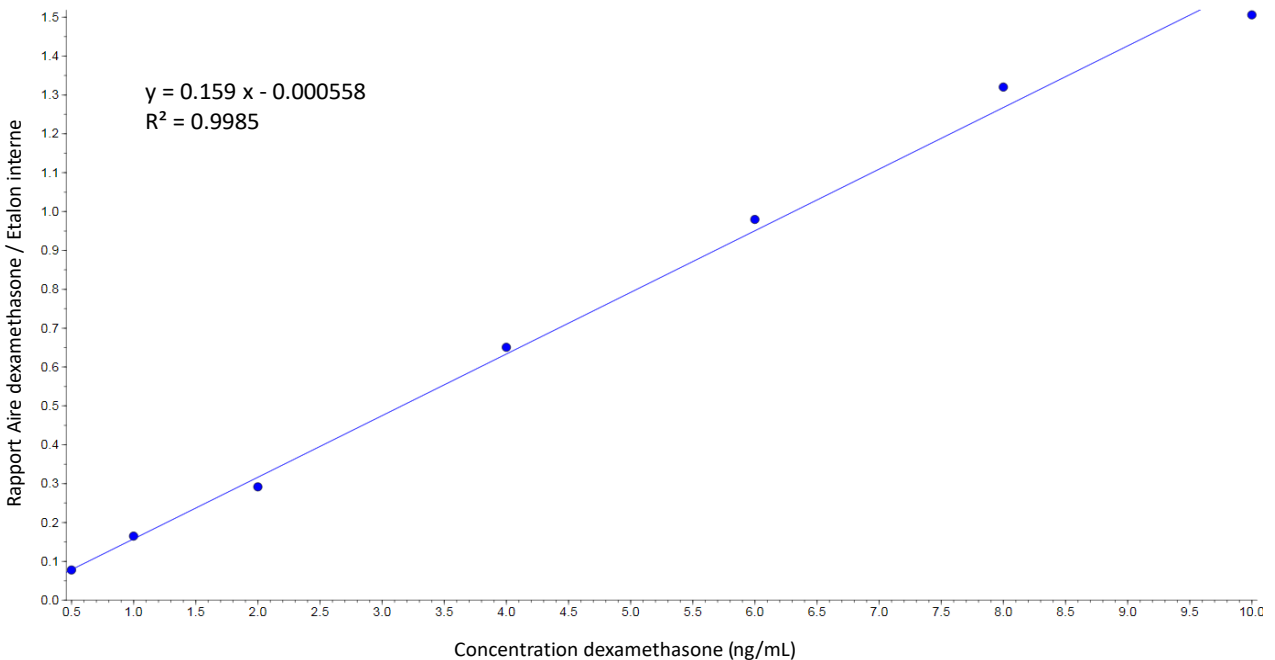


Figure 11 : Courbe de calibration de la méthode 0,5-10ng/mL, 7 points + blanc.

Limite de quantification

La validation de la limite de quantification d'une méthode chromatographique nécessite un $CV < 20\%$ à la concentration la plus faible de la gamme d'étalonnage ainsi qu'un rapport signal sur

bruit (SNR) > 10 ([figure 12](#)). Sur six échantillons différents à 0,5 ng/mL le CV est inférieur à 20% ([tableau 5](#)).

Tableau 5 : Evaluation de la limite de quantification de la méthode de dosage de la dexaméthasone.

	Limite de quantification
Moyenne (ng/mL)	0,52
Recouvrement (%)	104,0
CV (%)	8,17

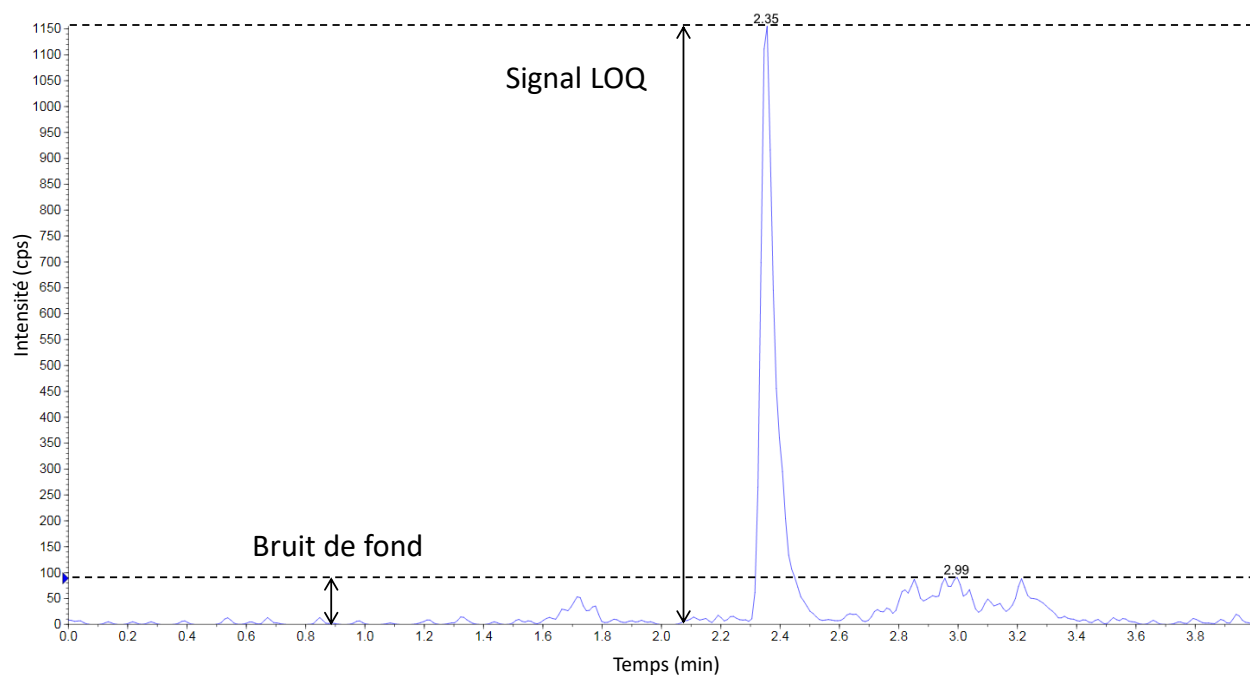


Figure 12 : Rapport du signal sur bruit à la limite de quantification (LOQ).

La limite de quantification de la méthode a été établie à 0,5 ng/mL.

Répétabilité

La répétabilité définit la justesse d'une méthode, le CV doit être inférieur à 15% pour des échantillons de concentrations identiques dosés dans les mêmes conditions, opérateur, jour, calibrants etc. Les résultats de l'évaluation de la répétabilité de la méthode de dosage de la dexaméthasone sont synthétisés dans le [tableau 6](#).

Tableau 6 : Evaluation de la répétabilité de la méthode de dosage de la dexaméthasone.

	CIQ Bas	CIQ Moyen	CIQ Haut
Moyenne (ng/mL)	1,33	4,32	7,98
CV (%)	5,75	3,52	5,35

Fidélité intermédiaire

La fidélité intermédiaire définit la justesse entre différentes séries, jours différents, opérateurs différents, calibrants etc. Le CV doit être inférieur à 15% pour des échantillons de concentrations identiques. Les résultats de l'évaluation de la fidélité intermédiaire de la méthode de dosage de la dexaméthasone sont synthétisés dans le [tableau 7](#).

Tableau 7 : Evaluation de la fidélité intermédiaire de la méthode de dosage de la dexaméthasone.

	CIQ Bas	CIQ Moyen	CIQ H
Moyenne (ng/mL)	1,40	4,52	8,16
CV (%)	4,03	4,94	3,35

Effet mémoire

Lors du passage d'échantillons avec de fortes concentrations, l'analyte est susceptible de rester en partie de manière rémanente dans le système chromatographique, c'est ce que l'on appelle l'effet mémoire. Ceci peut poser un problème lorsque des échantillons de concentrations très variables se succèdent dans la file d'analyse. Pour évaluer cet effet on réalise plusieurs dosages d'un contrôle à concentration élevée suivi d'un contrôle à concentration basse en série de 3. Un test de Student apparié entre la série des échantillons bas suivant immédiatement les contrôles élevés permet de vérifier l'absence d'effet mémoire. Ici $t = 1,206$, $p > 0,05$, $dl = 4$. Il n'existe donc pas de contamination inter échantillons.

Effet matrice

La matrice biologique influence le signal obtenu dans les dosages par HPLC-MS/MS, il s'agit de vérifier qu'il est acceptable entre les différentes matrices. Le dosage de six matrices différentes fournit un CV<15% ce qui montre que l'effet matrice est acceptable sur la méthode analytique ([Tableau 8](#)).

Tableau 8 : Evaluation de l'effet matrice sur la méthode de dosage de la dexaméthasone.

	Sérum 1	Sérum 2	Sérum 3	Sérum 4	Sérum 5	Sérum 6	Moyenne	CV
Concentration (ng/mL)	0,58	0,56	0,48	0,5	0,48	0,54	0,52	8,17

Interférences

L'analyse de spécificité de la méthode a montré l'absence de pics interférents aux transitions suivies, cependant d'autres composés exogènes sont susceptibles de produire un signal aux transitions MRM de la dexaméthasone. La molécule ayant la plus grande probabilité de venir interférer est la bétaméthasone, qui est un isomère de la dexaméthasone qui diffère uniquement par l'orientation en bêta de la liaison du groupement méthyle lié au carbone n°16 du noyau stéroïde ([Figure 13](#)).

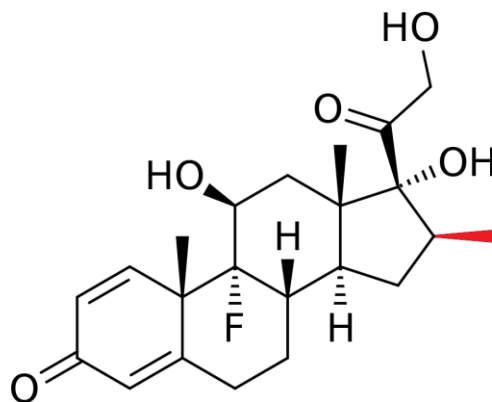


Figure 13 : Structure chimique de la bétaméthasone, groupement méthyle C16 en bêta (rouge).

Incertitudes

Le dosage de la dexaméthasone demeure une analyse effectuée par peu de laboratoires. Il existe pour le moment une absence de contrôle de qualité externalisé ce qui rend impossible le calcul d'une incertitude de mesure par la méthode CIQ/EEQ [\(59\)](#). Cependant suite au développement de cette méthode un rapprochement en vue d'une comparaison de résultats avec d'autres laboratoires est envisagé. L'incertitude sera ici calculée sur le résultat d'analyse obtenu en prenant la racine carrée de la somme quadratique de toutes les composantes de l'incertitude selon la formule suivante :

$$u(C) = \sqrt{u_{justesse}^2 + u_{modelisation}^2 + u_{etalon}^2 + \sigma_{fidelite\ intermediaire}^2}$$

Stabilité à 8°C pendant 72H

La dexaméthasone est stable à 8°C dans le passeur d'échantillon automatique pendant 72H, les recouvrements et CV sont acceptables (<15%, données non présentées) et permettent en cas de problème matériel de conserver les échantillons dans l'injecteur afin de les doser lors des jours ouvrables du laboratoire.

Stabilité après trois cycles de congélation et décongélation

Après trois cycles de congélation / décongélation à -20°C, les moyennes des recouvrements et les coefficients de variation obtenus pour les CIQ Bas et Haut sont compris dans les limites fixées par les guides de validation ([Tableau 9](#)). Ceci possède un intérêt dans le cadre d'un contrôle de résultat analytique ou lors d'études cliniques pour lesquelles les échantillons peuvent parvenir au laboratoire congelés, des résultats supplémentaires peuvent aussi être exigés afin de permettre une publication scientifique et la maîtrise de la stabilité lors du retour aux échantillons initiaux est importante.

Tableau 9 : Evaluation de l'effet de trois cycles de congélation/décongélation sur la méthode de dosage de la dexaméthasone.

	Moyenne (n=3)	Recouvrement (%)
CIQ Bas	1,26	90,2
CIQ Haut	7,85	96,2

4.2. Application sur une série de patients

4.2.1 Caractéristiques de la population

Les principales caractéristiques démographiques et cliniques de la population étudiée sont résumées dans le [Tableau 10](#).

Tableau 10 : Caractéristiques démographiques et cliniques de la population étudiée (moyenne \pm écart type si non spécifié).

Caractéristique	Valeur
Femme/Homme (n (%))	189/129 (59/41)
Age (années)	57 (16)
IMC	29,6 (7,0)
Tests de freination (négatifs/positifs)	199/119
Maladies de Cushing	19

Les causes de réalisation des tests de freination se répartissent comme suit :

- (1) Exploration d'un incidentalome surrénalien
- (2) Bilan hypophysaire
- (3) Hypercorticisme clinique
- (4) Suivi post opératoire d'une maladie de Cushing opérée
- (5) Autres

La population étudiée a été scindée en deux groupes de patients, suivant le résultat du test de freination : cortisol à 8h inférieur à 50 nmol/L (Groupe Freinés) ou supérieur à 50 nmol/L (Groupe Non Freinés). L'organigramme de l'étude est détaillé sur la [figure 14](#).

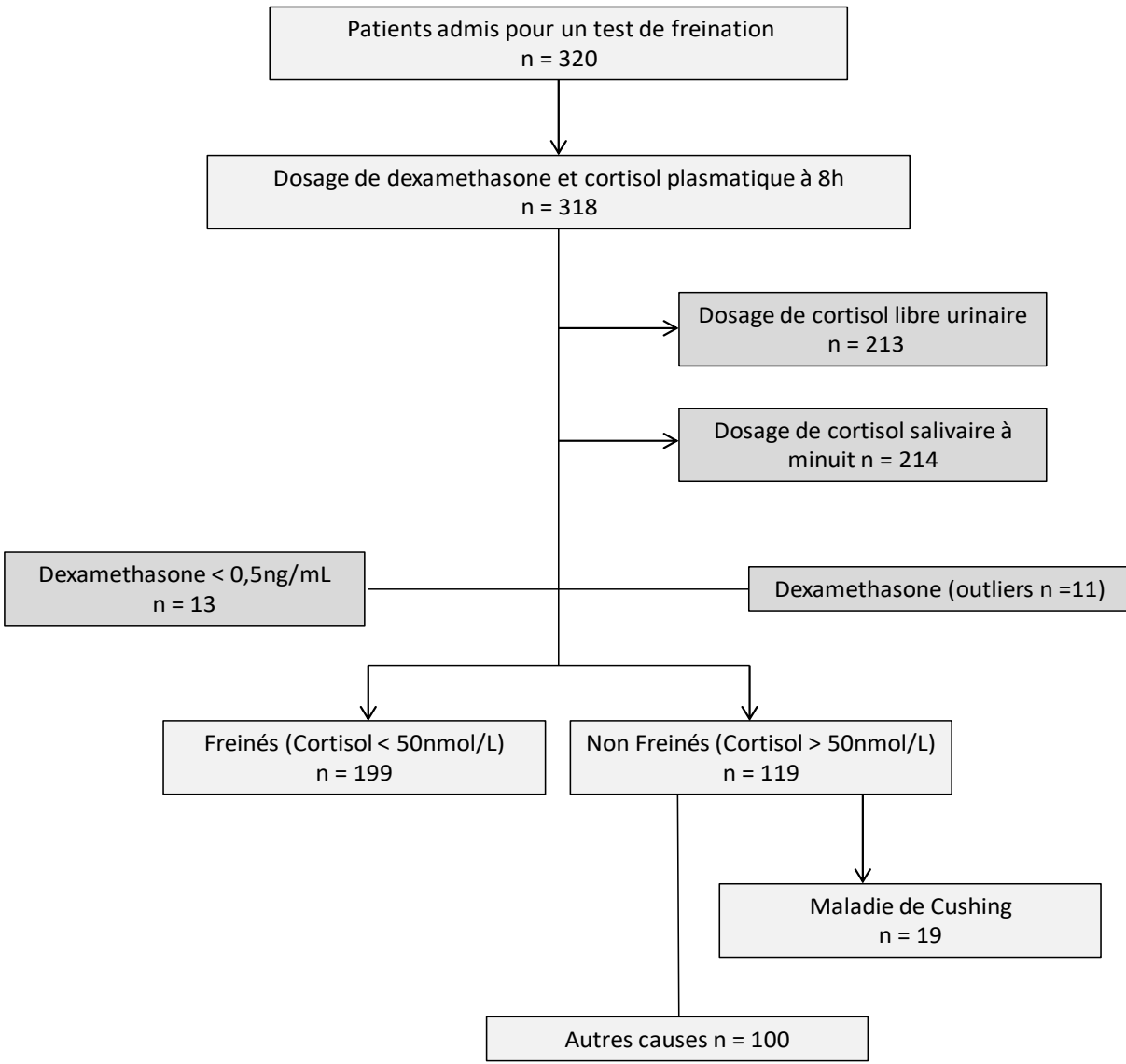


Figure 14 : Organigramme de l'étude.

4.2.2. Cortisol post test de freination dans les groupes de patients avec ou sans freination efficace

Le cortisol sérique à 8h J+1 de la prise de 1mg de dexaméthasone permet d'évaluer la capacité de rétrocontrôle de l'axe corticotrope. Les moyennes des concentrations sériques en cortisol dans les groupes des patients freinés et non freinés étaient 27,4 nmol/L ($\pm 10,3$) et 145,9 nmol/L ($\pm 152,8$) respectivement. Sur les 318 patients étudiés, 199 ont présenté un test de freination positif (cortisol < 50nmol/L) et 119 un test négatif (cortisol > 50nmol/L) ([Figure 15](#)). Cette proportion de 40,6% de tests négatifs comparée au nombre de patients atteints de maladie de Cushing (19/318 ; 6%) est éloignée de la spécificité attendue pour ce test mais la population représente un biais de recrutement certain. Ces résultats indiquent clairement que d'autres critères de jugement sont nécessaires pour poser un diagnostic de syndrome de Cushing.

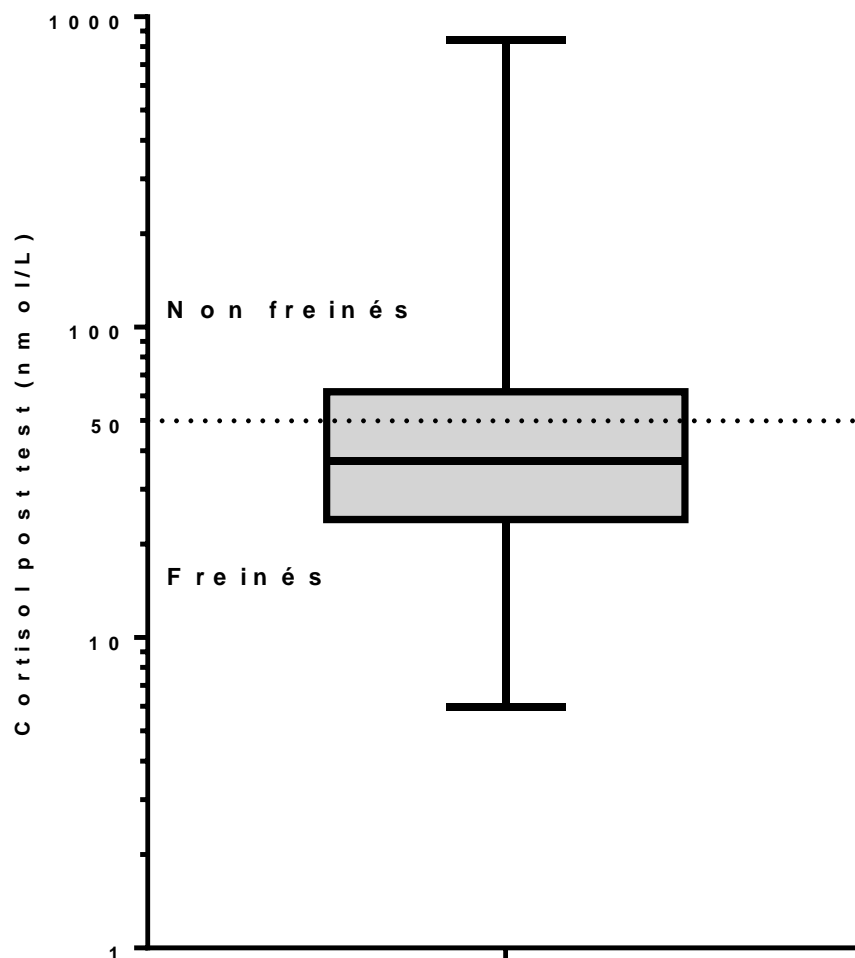


Figure 15 : Concentrations en cortisol sérique à 8H dans la population étudiée.

4.2.3. Cortisol libre urinaire dans les groupes de patients avec ou sans freination efficace

Le cortisol libre urinaire est un des trois tests de base pour l'exploration d'un hypercorticisme. Les concentrations moyennes observées respectivement dans les groupes de patients freinés et non freinés étaient de 214,4 ($\pm 29,6$) nmol/L et de 362,1 ($\pm 100,4$) nmol/L. Cette différence n'était pas statistiquement significative ($p = 0,094$) compte tenu de l'importante variabilité interindividuelle des valeurs observées ([Figure 16](#)). Les valeurs de cortisol libre urinaire s'étendaient de 19 à 2952 nmol/L pour le groupe des patients freinés et de 36 à 5672 nmol/L pour le groupe des patients non freinés.

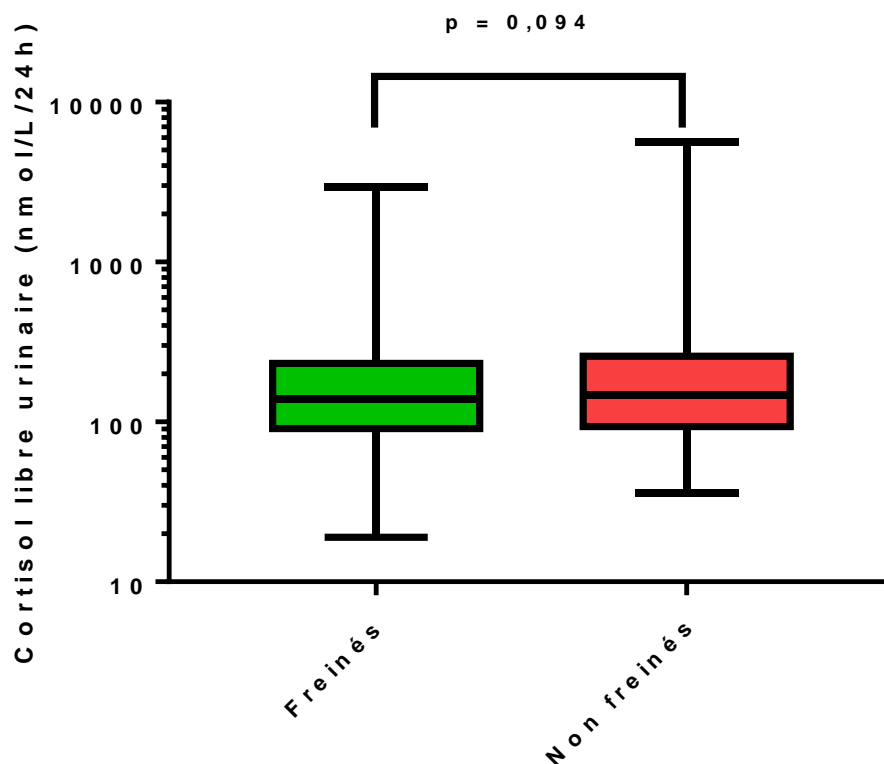


Figure 16 : Concentrations de cortisol libre urinaire dans les groupes de patients freinés et non freinés.

4.2.4. Cortisol salivaire dans les groupes de patients avec ou sans freination efficace

La concentration moyenne du cortisol salivaire dans le groupe des patients freinés était de 2,09 ($\pm 0,23$) nmol/L et de 8,97 ($\pm 1,68$) nmol/L dans le groupe de patients non freinés (Figure 17). Une différence statistiquement significative entre les moyennes observées a été mise en évidence ($p < 0,0001$). Ce paramètre biologique apparaît donc comme fortement corrélé au résultat du test de freination.

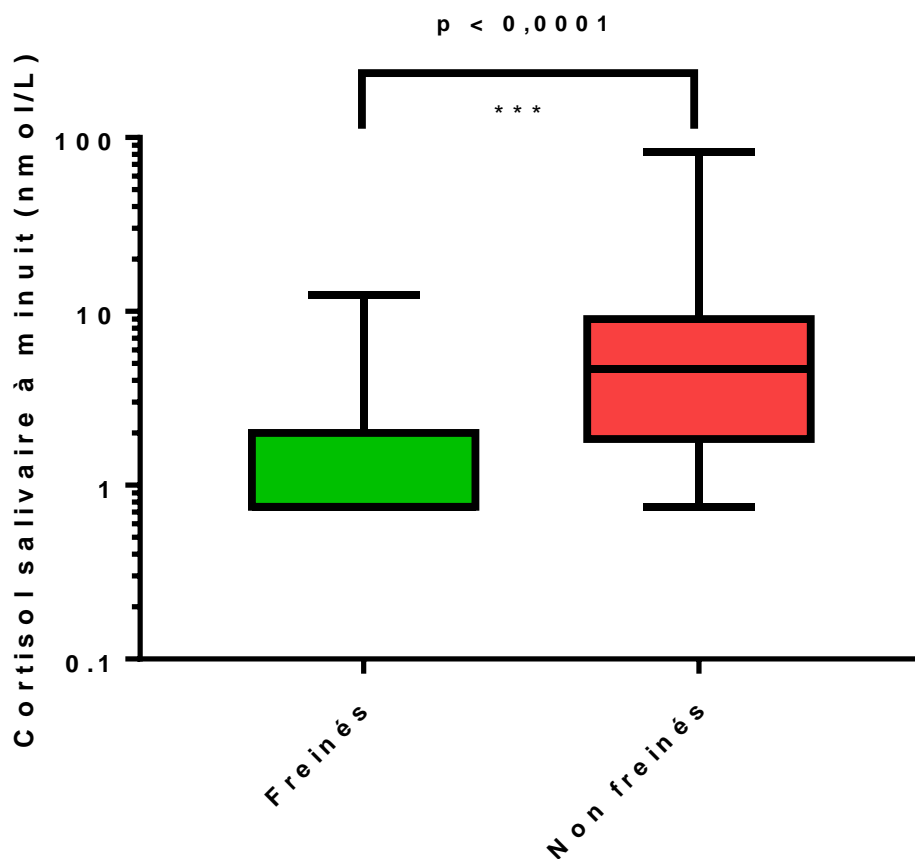


Figure 17 : Concentrations en cortisol salivaire dans les groupes freinés et non freinés.

4.2.5. Concentrations plasmatiques de Dexaméthasone dans les groupes de patients avec ou sans freination efficace

Les concentrations plasmatiques de dexaméthasone, 9 heures après administration, n'étaient pas significativement différentes entre les deux groupes de patients : 2,61 ($\pm 0,10$) ng/mL et 2,70 ng/mL ($\pm 0,15$) respectivement ([Figure 18](#)).

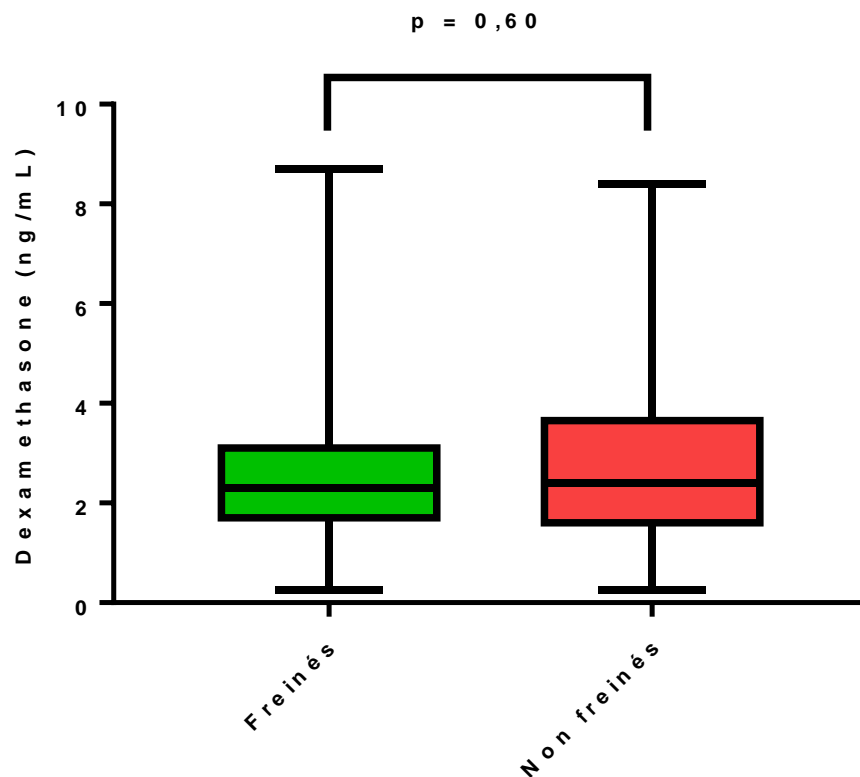


Figure 18 : Concentrations plasmatiques de dexaméthasone à 8H entre les patients freinés et non freinés.

De façon surprenante, l'IMC n'était pas corrélé aux concentrations plasmatiques résiduelles de dexaméthasone, celles-ci ne diminuaient pas avec l'augmentation de l'IMC ([Figure 19](#)).

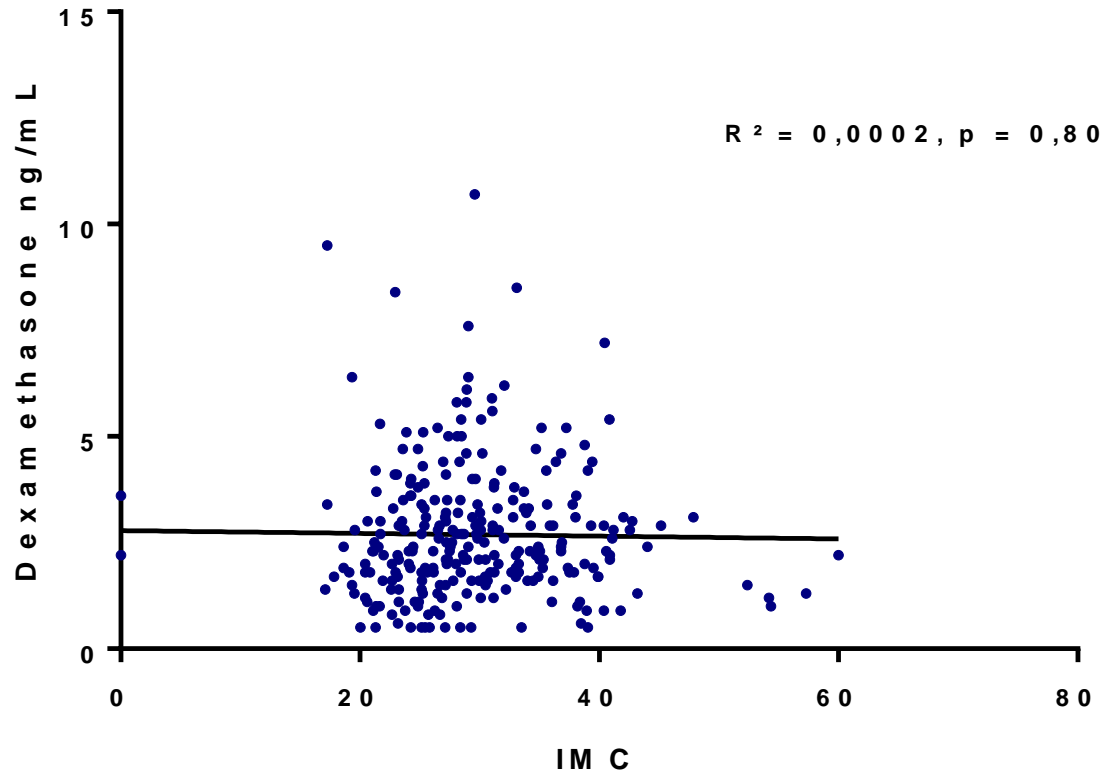


Figure 19 : Corrélation entre la concentration plasmatique résiduelle de dexaméthasone et l'IMC des patients de la population étudiée.

4.2.6. Cycles journaliers d'ACTH dans les groupes de patients avec ou sans freination efficace

Les concentrations en ACTH au cours de la journée ne variaient pas significativement entre le groupe de patients avec freination efficace et celui des patients ne présentant pas de rétrocontrôle de la sécrétion du cortisol. Cependant on observe généralement au cours de ce travail un « aplatissement » des cycles avec un affaiblissement des amplitudes de variations journalières dans le groupe des patients non freinés. Ces résultats suggèrent une dérégulation du cycle circadien de la sécrétion d'ACTH ([Figure 20](#)). Les moyennes à 8H n'étaient pas significativement différentes entre les groupes freinés et non freinés, 42,1 pg/mL ($\pm 3,7$) et 43,0 pg/mL ($\pm 6,3$) respectivement. Au contraire, à 20H les moyennes entre les deux groupes différaient, 15,5 pg/mL ($\pm 1,2$) VS 23,8 pg/mL ($\pm 6,1$).

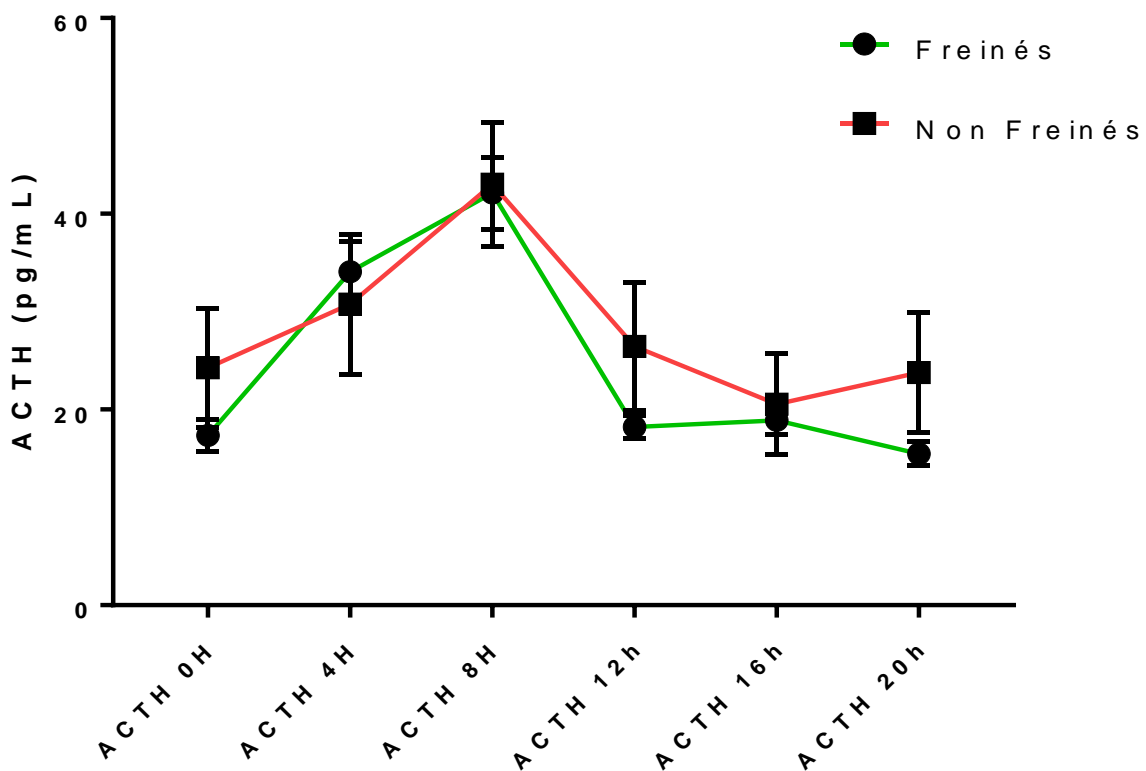


Figure 20 : Concentration plasmatique d'ACTH suivant l'heure de prélèvement pour les groupes de patients freinés et non freinés.

4.2.7. Corrélation entre les concentrations sériques de cortisol et plasmatiques de dexaméthasone

La dexaméthasone permet un rétrocontrôle négatif de l'axe HHS sur la production de cortisol. Une corrélation dose réponse négative est donc attendue sur les concentrations plasmatiques de cortisol en fonction de celles de dexaméthasone. Cependant, de façon surprenante au cours de ces travaux la régression linéaire de ces deux paramètres n'indiquait aucune corrélation significative ([Figure 21](#), $R^2 = 0,0016$, $p = 0,47$).

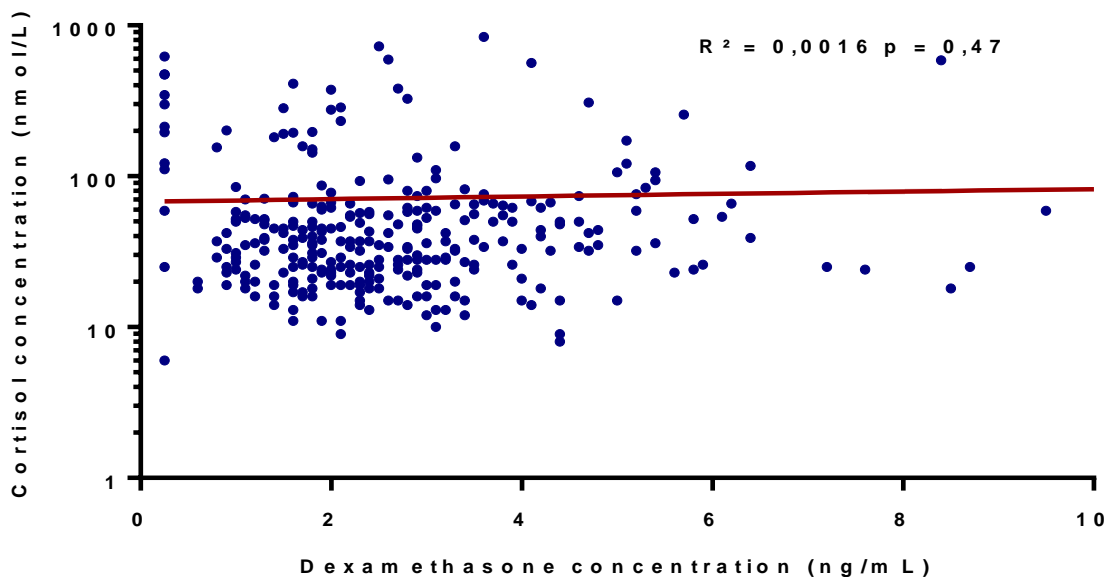


Figure 21 : Corrélation entre les concentrations sériques de cortisol et plasmatiques de dexaméthasone.

4.2.8. Estimation de l'intervalle de référence des concentrations plasmatiques résiduelles de dexaméthasone

Afin de déterminer l'intervalle de référence des concentrations plasmatiques résiduelles de dexaméthasone, une série de valeurs aberrantes (n=11) a été exclue de l'analyse et des valeurs inférieures à la limite de quantification (n=13) étaient par défaut remplacées par la moitié de la valeur de cette limite (60). La répartition des concentrations de dexaméthasone dans la population étudiée a montré une distribution log-normale (Figure 22). Après transformation logarithmique les valeurs de dexaméthasone étaient normalement distribuées, test de Shapiro-Wilk, $W = 0,995$, $p = 0,531$. Ce qui a permis d'obtenir l'intervalle des valeurs à 95% [0,90 – 6,49] ng/mL.

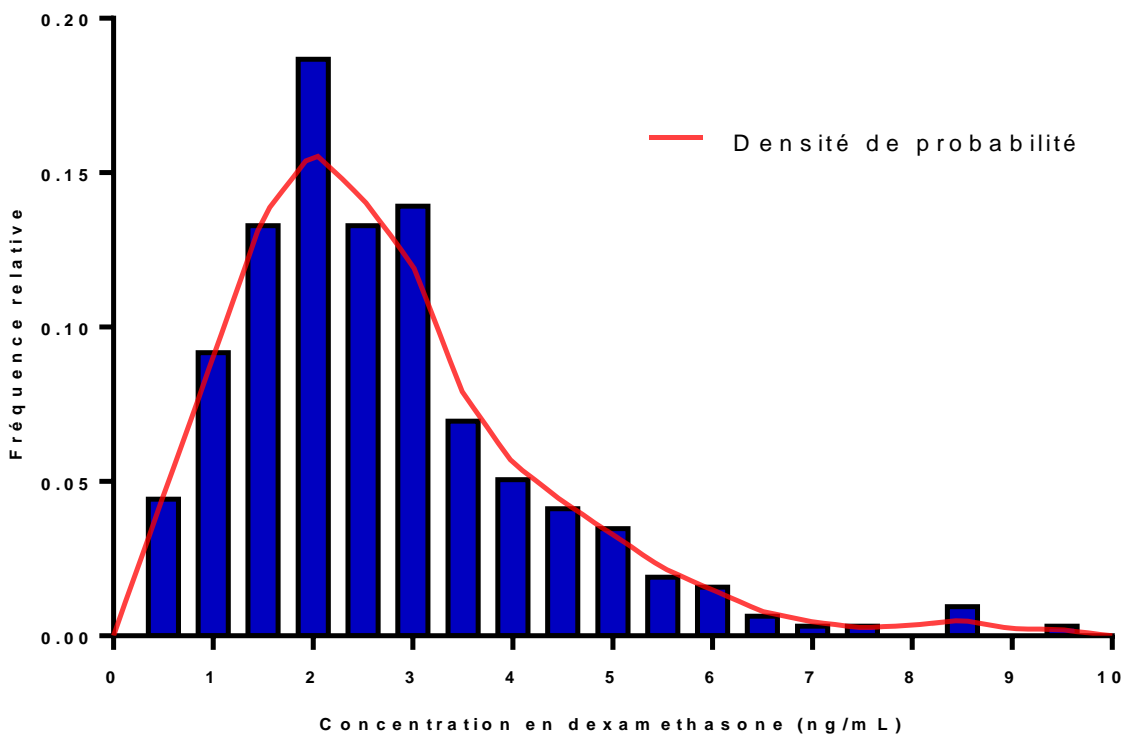


Figure 22 : Répartition de la concentration plasmatique résiduelle de dexaméthasone dans la population étudiée (bleu) et densité de probabilité (rouge) montrant une répartition log-normale.

4.2.9. Corrélation entre concentrations plasmatiques résiduelles de dexaméthasone et résultat du test de freination

Le test de freination à 1mg de dexaméthasone peut avoir un résultat négatif ou positif en l'absence de perturbation hormonale pathologique (faux négatifs/faux positifs). Afin d'expliquer l'issue d'un test de freination, les concentrations plasmatiques de dexaméthasone ont été utilisées comme critère prédictif pour trier les résultats du test de freination. L'analyse par courbe *Receiver Operator Characteristic* (ROC) montre que le dosage de la dexaméthasone n'est pas prédictif du résultat du test de freination ([Figure 23](#), AUC = 0,53, p = 0,33).

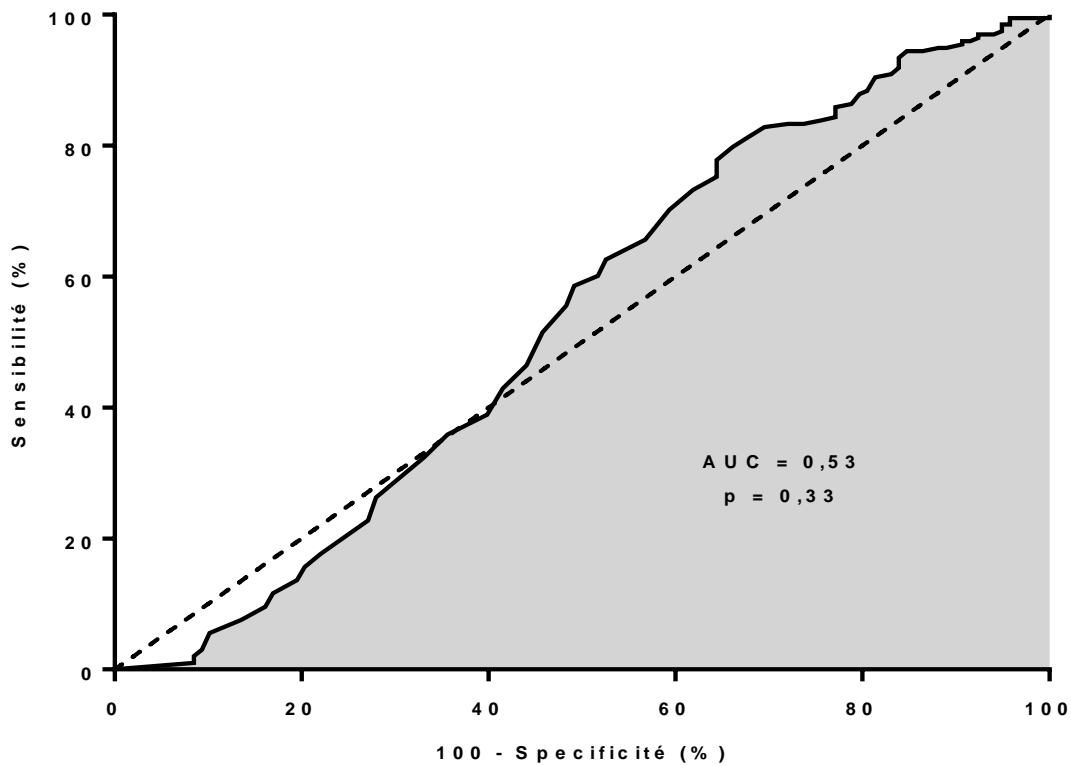


Figure 23 : Courbe ROC de la relation entre le résultat du test de freination et des concentrations résiduelles plasmatiques de la dexaméthasone.

5. Discussion

Au cours de ce travail nous avons développé une méthode de dosage de la dexaméthasone afin de l'appliquer sur une cohorte de patients ayant été soumis à un test de freination au CHU de Rouen. Cette méthode analytique a prouvé tous les critères de qualité et de performance nécessaires à son accréditation (selon les exigences de la norme ISO15189), ainsi qu'à son utilisation pour le diagnostic en routine clinique [\(53\)](#). Cette méthode de dosage présente une sensibilité analytique satisfaisante au regard des besoins en pratique clinique et des capacités de l'instrumentation actuellement disponible sur la plateforme de spectrométrie de masse du CHU de Rouen. En effet, la limite basse de quantification obtenue est en adéquation avec les concentrations cibles attendues. En plus de ses performances satisfaisantes, la méthode développée ici présente une excellente spécificité de par son mode de détection de l'analyte (spectrométrie de masse) et par l'absence maîtrisée d'interférences au temps de rétention de l'analyte. A l'heure actuelle, il n'existe pas de programme d'évaluation externe de la qualité (EEQ) pour le dosage de la dexaméthasone. Ainsi, cette évaluation devra impérativement être effectuée par le laboratoire de Pharmacologie du CHU de Rouen en organisant un échange inter laboratoire d'échantillons, avec des laboratoires partenaires proposant l'analyse.

Avec la généralisation du test de freination de la sécrétion du cortisol par la dexaméthasone, depuis quelques années il est proposé de doser les concentrations plasmatiques de dexaméthasone parallèlement à celles du cortisol lors des tests de freination par 1mg de dexaméthasone. Cette information pourrait apporter un facteur pour expliquer l'absence de freination chez des patients avec un test négatif mais ne présentant pas de syndrome de Cushing. En effet, l'axe HHS est versatile et les concentrations hormonales peuvent varier aléatoirement au cours du temps [\(19\)](#). Le test de freination peut être positif ou négatif en l'absence de toute situation pathologique. De façon intéressante, les résultats de cette étude montrent l'absence de corrélation entre les concentrations plasmatiques de cortisol et de dexaméthasone ainsi que l'absence de pouvoir prédictif sur la positivité du test de freination par analyse ROC. Ces observations peuvent partiellement remettre en cause l'intérêt du suivi thérapeutique systématique de la dexaméthasone dans cette indication. Cependant, ce dosage permet d'attester de la bonne prise du médicament et de sa bonne absorption particulièrement dans les situations avec absence de freination.

Il existe par ailleurs une association significative entre le cortisol salivaire à minuit et l'issue du test de freination, or ce paramètre est corrélé à la concentration de cortisol libre au niveau systémique c'est-à-dire la fraction « active » de cortisol. Le cortisol salivaire à minuit est un des tests de première intention recommandé dans l'exploration du syndrome de Cushing au même titre que le test de freination par 1 mg de dexaméthasone [\(18\)](#). En parallèle, le cortisol libre urinaire n'a pas démontré de différence significative entre les deux groupes de patients ayant eu un test de freination. L'étude des performances groupées de ces trois tests dans une régression logistique, pourrait permettre d'obtenir un critère satisfaisant de diagnostic et éviter les explorations supplémentaires.

Dans certains cas, les cliniciens utilisent les seuils décrits précédemment par certains auteurs à 2 ng/mL voir de 1,3 ng/mL pour expliquer une freination insuffisante de la sécrétion de cortisol à 8h [\(38,39\)](#). Ce travail montre que l'intervalle de référence, permettant d'assurer une freination efficace chez 95% des patients, est relativement large avec des valeurs allant de 0,90 ng/mL, soit encore inférieure aux conclusions précédentes de la littérature, à plus de 6 ng/mL. Ces différences observées entre nos résultats et ceux des auteurs cités peuvent s'expliquer par des approches analytiques différentes. En effet, la LC-MS/MS apporte une meilleure spécificité par rapport à des approches telles que la radio-immuno analyse qui a été utilisée dans les études précédentes, par Meikle *et al.* et Asvold *et al.* [\(38,61\)](#). Notamment avec la RIA, le métabolite principal de la dexaméthasone, la 6-β-OH-dexaméthasone et les corticoïdes présentent un risque de réactivité croisée pouvant conduire à une surestimation des valeurs de concentration de la dexaméthasone [\(62\)](#).

L'intervalle de référence trouvé ici pour les valeurs de dexaméthasone revoit donc à la baisse la limite inférieure de valeur normale de concentration en dexaméthasone, probablement en lien avec une augmentation des spécificités des méthodes. Par conséquent les résultats antérieurs pourraient s'expliquer par un défaut de performance des méthodes décrites précédemment pour le dosage de la dexaméthasone, et ne différenciant pas systématiquement ses métabolites et les autres hormones stéroïdes de structure très similaire.

Nos résultats sont en accord avec l'observation faite au cours d'une étude pharmacocinétique par Loew *et al.* en 1986 et montrent l'absence de corrélation entre les concentrations en

dexaméthasone et celles de cortisol. De plus, Wiedemann *et al.* ont rejeté l'hypothèse qu'une concentration diminuée en dexaméthasone plasmatique au moment du prélèvement conventionnel de cortisol pouvait impacter sur une suppression insuffisante du cortisol. Ils ont au contraire suggéré que la coexistence de faibles concentrations de dexaméthasone avec une absence de freination serait cohérente avec une altération neuroendocrine sous-jacente (63). En effet, dans les 12 heures suivant l'administration d'une dose entre 0,5 et 3 mg de dexaméthasone, la sécrétion de cortisol endogène est modifiée de manière indépendante de la dose chez les patients sains (64). Lorsqu'un test de freination est positif, il peut être nécessaire de pratiquer des explorations complémentaires avec des protocoles de freination à dose plus importante de dexaméthasone et sur des durées plus longues, 2 mg/48h voire 8 mg/48h par exemple. Les résultats présentés au cours de ce travail indiquent l'absence de corrélation claire entre l'exposition au traitement par dexaméthasone et sa pharmacodynamie lors d'une prise unique, ce qui donne un intérêt supplémentaire aux pratiques d'explorations complémentaires à doses accrues.

Par ailleurs, le pic de dexaméthasone (Tmax) est retrouvé à 2h après la prise et le pic de suppression du cortisol après 10 heures ce qui correspond environ aux temps de prélèvement pratiqués ici (64). L'ensemble de ces arguments est suggestif de ne pas effectuer le dosage de la dexaméthasone post test de freination aux seules fins d'expliquer un échec de freination de la sécrétion du cortisol.

La liaison de la dexaméthasone aux protéines fait intervenir presque exclusivement (84%) l'albumine (65). Les variations de concentration d'albumine sont fréquentes dans la population. Cette concentration est diminuée dans diverses conditions pathologiques, y compris le syndrome de Cushing et ce, en lien avec l'hyper catabolisme (66). En conséquence, la fraction libre est augmentée et le volume de distribution est diminué ce qui entraîne une augmentation de l'effet pharmacologique et peut être à l'origine d'un test faussement positif.

Des cas de faux positifs ou faux négatifs peuvent être observés dans diverses situations comprenant, les femmes sous hormonothérapie substitutive (ce qui affecte les niveaux de *cortisol binding globulin* et de *sex binding globulin*), les patients présentant une malabsorption, une non observance ou encore des thérapies induisant l'expression du CYP3A4 (67). Les insuffisances

rénales et hépatiques provoquent plutôt des faux négatifs par baisse de la clairance de la dexaméthasone (68). L'évaluation physiopathologique de l'axe HHS chez les patients est difficile de par la complexité, les fonctions et interactions réciproques parmi les différents organes du système (69).

Parmi les variations interindividuelles possibles des concentrations de dexaméthasone, la pharmacogénétique peut permettre d'en expliquer une partie. Song *et al.* ont montré que certaines mutations dans le GR pouvait directement ou indirectement affecter la liaison avec les glucocorticoïdes, y compris ceux de synthèse comme la dexaméthasone (70). Une résistance à la dexaméthasone et un test de freination faussement négatif sont attendus chez les patients présentant une mutation diminuant l'affinité des glucocorticoïdes pour le GR.

D'après Meikle *et al.* la mesure des concentrations de dexaméthasone devrait être une procédure standard pour l'interprétation du test de freination pour les patients qui ont présenté un test positif (61). Cependant ce dosage ne montre dans ce travail qu'une utilité pour justifier de l'observance de la prise de Dectancy[®] ou bien mettre en lumière un problème d'absorption intestinale de la dexaméthasone.

Lors du processus d'analyse des données, les données statistiquement aberrantes ont été écartées. L'écart des valeurs aberrantes lors d'une étude est un procédé classique mais dans le cas présent celles-ci pourraient être intéressantes à étudier de manière isolée. Les réactions inattendues et les valeurs sortant de la distribution habituelle sont autant d'indicateurs pouvant faire évoquer une condition ou une mutation particulière reliée au métabolisme de la dexaméthasone. Cela pourrait permettre d'identifier des mutations génétiques ou des conditions particulières provoquant une élévation extrême des concentrations en dexaméthasone.

Par ailleurs, une des limites de notre étude, et inhérente à toute étude rétrospective, concerne les données manquantes. En effet pour certains paramètres étudiés comme le CLU ou le cortisol salivaire à minuit, un nombre important de valeurs n'ont pu être recueillies car non réalisées systématiquement. L'absence de ces données peut évidemment conduire à un biais dans l'interprétation des résultats.

La technique de dosage du cortisol a été différente sur l'ensemble de la population, de légères variations des concentrations (moyenne du biais = 8%) ont été observées lors de la comparaison de méthode, ce qui est inévitable à tout changement de trousse analytique. Cela constitue une source de biais qui pourrait avoir un impact sur la significativité des résultats obtenus ici.

Les interférences sont courantes dans l'analyse de milieux biologiques. Dans le but d'augmenter encore la spécificité de la méthode, il pourrait être avantageux de recourir à une technologie de mobilité ionique au sein du spectromètre de masse. En effet celle-ci permet de séparer les différents isomères isobariques (de même poids moléculaire), et sauf phase stationnaire particulière, la chromatographie est incapable d'y parvenir [\(71\)](#). La bétaméthasone en est un exemple cité dans ce travail mais d'autres composés inconnus sont susceptibles d'avoir le même effet.

Le métabolisme du cortisol peut être très variable suivant les patients. Les facteurs affectant sa demi-vie sont aussi bien l'âge, le sexe, ou les conditions pathologiques comme l'obésité, l'insuffisance rénale ou l'insuffisance hépatique. L'axe HHS est là pour palier à ces différences et maintenir un niveau physiologique. Cependant, lors de l'allongement de la demi-vie du cortisol, le délai suivant le rétrocontrôle négatif provoqué par la dexaméthasone pourrait ne pas suffire à réduire la concentration en cortisol sérique sous le seuil défini actuellement pour le test de freination.

Enfin la dexaméthasone avait été choisie initialement car elle ne présentait que peu de réactions croisées dans le dosage des glucocorticoïdes. Ces arguments sont aujourd'hui relativement désuets compte tenu du développement progressif de méthodes hautement spécifiques par spectrométrie de masse. Il serait intéressant à l'avenir de tester les performances d'autres molécules écartées lors du développement du test de freination.

6. Conclusion

Au cours de ce travail nous avons développé et validé une méthode de dosage de la dexaméthasone selon les exigences d'assurance qualité en vigueur (norme NF ISO 15189 et référentiels internationaux de l'EMA et la FDA). Les performances testées comprenaient notamment, la spécificité analytique, la linéarité, la répétabilité, la fidélité intermédiaire, l'effet matrice ainsi que la stabilité des analytes dans les conditions opératoires fixées par le laboratoire. L'intervalle de mesure de la méthode, qui s'étend de 0,5 à 10 ng/mL apparaît satisfaisant pour répondre aux besoins des tests de freination. L'application de cette méthode de dosage sur une cohorte de 318 patients admis au CHU de Rouen, nous a permis d'établir un intervalle (IC 95%) de valeurs usuelles des concentrations allant de 0,90 à 6,49 ng/mL.

Le recueil systématique de plusieurs covariables, telles que la concentration sérique en cortisol, le cortisol libre urinaire et cortisol salivaire à minuit a été utilisé pour étudier les relations avec le résultat du test de freination. Les concentrations en cortisol à H+9 heures suivant la prise de 1mg de dexaméthasone ont été mises en corrélation avec celles de dexaméthasone mais aucun lien statistiquement significatif n'a pu être établi. Ce résultat suggère l'absence de relation entre le niveau de freination de la sécrétion du cortisol et l'exposition à la dexaméthasone, dès lors que celle-ci est détectable par la méthode de dosage HPLC-MS/MS. Ainsi, sous réserve des biais évoqués précédemment et particulièrement liés à l'aspect rétrospectif de ce travail, il apparaît que la concentration résiduelle de dexaméthasone lors d'un test de freination n'est pas corrélée au résultat de celui-ci. Cependant, les résultats de cette étude suggèrent que le suivi thérapeutique de la dexaméthasone apparaît indispensable au cours des tests de freination pour attester de la prise effective du médicament et évaluer un défaut d'exposition lié à des problèmes d'absorption digestive, d'éventuelles interactions médicamenteuses, une posologie insuffisante ou une perturbation d'exposition liée à des facteurs pharmacogénétiques. Ainsi, le suivi thérapeutique pharmacologique de la dexaméthasone au cours des tests de freination de la sécrétion du cortisol participe à une meilleure compréhension du test de freination et devrait contribuer à l'amélioration du diagnostic précoce des patients suspectés de syndrome de Cushing.

7. References

1. Kluwer W. Clinical Chemistry, techniques, principles & correlations, Michael L. Bishop, Edward P. Fody, and Larry E. Schoeff: Clinical Chemistry. Wolters Kluwer Health/Lippincott Williams & Wilkins; 2010. (Clinical Chemistry).
2. Papadimitriou A, Priftis KN. Regulation of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis. Neuroimmunomodulation. 2009;16(5):265-71.
3. Nikodemova M, Diehl CR, Aguilera G. Multiple sites of control of type-1 corticotropin releasing hormone receptor levels in the pituitary. Arch Physiol Biochem. avr 2002;110(1-2):123-8.
4. Elias LL, Clark AJ. The expression of the ACTH receptor. Braz J Med Biol Res Rev Bras Pesqui Medicas E Biol. oct 2000;33(10):1245-8.
5. Burtis CA, Ashwood ER, Bruns DE. Tietz Textbook of Clinical Chemistry and Molecular Diagnostics. Elsevier Health Sciences; 2012. 2259 p.
6. Dunn AJ. Cytokine activation of the HPA axis. Ann N Y Acad Sci. 2000;917:608-17.
7. Gaw A. Clinical Chemistry - An Illustrated Colour text. 2013.
8. Biddie SC, Hager GL. Glucocorticoid receptor dynamics and gene regulation. Stress Amst Neth. mai 2009;12(3):193-205.
9. Burry LD, Wax RS. Role of corticosteroids in septic shock. Ann Pharmacother. mars 2004;38(3):464-72.
10. Franchimont D. Overview of the actions of glucocorticoids on the immune response: a good model to characterize new pathways of immunosuppression for new treatment strategies. Ann N Y Acad Sci. juin 2004;1024:124-37.
11. Lin CL, Wu TJ, Machacek DA, Jiang NS, Kao PC. Urinary free cortisol and cortisone determined by high performance liquid chromatography in the diagnosis of Cushing's syndrome. J Clin Endocrinol Metab. janv 1997;82(1):151-5.
12. Feelders R, Sharma S, Nieman L. Cushing's syndrome: epidemiology and developments in disease management. Clin Epidemiol. avr 2015;281.
13. Androulakis II, Kaltsas G, Chrousos G. Pseudo-Cushing's States. In: De Groot LJ, Chrousos G, Dungan K, Feingold KR, Grossman A, Hershman JM, et al., éditeurs. Endotext. South Dartmouth (MA): MDText.com, Inc.; 2000.
14. Savage MO, Chan LF, Grossman AB, Storr HL. Work-up and management of paediatric Cushing's syndrome. Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes. août 2008;15(4):346-51.
15. Louiset E, Duparc C, Young J, Renouf S, Tetsi Nomigni M, Boutelet I, et al. Intraadrenal corticotropin in bilateral macronodular adrenal hyperplasia. N Engl J Med. 28 nov 2013;369(22):2115-25.
16. Bertagna X, Groussin L, Luton J-P, Bertherat J. Aberrant receptor-mediated Cushing's syndrome. Horm Res. 2003;59 Suppl 1:99-103.

17. Ross EJ, Linch DC. Cushing's syndrome--killing disease: discriminatory value of signs and symptoms aiding early diagnosis. *Lancet Lond Engl.* 18 sept 1982;2(8299):646-9.
18. Nieman LK, Biller BMK, Findling JW, Newell-Price J, Savage MO, Stewart PM, et al. The diagnosis of Cushing's syndrome: an Endocrine Society Clinical Practice Guideline. *J Clin Endocrinol Metab.* mai 2008;93(5):1526-40.
19. Hermus AR, Pieters GF, Borm GF, Verhofstad AA, Smals AG, Benraad TJ, et al. Unpredictable hypersecretion of cortisol in Cushing's disease: detection by daily salivary cortisol measurements. *Acta Endocrinol (Copenh).* mai 1993;128(5):428-32.
20. Oldfield EH, Chrousos GP, Schulte HM, Schaaf M, McKeever PE, Krudy AG, et al. Preoperative Lateralization of ACTH-Secreting Pituitary Microadenomas by Bilateral and Simultaneous Inferior Petrosal Venous Sinus Sampling. *N Engl J Med.* 10 janv 1985;312(2):100-3.
21. Oldfield EH, Doppman JL, Nieman LK, Chrousos GP, Miller DL, Katz DA, et al. Petrosal sinus sampling with and without corticotropin-releasing hormone for the differential diagnosis of Cushing's syndrome. *N Engl J Med.* 26 sept 1991;325(13):897-905.
22. Crapo L. Cushing's syndrome: a review of diagnostic tests. *Metabolism.* sept 1979;28(9):955-77.
23. Laudat MH, Cerdas S, Fournier C, Guiban D, Guilhaume B, Luton JP. Salivary cortisol measurement: a practical approach to assess pituitary-adrenal function. *J Clin Endocrinol Metab.* févr 1988;66(2):343-8.
24. Trilck M, Flitsch J, Lüdecke DK, Jung R, Petersenn S. Salivary cortisol measurement--a reliable method for the diagnosis of Cushing's syndrome. *Exp Clin Endocrinol Diabetes Off J Ger Soc Endocrinol Ger Diabetes Assoc.* avr 2005;113(4):225-30.
25. Castro M de, Moreira AC. Screening and diagnosis of Cushing's syndrome. *Arq Bras Endocrinol Metabol.* nov 2007;51(8):1191-8.
26. Yaneva M, Mosnier-Pudar H, Dugué M-A, Grabar S, Fulla Y, Bertagna X. Midnight salivary cortisol for the initial diagnosis of Cushing's syndrome of various causes. *J Clin Endocrinol Metab.* juill 2004;89(7):3345-51.
27. LIDDLE GW. Tests of pituitary adrenal suppressibility in the diagnosis of Cushing's syndrome. 1960;20:22.
28. Nugent CA, Nichols T, Tyler FH. Diagnosis of Cushing's syndrome; single dose dexamethasone suppression test. *Arch Intern Med.* août 1965;116:172-6.
29. Wood PJ, Barth JH, Freedman DB, Perry L, Sheridan B. Evidence for the low dose dexamethasone suppression test to screen for Cushing's syndrome--recommendations for a protocol for biochemistry laboratories. *Ann Clin Biochem.* mai 1997;34 (Pt 3):222-9.
30. Vilar L, Freitas M da C, Faria M, Montenegro R, Casulari LA, Naves L, et al. Pitfalls in the diagnosis of Cushing's syndrome. *Arq Bras Endocrinol Metabol.* nov 2007;51(8):1207-16.

31. Nickelsen T, Lissner W, Schöffling K. The dexamethasone suppression test and long-term contraceptive treatment: measurement of ACTH or salivary cortisol does not improve the reliability of the test. *Exp Clin Endocrinol.* 1989;94(3):275-80.
32. Berg JM, Tymoczko JL, Stryer L. *Biochemistry.* W. H. Freeman; 2010. 1120 p.
33. Christenson LK, Strauss JF. Steroidogenic acute regulatory protein: an update on its regulation and mechanism of action. *Arch Med Res.* déc 2001;32(6):576-86.
34. VIDAL - DECTANCYL 0,5 mg cp - 2018.
35. Chen X, Ji ZL, Chen YZ. TTD: Therapeutic Target Database. *Nucleic Acids Res.* 1 janv 2002;30(1):412-5.
36. Michal G, Schomburg D. *Biochemical Pathways: An Atlas of Biochemistry and Molecular Biology.* :414.
37. Zanger UM, Schwab M. Cytochrome P450 enzymes in drug metabolism: Regulation of gene expression, enzyme activities, and impact of genetic variation. *Pharmacol Ther.* 1 avr 2013;138(1):103-41.
38. Asvold BO, Grill V, Thorstensen K, Bjørgaas MR. Association between posttest dexamethasone and cortisol concentrations in the 1 mg overnight dexamethasone suppression test. *Endocr Connect.* 1 nov 2012;1(2):62-7.
39. Ueland GÅ, Methlie P, Kellmann R, Bjørgaas M, Åsvold BO, Thorstensen K, et al. Simultaneous assay of cortisol and dexamethasone improved diagnostic accuracy of the dexamethasone suppression test. *Eur J Endocrinol.* 6 janv 2017;176(6):705-13.
40. Eisenhofer G, Peitzsch M, Kaden D, Langton K, Pamporaki C, Masjkur J, et al. Reference intervals for plasma concentrations of adrenal steroids measured by LC-MS/MS: Impact of gender, age, oral contraceptives, body mass index and blood pressure status. *Clin Chim Acta Int J Clin Chem.* juill 2017;470:115-24.
41. Meikle AW, Lagerquist LG, Tyler FH. A plasma dexamethasone radioimmunoassay. *Steroids.* août 1973;22(2):193-202.
42. Caro JF, Meikle AW, Check JH, Cohen SN. "Normal Suppression" to Dexamethasone in Cushing's Disease: An Expression of Decreased Metabolic Clearance for Dexamethasone. *J Clin Endocrinol Metab.* 1 sept 1978;47(3):667-70.
43. Ketha H, Girtman A, Singh RJ. Estradiol assays – The path ahead. *Steroids.* 1 juill 2015;99:39-44.
44. Huang CM, Zweig M. Evaluation of a radioimmunoassay of urinary cortisol without extraction. *Clin Chem.* janv 1989;35(1):125-6.
45. Baid SK, Sinaii N, Wade M, Rubino D, Nieman LK. Radioimmunoassay and tandem mass spectrometry measurement of bedtime salivary cortisol levels: a comparison of assays to establish hypercortisolism. *J Clin Endocrinol Metab.* août 2007;92(8):3102-7.

46. Cho H-J, Kim JD, Lee W-Y, Chung BC, Choi MH. Quantitative metabolic profiling of 21 endogenous corticosteroids in urine by liquid chromatography-triple quadrupole-mass spectrometry. *Anal Chim Acta*. 19 janv 2009;632(1):101-8.
47. Kyriazopoulou V, Vagenakis AG. Abnormal overnight dexamethasone suppression test in subjects receiving rifampicin therapy. *J Clin Endocrinol Metab*. juill 1992;75(1):315-7.
48. Elecsys Cortisol II, Roche. 2017.
49. Elecsys ACTH, Roche. 2017.
50. EMA Guideline on Bioanalytical Method Validation. 2011.
51. FDA Guidance for Industry Bioanalytical Method Validation. 2001.
52. COFRAC. Guide technique de vérification (portée A) / validation (portée B) des méthodes en biologie médicale. SH GTA 04 – rév. 00 – Avril 2011. 46 p.
53. COFRAC. Norme NF ISO 15189. 2012.
54. GraphPad Prism 7. GraphPad Software, La Jolla California USA, www.graphpad.com.
55. R Core Team. (2017). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. <https://www.R-project.org/>.
56. Robin X, Turck N, Hainard A, Tiberti N, Lisacek F, Sanchez J-C, et al. pROC: an open-source package for R and S+ to analyze and compare ROC curves. *BMC Bioinformatics*. 17 mars 2011;12:77.
57. Lynch K. CLSI C62-A: A new standard for clinical mass spectrometry. *Clin Chem*. 1 oct 2015;62.
58. Gu H, Liu G, Wang J, Aubry A-F, Arnold ME. Selecting the correct weighting factors for linear and quadratic calibration curves with least-squares regression algorithm in bioanalytical LC-MS/MS assays and impacts of using incorrect weighting factors on curve stability, data quality, and assay performance. *Anal Chem*. 16 sept 2014;86(18):8959-66.
59. COFRAC. Guide technique d'accréditation pour l'évaluation des incertitudes de mesure en biologie médicale. SH GTA 14 – rév 00 - juin 2012.
60. Helsel DR. Less than obvious - statistical treatment of data below the detection limit. *Environ Sci Technol*. 1 déc 1990;24(12):1766-74.
61. Meikle AW. Dexamethasone suppression tests: usefulness of simultaneous measurement of plasma cortisol and dexamethasone. *Clin Endocrinol (Oxf)*. avr 1982;16(4):401-8.
62. Ritchie JC, Owens MJ, Mayer H, Watson JT, Kilts C, Carroll BJ. Preliminary studies of 6 β -hydroxydexamethasone and its importance in the DST. *Biol Psychiatry*. 1 nov 1992;32(9):825-33.
63. Wiedemann K, Holsboer F. The effect of dexamethasone dosage upon plasma cortisol and dexamethasone during the DST. *J Affect Disord*. 1 juin 1990;19(2):133-7.

64. Loew D, Schuster O, Graul EH. Dose-dependent pharmacokinetics of dexamethasone. *Eur J Clin Pharmacol.* 1986;30(2):225-30.
65. Peets EA, Staub M, Symchowicz S. Plasma binding of betamethasone-3H, dexamethasone-3H, and cortisol-14C--a comparative study. *Biochem Pharmacol.* juill 1969;18(7):1655-63.
66. Putignano P, Kaltsas GA, Korbonits M, Jenkins PJ, Monson JP, Besser GM, et al. Alterations in serum protein levels in patients with Cushing's syndrome before and after successful treatment. *J Clin Endocrinol Metab.* sept 2000;85(9):3309-12.
67. Pascussi JM, Drocourt L, Gerbal-Chaloin S, Fabre JM, Maurel P, Vilarem MJ. Dual effect of dexamethasone on CYP3A4 gene expression in human hepatocytes. Sequential role of glucocorticoid receptor and pregnane X receptor. *Eur J Biochem.* déc 2001;268(24):6346-58.
68. Gilbert R, Lim EM. The diagnosis of Cushing's syndrome: an endocrine society clinical practice guideline. *Clin Biochem Rev.* août 2008;29(3):103-6.
69. Pasquali R, Ambrosi B, Armanini D, Cavagnini F, Uberti ED, Del Rio G, et al. Cortisol and ACTH response to oral dexamethasone in obesity and effects of sex, body fat distribution, and dexamethasone concentrations: a dose-response study. *J Clin Endocrinol Metab.* janv 2002;87(1):166-75.
70. Song Q-Q, Xie W-Y, Tang Y-J, Zhang J, Liu J. Genetic variation in the glucocorticoid pathway involved in interindividual differences in the glucocorticoid treatment. *Pharmacogenomics.* févr 2017;18(3):293-316.
71. Kanu AB, Dwivedi P, Tam M, Matz L, Hill HH. Ion mobility-mass spectrometry. *J Mass Spectrom.* 16 janv 2008;43(1):1-22.

Serment de Galien

Je jure 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.

De ne dévoiler à personne les secrets qui m'auraient été confiés ou dont j'aurais eu connaissance dans l'exercice de ma Profession.

En aucun cas, je ne consentirai à utiliser mes connaissances et mon état pour corrompre les mœurs et favoriser les actes criminels.

Que les hommes m'accordent leur estime si je suis fidèle à mes promesses.

Que je sois méprisé de mes Confrères si je manque à mes engagements.

Apports du suivi thérapeutique pharmacologique de la dexaméthasone dans les tests de freination.

Th. D. Pharm., Rouen, 2018, 82 p.

RESUME

Le syndrome de Cushing est défini comme une hypersécrétion chronique du principal glucocorticoïde endogène, le cortisol, par les glandes surrénales. Afin d'explorer une hypersécrétion de cortisol, le test de freination par 1mg de dexaméthasone (DXM) est effectué dans le but de provoquer un rétrocontrôle négatif sur la sécrétion de cortisol. Cependant, le résultat de ce test donne régulièrement lieu à des cas de faux positif ou de faux négatifs. Il a donc été proposé de mesurer les concentrations résiduelles de DXM afin d'expliquer l'absence de freination dans ces situations. Au cours de cette étude nous avons développé et validé une méthode de dosage de la DXM en HPLC-MS/MS conformément aux exigences internationales et à la norme d'accréditation NF EN ISO 15189. Nous avons appliqué cette méthode de dosage à une série de 318 patients admis en endocrinologie au CHU de Rouen afin d'évaluer la relation existant entre l'exposition à la DXM et le niveau de freination de la sécrétion du cortisol. Le domaine de mesure de cette méthode de dosage s'étend de 0,50 à 10 ng/mL. L'intervalle des valeurs usuelles des concentrations de DXM à H+9 heures était de 0,90–6,49 ng/mL. Sur les 318 patients étudiés, 199 présentaient un test de freination négatif (cortisol<50 nmol/L) et 119 présentaient un test de freination positif (cortisol>50 nmol/L). Les concentrations sériques du cortisol à 8h lors d'un test de freination n'étaient pas corrélées à celles de DXM. L'analyse par courbe ROC indiquait l'absence de valeur prédictive des concentrations de DXM pour évaluer le résultat du test de freination (AUC=0,53, p=0,33). Néanmoins, le suivi thérapeutique pharmacologique systématisé de la DXM à H+9 heures au cours des tests de freination apparaît indispensable pour attester de la prise effective du médicament et évaluer un défaut d'exposition lié à des problèmes d'absorption digestive, d'éventuelles interactions médicamenteuses, une posologie insuffisante ou une perturbation d'exposition liée à des facteurs pharmacogénétiques.

MOTS CLÉS : Cushing – Freination – Dexaméthasone – HPLC-MS/MS – Cortisol

JURY

Président : Professeur Michel GUERBET, PU - Toxicologie

Membres : Docteur Fabien LAMOUREUX, PH – Directeur de thèse - Pharmacologie

Docteur Frédéric ZIEGLER, MCU-PH – Co-Directeur de thèse - Biochimie

Professeur Hervé LEFEBVRE, PU-PH - Endocrinologie

Docteur Valéry BRUNEL, PH – Biochimie Générale

DATE DE SOUTENANCE : 9 Octobre 2018