



HAL
open science

Mise au point et validation d'une méthode de dosage par HPLC-MS/MS de métabolites hydroxylés de la vitamine D

Clémentine Gondolf

► **To cite this version:**

Clémentine Gondolf. Mise au point et validation d'une méthode de dosage par HPLC-MS/MS de métabolites hydroxylés de la vitamine D. Sciences pharmaceutiques. 2019. dumas-02451834

HAL Id: dumas-02451834

<https://dumas.ccsd.cnrs.fr/dumas-02451834>

Submitted on 23 Jan 2020

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.



MEMOIRE DU DIPLOME D'ETUDES SPECIALISEES

Préparé au sein de l'Université de Caen Normandie

Conformément aux dispositions de l'arrêté du 4 octobre 1988 tient lieu de

Thèse pour le diplôme d'Etat de Docteur en Pharmacie

Mise au point et validation d'une méthode de dosage par HPLC-MS/MS de métabolites hydroxylés de la vitamine D

Présenté par
Clémentine GONDOLF

**Soutenu publiquement le 11 octobre 2019
devant le jury composé de**

Monsieur Michel BOULOUARD	PU Université Caen	Président du jury
Madame Marie NOWOCZYN	PHC CHU Caen	Examineur
Monsieur Stéphane ALLOUCHE	PU-PH CHU Caen	Examineur
Monsieur Arnaud MOLIN	PHU CHU Caen	Examineur

Mémoire dirigé par Dr Marie NOWOCZYN

LISTE DES ENSEIGNANTS – CHERCHEURS

Directeur de la Faculté des Sciences Pharmaceutiques

Professeur Michel BOULOUARD

Assesseurs

Professeur Pascale SCHUMANN-BARD

Professeur Anne-Sophie VOISIN-CHIRET

Directrice administrative

Madame Sarah CHEMTOB

PROFESSEURS DES UNIVERSITES

BOULOUARD Michel	Physiologie, Pharmacologie
BUREAU Ronan	Biophysique, Chémoinformatique
COLLOT Valérie	Pharmacognosie
DALLEMAGNE Patrick	Chimie médicinale
DAUPHIN François	Physiologie, Pharmacologie
DELEPEE Raphaël	Chimie analytique
FABIS Frédéric	Chimie organique
FRERET Thomas	Physiologie, Pharmacologie
GARON David	Botanique, Mycologie, Biotechnologies
GAUDUCHON Pascal Eméritat jusqu'au 31/08/2019	Biologie cellulaire
GIARD Jean-Christophe	Bactériologie, Virologie
MALZERT-FREON Aurélie	Pharmacie galénique
RAULT Sylvain Eméritat jusqu'au 31/08/2019	Chimie thérapeutique
ROCHAIS Christophe	Chimie organique
SCHUMANN-BARD Pascale	Physiologie, Pharmacologie
SICHEL François	Toxicologie
SOPKOVA Jana	Biophysique, Drug design
VOISIN-CHIRET Anne-Sophie	Chimie médicinale

MAITRES DE CONFERENCES DES UNIVERSITES

ANDRE Véronique - HDR

Biochimie, Toxicologie

BOUET Valentine - HDR

Physiologie, Pharmacologie

CAILLY Thomas - HDR

Chimie bio-inorganique, Chimie organique

DENOYELLE Christophe - HDR

Biologie cellulaire et moléculaire,

Biochimie, Cancérologie

DHALLUIN Anne

Bactériologie, Virologie, Immunologie

ELDIN de PECOULAS Philippe - HDR

Parasitologie, Mycologie médicale

GROO Anne-Claire

Pharmacie galénique

KIEFFER Charline

Chimie médicinale

KRIEGER Sophie (Praticien hospitalier) - **HDR**

Biologie clinique

LAPORTE-WOJCIK Catherine

Chimie bio-inorganique

LEBAILLY Pierre - HDR

Santé publique

LECHEVREL Mathilde - HDR

Toxicologie

LEGER Marianne

Physiologie, Pharmacologie

LEPAILLEUR Alban - HDR

Modélisation moléculaire

N'DIAYE Monique

Parasitologie, Mycologie médicale,

Biochimie clinique

PAIZANIS Eleni

Physiologie, Pharmacologie

PEREIRA-ROSENFELD Maria de Fatima

Chimie organique et thérapeutique

POTTIER Ivannah

Chimie et toxicologie analytiques

PREVOST Virginie - HDR

Chimie analytique, Nutrition, Education

thérapeutique du patient

QUINTIN Jérôme

Pharmacognosie

RIOULT Jean-Philippe

Botanique, Mycologie, Biotechnologies

SINCE Marc

Chimie analytique

VILLEDIEU Marie - HDR

Biologie et thérapies innovantes des cancers

PROFESSEUR AGREGÉ (PRAG)

PRICOT Sophie

Anglais

PERSONNEL ASSOCIE A TEMPS PARTIEL (PAST)

SAINT-LORANT Guillaume

Pharmacie clinique

SEDILLO Patrick

Pharmacie officinale

RICHARD Estelle

Pharmacie officinale

Enseignants titulaires du Diplôme d'Etat de Docteur

REMERCIEMENTS

A Monsieur le Professeur Michel BOULOUARD,

Pour l'honneur que vous me faites de présider le jury de cette thèse et pour l'intérêt que vous avez porté à mon travail, veuillez trouver ici l'expression de ma sincère reconnaissance.

A ma directrice de thèse, le Docteur Marie NOWOCZYN,

Un grand merci pour m'avoir proposé ce sujet, pour avoir accepté de diriger ce travail et pour le temps accordé malgré un planning chargé. Tu as toute ma reconnaissance pour avoir contribué à l'aboutissement de mes études et à la réussite de ce projet.

A Monsieur le Professeur Stéphane ALLOUCHE,

Sincères remerciements pour avoir accepté de siéger en tant que membre du jury, et pour m'avoir partagé autant de connaissances au cours de ces quatre semestres de stage.

A Monsieur le Docteur Arnaud MOLIN,

Pour avoir aimablement accepté de participer à ce jury de thèse et pour toute l'implication dans ce projet passionnant.

Aux biologistes actuels, anciens et bientôt anciens du laboratoire de Biochimie : Frédérique GRANDHOMME, Sabine FRADIN, David GUENET, Marie-Hélène READ, Laurent COULBAULT, Geneviève LUBAC, Alexandre CESBRON et Anne CHOCAT. Je vous adresse mes remerciements les plus sincères pour le partage de vos connaissances durant toutes mes années d'internat, et pour certains dès ma 1^{ère} année d'études. Merci pour toutes vos réponses à mes questions et tous vos conseils avisés.

Je remercie également,

Claire et Maud, pour votre patience dans ma formation à la spectrométrie de masse, votre temps passé dans le travail de mise au point de ce projet, et plus encore, pour votre bonne humeur sans faille.

Bénédicte et Hugo, pour vos heures passées aux « manip vitamine D » et pour vos dons de sang, vous avez largement contribué à l'avancement de ce travail.

Mes autres co-internes, Margaux, Mickmick, Pauline, Valérie, Marine, Bettina, Sarah, Justine, Agathe, Nefert, Laurent, Claire, Jérémy et tous les autres, merci d'avoir été là.

Ma sister, pour toutes ces années passées à tes côtés et celles passées plus loin, je suis pressée de (re)-manger tout plein de chocolat avec toi.

Bastien, pour tous ces bons petits plats, ces sorties, soirées et tant d'autres moments.

Les forains Ben et Sam pour tous ces moments de détente et ces voyages bien sympathiques Océane, la meilleure coloc' et la meilleure sage-femme que je connaisse pour ton soutien infaillible.

Je dédie cette thèse à mes parents, pour m'avoir soutenue (et supportée) tout au long de ces études. Vous m'avez toujours été d'une aide précieuse et inconditionnelle et êtes toujours là dans les moments qui comptent, et dans les autres aussi. Ma réussite, je vous la dois amplement.

SOMMAIRE

ABREVIATIONS	1
TABLE DES ILLUSTRATIONS.....	4
INTRODUCTION	7
I. Définitions et structure chimique de la vitamine D	7
II. Métabolisme de la vitamine D	8
1- Vue d'ensemble.....	8
2- Voies de synthèse.....	8
3- Voies d'activation.....	10
4- Voies de dégradation	12
III. Implications physiopathologiques de la vitamine D	13
1- Action sur le métabolisme phosphocalcique	13
2- Autres actions biologiques.....	14
IV. Les carences en vitamine D.....	14
1- Définitions	14
2- Etiologies	16
3- Conséquences	17
4- Intérêts de la supplémentation vitaminique	17
5- Protocoles nationaux de supplémentation.....	19
V. Les hypervitaminoses D	19
1- Risques des hypervitaminoses D.....	19
2- Premiers cas d'hypersensibilité à la vitamine D : Hypercalcémie idiopathique infantile (IIH).....	20
3- Premières hypothèses d'un support génétique de l'IIH	21
4- Découverte de mutations dans le gène <i>CYP24A1</i>	23
5- Définition de l'IIH par mutation du <i>CYP24A1</i>	24

VI. Mise au point d'un examen applicable en dépistage de l'IIH	25
1- Intérêts du dépistage de l'IIH	25
2- Rationnel de la mise au point d'un examen de dépistage large	25
3- Intérêts du dosage du métabolite 24,25(OH) ₂ -D ₃	26
4- Vitamin D Hydroxylated metabolite Ratio (VHR) : Définition et intérêts	27
5- Utilité du VHR dans le dépistage de l'IIH	28
6- Utilité du VHR dans le diagnostic différentiel des hypercalcémies	30
VII. Techniques de dosage des métabolites de la vitamine D développées	31
1- Indications du dosage des métabolites de la vitamine D	31
2- Techniques de dosage.....	32
3- Avantages des techniques de type HPLC-MS/MS.....	32
VIII. Principe général des techniques d'HPLC-MS/MS	34
1- Chromatographie Liquide Haute Performance HPLC	34
2- Spectrométrie de masse MS	34
OBJECTIFS DE CE TRAVAIL	39
MATERIEL ET METHODES	40
I. Mise au point de la méthode de dosage.....	40
1- Traitement pré-analytique.....	40
2- HPLC et Spectromètre de masse.....	41
3- Calibrants	41
4- Etalons internes.....	41
5- Contrôles internes de Qualité (CIQ).....	42
II. Validation de la méthode analytique selon la norme ISO 15189	43
1- Spécificité analytique	43
2- Etendue de mesure et linéarité	43
3- Répétabilité et fidélité intermédiaire	44
4- Contamination inter-échantillon.....	44

5- Rendement pré-analytique et effet de matrice.....	45
6- Exactitude.....	47
7- Critères de validation de la méthode.....	47
8- Robustesse de la méthode.....	47
III. Détermination des valeurs de référence : cohorte de patients.....	48
IV. Analyses moléculaires.....	49
V. Analyses statistiques.....	49
RESULTATS	50
I. Etapes de la mise au point de la méthode analytique.....	50
1- Optimisation de l'ionisation dans la source.....	50
2- Transitions suivies et optimisation de leur signal.....	54
3- Optimisation de l'extraction des analytes	58
4- Optimisation de l'étape de dérivation.....	62
5- Optimisation des paramètres de l'HPLC	65
6- Exemples de chromatogrammes types.....	68
7- Optimisation de la gamme d'étalonnage.....	69
II. Validation et performance de la méthode.....	71
1- Spécificité analytique	71
2- Etendue de mesure et linéarité	72
3- Répétabilité et fidélité intermédiaire	72
4- Contamination inter-échantillon.....	73
5- Rendement pré-analytique : extraction et dérivation.....	73
6- Effet de matrice et matrices acceptables	74
7- Exactitude.....	76
8- Evaluation de la robustesse	81
III. Détermination des valeurs de référence	84
IV. Performances du VHR et détermination d'un seuil décisionnel.....	86

DISCUSSION.....	87
CONCLUSION ET PERSPECTIVES.....	93
BIBLIOGRAPHIE.....	94

ABREVIATIONS

1 α ,25(OH)₂-D : 1 α ,25-dihydroxyvitamine D

24,25(OH)₂-D : 24,25-dihydroxyvitamine D

25(OH)-D : 25-hydroxyvitamine D

AAP : American Academy of Pediatrics

ADN : Acide Désoxyribonucléique

AGS : American Geriatrics Society

APCI : Atmospheric Pressure Chemical Ionization

AUC : Aire sous la courbe

BSA : Bovine Serum Albumin

CaT1 : Calcium Transporter 1

CDC : Center for Disease Control and Prevention

CIQ : Contrôles Internes de Qualité

CLIA : ChimioLuminescence ImmunoAssay

CPP : Comité de Protection des Personnes

CV : Coefficient de Variation

DACH : Deutschland, Austria and Confoederatio Helvetica

DBP : Vitamin D Binding Protein

DEQAS : Vitamin D External Quality Assessment Scheme

DMEQ-TAD : 4-[2-(3,4-Dihydro-6,7-dimethoxy-4-methyl-3-oxo-2-quinoxalinyloxy)ethyl]-
1,2,4-triazoline-3,5-dione

ECaC : canal épithélial calcique

EEQ : Evaluations Externes de la Qualité

EI : Etalon Interne

ELISA : Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay

ESI : Electrospray Ionization

FDA : Food and Drug Administration

FGF23 : Fibroblast Growth Factor 23

HPLC : Chromatographie Liquide Haute performance

HSA : Human Serum Albumin

IIH : Hypercalcémie Idiopathique Infantile

IOF : International Osteoporosis Foundation

IOM : Institute of Medicine
ISO : International Organization for Standardization
LLE : Liquid-liquid Extraction
LLOQ : Lower Limit of Quantification
LOD : Limit of Detection
m/z : masse/charge
MBO-TAD : 4-(4-[6-Methoxy-2-benzoxazolyl]phényl-1,2,4-triazoline-3,5-dione)
MM : Masse Moléculaire
MRM : Multiple Reaction Monitoring
MS : Mass Spectrometry
MSS : Matrice Sérique Surchargée en analytes dérivés
MTBE : Méthyl Tert-Butyl Ether
NGS : Séquençage Nouvelle Génération
NIST : National Institute of Standards and Technology
NS : Différence Non Significative
OMIM : Online Mendelian Inheritance in Man
Pdia 3 : Protein disulfide isomerase family member 3
PBS : Phosphate Buffered Saline
PFP : PentaFluoroPhenyls
PTAD : 4-phenyl-1.2.4-triazoline-dione
PTH : Parathormone
PXR : Pregnane X Receptor
Q1 : 1^{er} quadripôle
Q2 : 2^{ème} quadripôle
Q3 : 3^{ème} quadripôle
RA : Rapport des Aires
RANK : Receptor Activator of Nuclear factor κ -B
RANKL : Receptor Activator of Nuclear factor κ -B Ligand
RCP : Résumé des Caractéristiques du Produit
RIA : Radio-ImmunoAssay
RMP : Reference Measurement Procedure
RP-HPLC : Chromatographie Liquide Haute performance en Phase inverse

RXR : Retinoïd X Receptor
S/N : Rapport signal de l'analyte/bruit de fond
SACN : Scientific Advisory Committee on Nutrition
SH-GTA : Santé Humaine - Guide Technique d'Accréditation
SLE : Solid phase-supported Liquid Extraction
SNP : Single Nucleotide Polymorphism
SPE : Solid-Phase Extraction
SRM : Standard Reference Material
SRS : Solvant de Reprise Surchargé en analytes
SRSD : Solvant de Reprise Surchargé en analytes dérivés
SSSR : Sérum Surchargé en analytes + Solvant de Reprise
TADs : 1,2,4-triazoline-3,5-dione
TNB : Table Nationale de codage de Biologie
Tr : Temps de rétention
UI : Unité Internationale
UVB : Ultra-Violet de type B
VA : Valeur Absolue
VDR : Vitamin D Receptor
VDRE : Eléments de Réponse à la Vitamine D
VHR : Vitamin D Hydroxylated metabolite Ratio
VR : Valeur Rendue
v:v : volume : volume

TABLE DES ILLUSTRATIONS

Figure 1 : Structure chimique des métabolites de la vitamine D.....	7
Figure 2 : Structures chimiques des composés D ₂ et D ₃	7
Figure 3 : Etapes du métabolisme de la vitamine D.....	8
Figure 4 : Régulation de deux enzymes principales du métabolisme de la vitamine D.....	11
Figure 5 : Seuils diagnostiques de carences en vitamine D	15
Figure 6 : Recommandations d'interprétation des concentrations sériques de 25(OH)-D.....	15
Figure 7 : Relation mortalité et concentrations sériques en 25(OH)-D	20
Figure 8 : Perte de stimulation de l'activité 24-hydroxylase par la 1,25(OH) ₂ -D ₃	22
Figure 9 : Exemples de mutations recensées du gène CYP24A1	24
Figure 10 : Corrélacion entre les concentrations sériques de 25(OH)-D ₃ et de 24,25(OH) ₂ -D ₃	26
Figure 11 : Corrélacion entre les concentrations sériques de 25(OH)-D ₃ et le VHR, chez des patients sains.....	27
Figure 12 : Corrélacion entre les concentrations sériques de 25(OH)-D et le VHR, chez des patients sains et mutés pour le CYP24A1	28
Figure 13 : Paramètres du métabolisme phosphocalcique et de la vitamine D en fonction des génotypes du CYP24A1	29
Figure 14 : Processus de l'analyse en spectrométrie de masse ESI+/MS/MS triple quadripôle en mode MRM.....	35
Figure 15 : Principe de l'ionisation par Electrospray en mode positif (ESI+)	36
Figure 16 : Le quadripôle, un sélecteur d'ions	37
Figure 17 : Principe de fonctionnement du mode MRM en spectrométrie de masse en tandem triple quadripôle.....	38
Figure 18 : Processus pré-analytique et analytique	40
Figure 19 : Structures chimiques des étalons internes utilisés.....	42
Figure 20 : Préparation des solutions pour la détermination de l'effet de matrice et du rendement d'extraction	46
Figure 21 : Principe général de la réaction de Diels-Alder.....	51
Figure 22 : Structures chimiques de trois réactifs de dérivation de type TADs disponibles sur le marché.....	51
Figure 23 : Réaction de Diels-Alder entre la 25(OH)-D ₃ et un réactif TAD.....	52
Figure 24 : Amélioration du profil de fragmentation grâce à la dérivation par un TAD	52

Figure 25 : Amélioration du signal par ajout de méthylamine dans les phases mobiles.....	53
Figure 26 : Evolution des poids moléculaires des dérivés de la 25(OH)-D ₃ au fur et à mesure des étapes pré-analytiques et analytiques	56
Figure 27 : Evolution des poids moléculaires des dérivés de la 24,25(OH) ₂ -D ₃ au fur et à mesure des étapes pré-analytiques et analytiques.	57
Figure 28 : Exemples de profils des ions retrouvés en Q1 et Q3 après dérivation et ajout de méthylamine	58
Figure 29 : Rendement d'extraction selon la technique employée.....	59
Figure 30 : Principe de fonctionnement d'une extraction Solide-Liquide (SPE).....	60
Figure 31 : Principe de fonctionnement d'une extraction SLE.....	61
Figure 32 : Processus pré-analytique et analytique, détails de l'extraction	62
Figure 33 : Processus pré-analytique et analytique, détails de la dérivation	64
Figure 34 : Processus pré-analytique et analytique, détails des paramètres HPLC.....	67
Figure 35 : Chromatogrammes types obtenus avec les paramètres pré-analytiques et analytiques optimisés.....	68
Figure 36 : Structures chimiques des isomères 6S et 6R issus de la dérivation de la 25(OH)-D ₃ par le PTAD.....	69
Figure 37 : Matrices acceptables avec dérogation	75
Figure 38 : Résultats d'EEQ pour la 25(OH)-D ₃ , en comparaison avec les valeurs cibles.	77
Figure 39 : Résultats d'EEQ pour la 24,25(OH)-D ₃ et le VHR, en comparaison avec les valeurs cibles.....	78
Figure 40 : Résultats des EEQ en comparaison avec le groupe de pairs.....	79
Figure 41 : Notes attribuées en fonction du z-score par rapport au groupe de pairs, pour le VHR	80
Figure 42 : Détermination du nombre maximal de cycles congélation/décongélation	82
Figure 43 : Evaluation de la nécessité d'une photoprotection	83
Figure 44 : Courbe ROC des 3 paramètres pour la détection d'un déficit inné en 24-hydroxylase	86

Tableau 1 : Principaux sites de stockage de la vitamine D.....	10
Tableau 2 : Principales étiologies des déficits clinico-biologiques en vitamine D.....	16
Tableau 3 : Statut vitaminique plasmatique en vitamine D dans la population française adulte	18
Tableau 4 : Profils biochimiques attendus en fonction du contexte clinique.....	30
Tableau 5 : Liste des transitions suivies et optimisées pour chaque composé	54
Tableau 6 : Paramètres optimisés pour l'analyse en MS/MS de chaque composé.....	55
Tableau 7 : Nature des solvants de phases mobiles aqueuses et organiques testées	66
Tableau 8 : Concentrations en analytes d'intérêt, en nmol/L, des calibrants constituant la gamme d'étalonnage	70
Tableau 9 : Limites de détection et de quantification des analytes 25(OH)-D ₃ et 24,25(OH) ₂ -D ₃	72
Tableau 10 : Répétabilité et fidélité intermédiaire.....	73
Tableau 11 : Estimation du rendement d'extraction	73
Tableau 12 : Estimation de l'effet de matrice.....	75
Tableau 13 : Caractéristiques des patients déficitaires en CYP24A1.....	84
Tableau 14 : Valeurs des 3 paramètres déterminés chez les 13 patients déficitaires en CYP24A1	85
Tableau 15 : Valeurs de référence déterminées pour les 3 paramètres	85
Tableau 16 : Seul le VHR permet la mise en évidence d'un déficit en 24-hydroxylase.....	89
Tableau 17 : Comparaison des valeurs de référence avec les données de la littérature	89

INTRODUCTION

I. Définitions et structure chimique de la vitamine D

Le terme « Vitamine D » désigne un ensemble de composés liposolubles caractérisés par une structure dite sécostéroïde, parmi lesquels plus de 50 molécules ont été identifiées en tant que « métabolites de la vitamine D ». Sur la figure 1, on observe que la molécule b), métabolite de la vitamine D, est structurellement proche du squelette stéroïde quadricyclique du cholestérol, à la différence près que le cycle B est ouvert, constituant un système triène conjugué ¹.

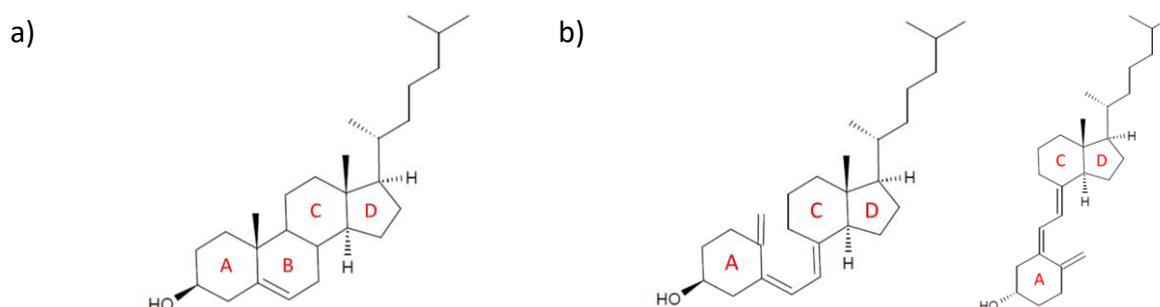


Figure 1 : Structure chimique des métabolites de la vitamine D
 Comparaison des structures chimiques a) du cholestérol (stéroïde) b) du cholécalciférol (sécostéroïde)
 Molécules construites avec le logiciel ChemsKetch 12.0 d'après les données Pubchem du NCBI

Les molécules appartenant à la famille des métabolites de la vitamine D peuvent être classées en deux catégories selon la présence ou non d'une double liaison entre les carbones 22 et 23 et d'un groupement méthyle sur le carbone 24 ^{1,2}. Les composés comportant ces caractéristiques sur leur chaîne latérale forment la catégorie des composés D₂. Dans le cas contraire, on parlera de vitamines D₃ (cf. figure 2).

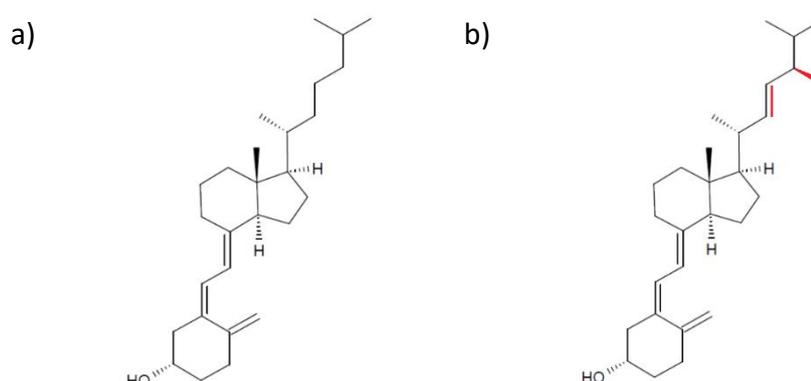


Figure 2 : Structures chimiques des composés D₂ et D₃
 Comparaison des structures chimiques a) du cholécalciférol (vitamine D₃) b) de l'ergocalciférol (vitamine D₂)
 Molécules construites avec le logiciel ChemsKetch 12.0 d'après ²

II. Métabolisme de la vitamine D

1- Vue d'ensemble

La synthèse et le métabolisme de la vitamine D sont des processus complexes faisant intervenir des radiations UltraViolet de type B (UVB) et plusieurs cytochromes P450 à activité hydroxylase.

Un schéma récapitulatif de l'ensemble des étapes du métabolisme de la vitamine D est présenté sur la figure 3. Ces étapes seront détaillées dans les paragraphes suivants.

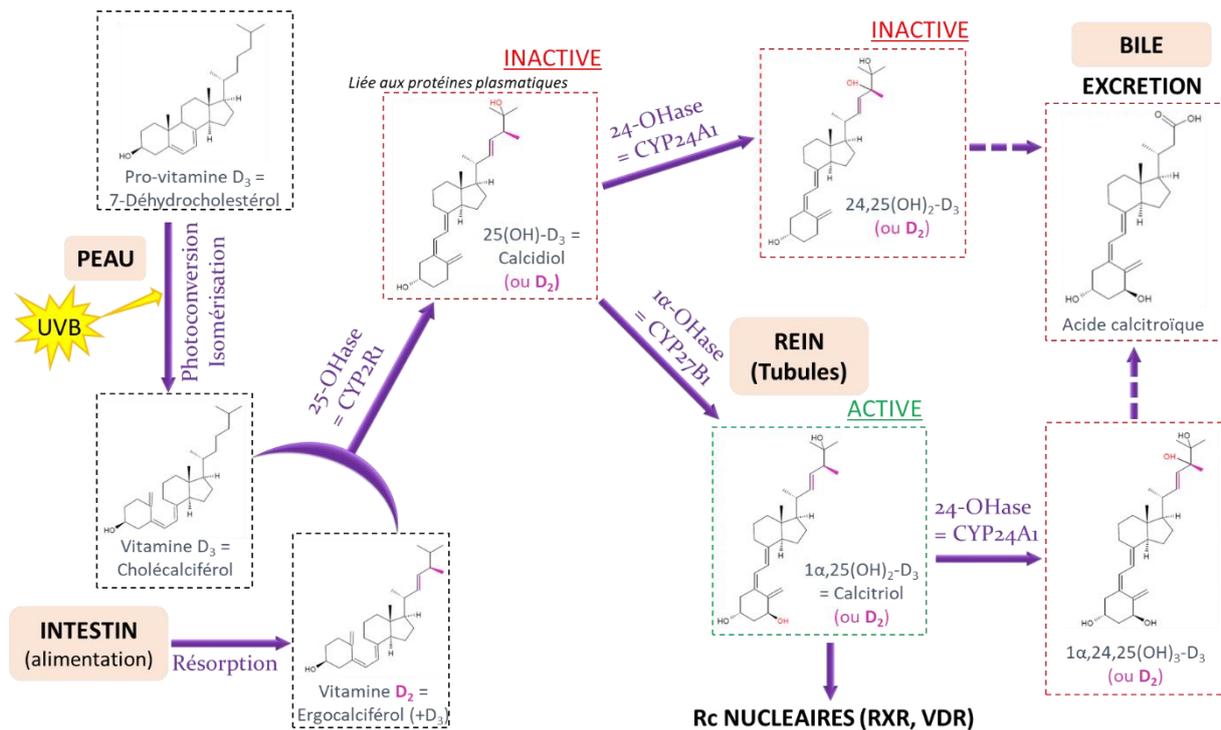


Figure 3 : Etapes du métabolisme de la vitamine D

De sa transformation en métabolite actif jusqu'à son catabolisme. Les groupements hydroxyles ajoutés à chaque étape d'hydroxylation sont mis en évidence sur ce schéma par une couleur rouge. Les groupements chimiques propres aux composés D₂ sont représentés en rose. D'après ^{1,2}.

2- Voies de synthèse

2-a) Synthèse cutanée de la vitamine D₃

La voie majeure d'anabolisme de la vitamine D chez l'humain est à l'origine de 50 à 90% de la production ³. Elle fait intervenir une photoconversion par des radiations UVB de longueur d'onde comprise entre 290 et 315nm à partir d'un intermédiaire de la synthèse du cholestérol, le 7-déhydrocholestérol ou pro-vitamine D₃ (cf. figure 3). Le cholestérol est essentiel au maintien de la fonction de barrière de protection du système tégumentaire.

La peau constitue donc un réservoir important de 7-déhydrocholestérol, notamment dans les couches basales et épineuses de l'épiderme.

Les radiations UVB vont briser la liaison entre les carbones 9 et 10 du 7-déhydrocholestérol, formant alors la pré-vitamine D₃. Celle-ci est une structure sécostéroïde instable maintenue en conformation (s-cis, s-cis) grâce aux interactions avec la bicouche lipidique de la membrane cellulaire.

Cette conformation facilite l'isomérisation par rotation autour de la liaison entre les carbones 5 et 6 en un composé thermodynamiquement stable, la vitamine D₃ ou cholécalciférol (cf. figure 3).

Ses interactions avec la membrane cellulaire se rompent alors, permettant son relargage dans l'espace interstitiel. La présence de protéines de liaison de la vitamine D (telle que la Vitamin D Binding Protein, ou DBP) dans les capillaires dermiques permet de maintenir en permanence un gradient de concentration en vitamine D libre en faveur du passage vers la circulation sanguine ¹.

2-b) Sources alimentaires de vitamine D₂ et D₃

Le cholécalciférol est plus minoritairement issu d'une résorption intestinale à partir de l'alimentation, plus particulièrement si elle est constituée de poissons gras (saumons, sardines, harengs, maquereaux), d'huile de foie de poisson ou de jaunes d'œufs ². Ces apports alimentaires ne représentent que 10-20% des apports en vitamine D₃ dans les populations occidentales ¹.

Cette absorption intestinale est en revanche la principale source d'ergocalciférol, ou vitamine D₂, plutôt présente dans les végétaux (céréales) et les champignons exposés aux UV, chez lesquels le précurseur photoconverti est l'ergostérol et non le 7-déhydrocholestérol ^{4,5} (cf. figure 3).

Les composés D₂ et D₃ peuvent également être administrés dans le cadre de suppléments vitaminiques ou d'aliments enrichis, dont nous discuterons les caractéristiques et indications ultérieurement ¹.

Une fois absorbée dans la partie proximale de l'intestin grêle, la vitamine D est incorporée dans les chylomicrons afin d'être acheminée vers le foie ou stockée dans les adipocytes ².

3- Voies d'activation

L'ergocalciférol et le cholécalciférol sont sujets à deux hydroxylations successives aboutissant à la forme principale de réserve puis à un métabolite physiologiquement actif. La vitamine D₃ ne présentant qu'une demi-vie de 36-48h, on peut en déduire que sa conversion en d'autres composés est très rapide ⁶.

3-a) Hydroxylation en position 25

La première hydroxylation a lieu au niveau du carbone 25 de la vitamine D₂ ou D₃ et est principalement catalysée par une enzyme microsomale ubiquitaire mais à expression majoritairement hépatique appartenant à la famille des cytochromes P450, le CYP2R1 (cf. figure 3). D'autres cytochromes P450 tels que le CYP27A1 ou le CYP3A4 (plutôt hépatiques et intestinaux) ou encore le CYP2J2 (hépatique, cardiaque, placentaire, cérébral) peuvent également catalyser cette réaction, dans une moindre mesure puisqu'ils sont moins affins et spécifiques que le CYP2R1 ⁷.

Cette hydroxylation aboutit à la formation de composés 25-hydroxylés appelés 25(OH)-Vitamine D₂ ou 25(OH)-Vitamine D₃ (=calcidiol), que l'on désignera par la suite respectivement par 25(OH)-D₂ et 25(OH)-D₃ (cf. figure 3). Les formes 25(OH)-Vitamine D, que l'on appellera 25(OH)-D, sont inactives et présentes dans la circulation générale sous forme liée aux protéines plasmatiques à 88%, et notamment à la DBP. Elles sont considérées comme des formes de réserve de vitamine D, avec des demi-vies d'entre deux et trois semaines ⁵. Le stockage sous forme de 25(OH)-D et de vitamine D se fait principalement dans les adipocytes et les cellules musculaires ² (cf. tableau 1).

	Vitamine D (UI)	25(OH)D (UI)	Total (UI)
Tissu adipeux	6960	1763	8723
Muscle	1527	1055	2581
Foie	168	214	382
Sérum	271	1559	1830
Autre	571	578	1149
Total	9496	5169	14 665

Tableau 1 : Principaux sites de stockage de la vitamine D.
Issu de ².

3-b) Hydroxylation rénale en position 1 α

L'étape suivante consiste en une hydroxylation de la 25(OH)-D en position 1 α , médiée par une seule enzyme, le CYP27B1⁷. La 25(OH)-D transportée sous forme complexée avec sa protéine de transport DBP est endocytée, après filtration glomérulaire, par la mégaline dans les tubes contournés proximaux où se tient la synthèse mitochondriale de CYP27B1. Ceci aboutit à la formation de métabolites actifs, appelés 1 α -25(OH)₂-Vitamine D₂ ou D₃ (=calcitriol), dont la demi-vie est proche de 4 heures^{2,5} (cf. figure 3).

L'expression du CYP27B1 est étroitement régulée par des paramètres du métabolisme phosphocalcique, par modulation directe de la méthylation du promoteur du gène CYP27B1⁷. La parathormone (PTH) a une action stimulatrice tandis que la concentration circulante de 1 α -25(OH)₂-D est inhibitrice. Il semble que la calcémie et le Fibroblast Growth Factor 23 (FGF23) osseux aient une action inhibitrice de l'activité enzymatique (cf. figure 4)^{2,4}.

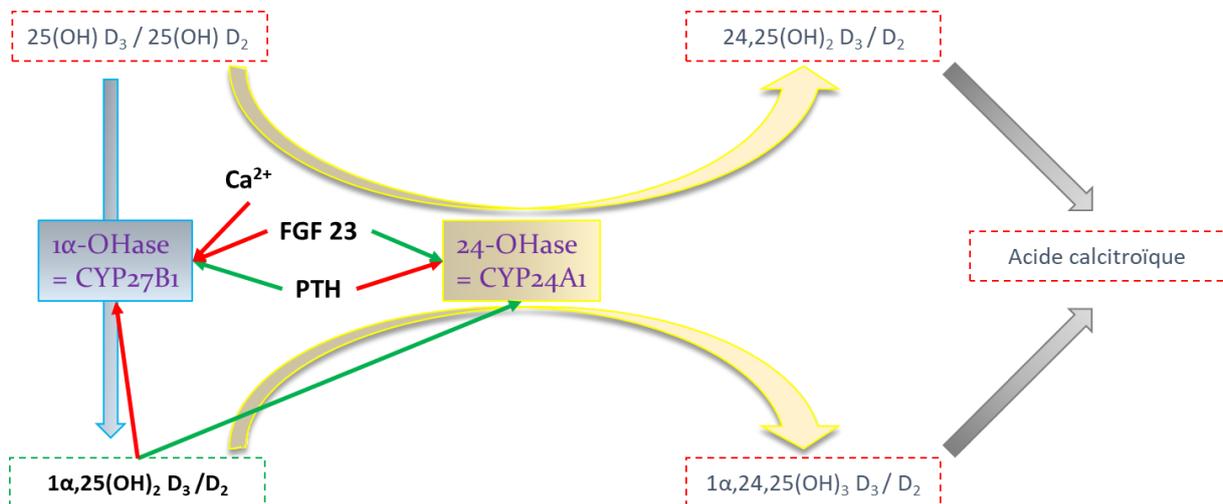


Figure 4 : Régulation de deux enzymes principales du métabolisme de la vitamine D

Les flèches rouges et vertes indiquent respectivement une régulation négative et positive de l'expression ou de l'activité enzymatique. Les métabolites encadrés en rouge sont inactifs tandis que celui encadré en vert constitue la forme active. D'après^{2,4,7}.

Il est admis que cette hydroxylation peut aussi survenir en situation extra-rénale, notamment par des cellules ostéoblastiques, placentaires, prostatiques, kératinocytaires, macrophagiques, lymphocytaires T, épithéliales (colon), pancréatiques, surrénales, cérébrales mais aussi cancéreuses. Néanmoins, l'action de ces composés d'origine extra-rénale est principalement autocrine ou paracrine et ils ne contribuent que peu à l'augmentation de concentration des formes circulantes, excepté en cas d'élévation pathologique de l'activité 1 α -hydroxylase (granulomatose de type sarcoïdose par exemple)^{1,7}. Il semble par ailleurs que cette synthèse extra-rénale ne subisse pas de régulation par la PTH ou la calcémie, mais plutôt par l'environnement cellulaire local^{2,7}.

Les composés 1α -25(OH)₂-D agissent par une réponse génomique sur des récepteurs nucléaires (cf. figure 3). Après liaison cytoplasmique au Vitamin D Receptor (VDR), exprimé par la plupart des cellules, ils sont transloqués dans le noyau et s'associent au Retinoïd X Receptor (RXR). Le complexe VDR-RXR- 1α -25(OH)₂-D se lie à l'ADN sur des sites nommés Eléments de Réponse à la Vitamine D (VDRE)^{2,7}. Par ailleurs, l'existence d'une réponse immédiate suggère une action sur un récepteur membranaire putatif, tel que la protein disulfide isomerase family member 3 (pdia3) qui participe notamment au captage rapide du calcium par les entérocytes^{2,6}.

4- Voies de dégradation

Le catabolisme de la vitamine D fait intervenir des mécanismes semblables à ceux de sa synthèse.

Un excès d'exposition aux UV entraîne une photodégradation de la pré-vitamine D₃, conduisant à des photoproduits de dégradation tels que le lumistérol₃ et le tachystérol₃ tandis que la vitamine D₃ est inactivée en 5,6-trans-vitamine D₃ et en suprastérol 1 ou 2¹. Ce mécanisme permet d'éviter l'obtention d'une trop grande quantité de cholécalférol, et donc de 25(OH)-D puisque l'activité des CYP450 catalysant l'hydroxylation en position 25 est peu régulée².

La voie principale de catabolisme de la vitamine D fait intervenir un autre cytochrome P450 exprimé dans la majorité des tissus de l'organisme, le CYP24A1^{7,8}. Son activité consiste majoritairement en une hydroxylation sur le carbone 24 des métabolites de la vitamine D. Selon le substrat de la réaction, on obtient préférentiellement un composé $1\alpha,24,25(\text{OH})_3$ -D ou un composé $24,25(\text{OH})_2$ -D (cf. figure 3). Par la suite, une succession de réactions de type oxydations, conjugaisons et clivages aboutit à la formation d'acide calcitroïque, représentant la forme d'excrétion biliaire majoritaire des métabolites de la vitamine D^{1,6,7,9} (cf. figure 3).

Le CYP24A1 étant exprimé dans quasiment toutes les cellules cibles de la vitamine D à des taux basaux faibles, il peut réguler la concentration en métabolites actifs de tout l'organisme puisque son expression y est rapidement induite par la $1,25(\text{OH})_2$ -D elle-même^{4,5,7,8,10}. Sa transcription au niveau rénal est également induite par le FGF-23 et inhibée par la PTH⁸ (cf. figure 4).

D'autres voies mineures de catabolisme impliquant le CYP24A1 existent, dans la mesure où il peut catalyser une hydroxylation en position 23 par exemple, initiant une voie distincte aboutissant à la formation de 1,25(OH)₂-Vitamine D-26,23-lactone⁷ qui semble être un antagoniste du VDR¹¹. Il peut aussi être responsable d'hydroxylation des composés D₂ en positions 24, 26 ou 28, ou encore d'un clivage de la liaison existant entre les carbones 24 et 25 de la chaîne latérale¹.

III. Implications physiopathologiques de la vitamine D

1- Action sur le métabolisme phosphocalcique

La vitamine D est principalement connue pour son implication dans le métabolisme phosphocalcique, dont elle est l'un des mécanismes de régulation majeurs. Elle influe sur la transcription de gènes cibles et agit à trois niveaux principaux, le tout résultant en un effet hypercalcémiant et hyperphosphorémiant¹.

La première zone d'action est intestinale, où la 1,25(OH)₂-D accroît la résorption du calcium alimentaire par augmentation de synthèse de transporteur de calcium (tel que le Calcium Transporter 1 CaT1). Elle augmente également la synthèse de la calbindine, favorisant le passage du calcium contre un gradient de concentration vers le milieu plasmatique, ce qui entraîne une diffusion passive des phosphates⁵. En présence de vitamine D, les taux d'absorption de calcium et phosphore alimentaires passent respectivement de 10-15% à 30-40% et de 60% à 80%⁴.

A l'étage osseux, la 1,25(OH)₂-D favorise la résorption en promouvant la différenciation et l'activation ostéoclastiques. Elle est reconnue par le VDR des ostéoblastes, causant une augmentation de l'expression de RANKL (Receptor Activator of Nuclear factor κ-B Ligand). Ce ligand va alors stimuler son récepteur RANK (Receptor Activator of Nuclear factor κ-B) situés sur les pré-ostéoclastes, qui vont maturer vers le stade ostéoclastique⁴.

Enfin, au niveau rénal, elle agit directement sur le canal épithélial calcique (ECaC) afin d'amplifier la réabsorption tubulaire calcique. L'augmentation de la calcémie induite par la vitamine D diminue par rétrocontrôle la sécrétion de PTH par les parathyroïdes. Ceci entraîne un amenuisement de l'effet inhibiteur de la PTH sur la réabsorption rénale des phosphates, avec donc à nouveau un effet hyperphosphorémiant additionnel⁵.

2- Autres actions biologiques

Outre cette action sur le métabolisme phosphocalcique, la vitamine D semble présenter une implication beaucoup plus large en santé humaine, avec des effets bénéfiques au sein de divers systèmes. Si les mécanismes précis ne sont à ce jour pas tous éludés, de nombreuses études convergent vers ces conclusions. Il semble que la vitamine D puisse moduler l'expression de près de 5% de l'ensemble des gènes, avec une réponse directe par plus de 900 gènes ⁷.

Ses propriétés antibactériennes seraient liées à l'induction de la synthèse de la cathelicidine, peptide impliqué dans la destruction de multiples agents bactériens par l'immunité innée, dont *Mycobacterium tuberculosis* ⁴.

Ses effets immunomodulateurs semblent la conséquence d'une stimulation de la sécrétion de cytokines et d'immunoglobulines par les lymphocytes T et B activés ⁴, avec des répercussions cliniques constatées ¹²⁻¹⁴.

Une action antidiabétique par stimulation de la sécrétion d'insuline par les cellules β des ilots de Langerhans lui est attribuée ^{4,15,16}.

Son effet sur l'expression de gènes contrôlant la prolifération cellulaire, la différenciation, l'apoptose et l'angiogenèse ⁴ lui confèrent des propriétés antinéoplasiques^{17,18}.

Lui sont également prêtées des actions bénéfiques sur la fonction reproductive ¹⁹, les maladies neurodégénératives et neuroinflammatoires ²⁰ ou encore le système cardiovasculaire et musculosquelettique ²¹.

IV. Les carences en vitamine D

1- Définitions

Biologiquement, on parlera de déficit en vitamine D lorsque la 25(OH)-D, métabolite considéré comme reflet de la réserve à disposition et donc du statut vitaminique D, présente des concentrations sériques diminuées.

Nous exprimerons dans la suite de ce travail les concentrations en 25(OH)-D en nmol/L : les équivalences en ng/mL sont représentées dans la figure 5.

Ces dernières sont jugées suffisantes lorsqu'elles sont supérieures à 62-75 nmol/L ^{22,23}, voire même à 125 nmol/L selon d'autres sources ³. La définition des autres statuts vitaminiques est représentée en figure 5.

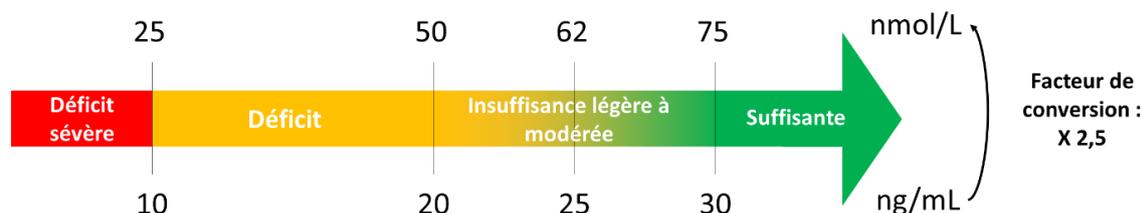


Figure 5 : Seuils diagnostiques de carences en vitamine D

Concentrations sériques en 25(OH)-D définissant les stades d'insuffisance, de déficit et de déficit sévère en vitamine D. On emploiera le terme d'« insuffisance légère à modérée en vitamine D » lorsque le taux de 25(OH)-D est inférieur à 62- 75 nmol/L, de « déficit » en vitamine D lorsqu'il est inférieur à 50 nmol/L, et de « déficit sévère » lorsqu'il est inférieur à 25 nmol/L. D'après ^{3,4,22}.

Cependant, ces seuils à partir desquels on définit un stade de déficit en vitamine D sont variables selon les sociétés savantes ; il en est de même pour les seuils d'intervention thérapeutique qui varient de 25-30 nmol/L jusqu'à 100 nmol/L ²⁴ (cf. figure 6). De surcroît, la détermination de ces valeurs-seuils a été définie au sein d'études s'appuyant sur des méthodes de dosages par Radio-Immuno Assays (RIA), qui ne présentent pas des corrélations parfaites avec les méthodes automatisées immunologiques actuellement majoritairement utilisées dans les laboratoires ¹.

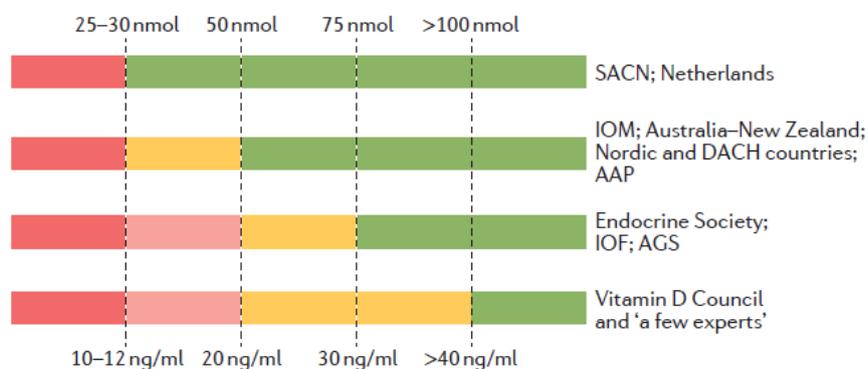


Figure 6 : Recommandations d'interprétation des concentrations sériques de 25(OH)-D

Rouge = carence sévère (danger, à corriger rapidement). Orange : déficience moyenne (intervention souhaitable). Vert : statut vitaminique suffisant.

AAP = American Academy of Pediatrics; AGS = American Geriatrics Society; DACH = Deutschland (Germany), Austria and Confoederatio Helvetica (Switzerland); IOF = International Osteoporosis Foundation; IOM = Institute of Medicine; SACN = Scientific Advisory Committee on Nutrition. Issu de ²⁴.

Au laboratoire de biochimie du CHU de Caen, le seuil à partir duquel on définit un état de carence est de 75 nmol/L. Il correspond à la concentration en 25(OH)-D « en deçà de laquelle des effets délétères sur la santé sont observés », notamment une hyperparathyroïdie secondaire (cf. Note de Cadrage émis par la Haute Autorité de Santé HAS en janvier 2013 « Utilité clinique du dosage de la vitamine D » ²⁵).

2- Etiologies

Les étiologies de carences en vitamine D découlent des différentes étapes de sa synthèse et de son métabolisme. Plusieurs causes environnementales et nutritionnelles peuvent être évoquées (cf. tableau 2).

Causes	Effets	
Personnes âgées, greffés cutanés (brûlures), affections cutanées	↓ de la concentration cutanée en 7-déhydrocholestérol ^{2,4}	Défaut de production cutanée de cholécalciférol
- Habitudes de vies et d'habillement : limitation de l'exposition solaire - Pigmentation, écrans solaires - Zone géographique de résidence (selon altitude, latitude et pollution atmosphérique)	Défaut d'exposition aux radiations UVB ^{2,4,22}	
Sources alimentaires restreintes, parfois difficilement accessibles	Malabsorption de la vitamine D	Insuffisance d'apport alimentaire de cholécalciférol et ergocalciférol ⁴
Certaines affections digestives (maladie cœliaque, maladie de Whipple, Crohn...)		
Dysfonction hépatique > 90%		↓ de la production de 25(OH)-D ⁴
Fin de grossesse, adolescence	Consommation de calcium et de vitamine D pour la croissance osseuse	↓ des stocks de 25(OH)-D
Régime hypocalcique	Stimulation de l'utilisation de la vitamine D	
Obésité	Séquestration de la vitamine D dans les adipocytes (stockage excessif)	↓ de la biodisponibilité de la vitamine D ⁴
Syndrome néphrotique	Fuite urinaire de 1,25(OH) ₂ -D et de DBP ²²	↓ des concentrations de 1,25(OH) ₂ -D ⁴
Insuffisance rénale chronique	- Hyperphosphatémie → stimulation du FGF-23 → inhibition du CYP27B1 - Incapacité du rein à produire suffisamment de 1,25(OH) ₂ -D	↓ de la synthèse de 1,25(OH) ₂ -D ⁴
	Mutations inactivatrices du CYP27B1	
Traitement par rifampicine, phénobarbital, carbamazépine	Stimulation de l'expression du CYP24A1 par un mécanisme Pregnane X Receptor (PXR)-dépendant ⁷	Induction du catabolisme de la vitamine D
Traitement par dexaméthasone, nifédipine, spironolactone, cotrimoxazole	Induction de l'expression du CYP24A1 ³	
Certaines néoplasies (sein, prostate...)	Surexpression du CYP24A1 ⁴	
Rachitisme pseudo-carentiel de type II	Mutations inactivatrices du VDR	Perte de sensibilité à la 1,25(OH) ₂ -D ⁴

Tableau 2 : Principales étiologies des déficits clinico-biologiques en vitamine D

Il est à noter que dans le cas des néoplasies entraînant une surexpression du *CYP24A1*, l'hypovitaminose D provoque une perte des propriétés antinéoplasiques locales potentielles de la vitamine D⁷, avec entretien du processus oncogène.

3- Conséquences

Les principaux signes cliniques d'un déficit en vitamine D sont une faiblesse et une fatigue générale avec dépression, des douleurs et fasciculations musculaires ainsi que des troubles osseux tels qu'une ostéoporose. On parlera chez l'adulte d'ostéomalacie et chez l'enfant de rachitisme. Ce dernier est aussi caractérisé par une irritabilité, une léthargie, un retard de développement staturo-pondéral et des fractures osseuses^{3,4}.

De par ses effets pléiotropes protecteurs (cf. paragraphe « INTRODUCTION III.2- Autres actions biologiques » page 14), on comprend qu'un déficit en vitamine D peut avoir des conséquences délétères globales et compromettre l'homéostasie générale. De nombreuses études tendent à le prouver et certaines relations de causes à effets sont connues depuis des dizaines d'années. Par exemple, l'étude de Melamed *et al.* de 2009 parmi une population d'adultes de plus de 20 ans d'origines ethniques variées montre une augmentation significative de 26% du taux de mortalité globale lorsque le taux de 25(OH)-D est inférieur à 44 nmol/L, indépendamment d'autres variables pouvant influencer sur le taux de mortalité²⁶. D'autres travaux abondent dans ce sens^{23,27}, avec un taux de 25(OH)-D considéré comme optimal quand supérieur à 75 nmol/L².

4- Intérêts de la supplémentation vitaminique

Certaines études montrent qu'une supplémentation en vitamine D est associée à une diminution du taux de mortalité toutes causes confondues²⁸. Outre les effets bénéfiques sur le métabolisme phosphocalcique, la supplémentation permet de recouvrer les effets positifs évoqués précédemment, notamment sur les fonctions endothéliales²⁹ ou certains cancers comme le cancer du sein³⁰, sans consensus néanmoins³¹.

Ces récentes études comparatives sont notamment permises par le fait que la majorité des pays a mis en place des protocoles de supplémentation en vitamine D pour leurs populations. En effet, le rachitisme infantile lié à un déficit en vitamine D était largement répandu au début du XX^{ème} siècle d'après des études autopsiques, et est encore endémique dans certaines régions telles que l'Asie ou les pays du Golfe ²⁴. De nos jours, on estime qu'environ 1 milliard de personnes présentent un déficit ou une insuffisance en vitamine D de par le monde ^{3,4}.

Une supplémentation maternelle durant le 3^{ème} trimestre de grossesse et la lactation est recommandée dans de nombreux pays dont la France ²⁴. À la naissance cependant, les taux de 25(OH)-D, estimés par un dosage sur sang de cordon, ne représentent qu'entre 50 et 60% des taux maternels, probablement de par une faible concentration en DBP dans le sang fœtal en comparaison du sang maternel. Le lait maternel ne constitue par la suite qu'un faible apport vitaminique, sauf en cas de supplémentation maternelle d'au moins 6 400 UI/jour, soit 16 fois la dose préconisée en France actuellement. Par conséquent, une supplémentation est recommandée de la naissance jusqu'au moment où l'exposition aux UV et l'apport alimentaire sont jugés adéquats pour conserver un statut vitaminique suffisant ²⁴.

En France malgré tout, une grande partie de la population adulte présente un statut vitaminique insuffisant (environ 80%) voire carenciel (entre 3,6 et 5,9%) (cf. tableau 3). Ceci est principalement dû au mode de vie moderne limitant l'exposition solaire et donc la production cutanée, au faible apport alimentaire et aux capacités de stockage ne permettant pas de couvrir les besoins durant la période où la synthèse cutanée est considérée nulle (entre novembre et février en France métropolitaine). On estime en effet le stockage total à environ 15 000 UI (cf. tableau 1), alors que les besoins sont évalués à environ 600 UI/jour ².

25(OH)D	< 10 ng/ml (< 25 nmol/l)	< 20 ng/ml (< 50 nmol/l)	< 30 ng/ml (< 75 nmol/l)
Hommes	3,6 %	35,8 %	78,7 %
Femmes	5,9 %	49,0 %	81,4 %
18–29 ans	7,5 %	45,9 %	79,2 %
30–54 ans	5,2 %	41,4 %	79,1 %
55–74 ans	1,9 %	41,7 %	82,4 %

Tableau 3 : Statut vitaminique plasmatique en vitamine D dans la population française adulte
Pourcentage de la population française dont les concentrations plasmatiques en 25(OH)-D sont insuffisantes (<75 nmol/L), déficitaires (<50 nmol/L) ou sévèrement déficitaires (<25 nmol/L), selon les données de « l'Etude Nationale Nutrition Santé » menée entre 2006 et 2007 sur 3115 adultes de 18-74 ans. Issu de ².

5- Protocoles nationaux de supplémentation

Les protocoles de supplémentation mis en place dans certains pays présentent des différences importantes en termes de doses, de fréquences et d'indications. Pour les enfants de moins d'un an par exemple, les doses recommandées varient de 180 UI/jour au Japon jusque 800-1000 UI/jour en France, avec une dose médiane de 400 UI/jour. Les recommandations les plus récentes préconisent une augmentation des doses, quel que soit l'âge du patient, excepté en Corée ²⁴.

La France applique une politique unique de supplémentation consistant en deux doses annuelles de 80 000 à 100 000 UI, l'une en novembre et l'autre en février pour les enfants de 18 mois à 18 ans. Certains protocoles de supplémentation privilégient une prise quotidienne³. D'autres recommandations statuent sur le fait qu'une alimentation adéquate associée à une exposition solaire modérée suffit à maintenir un statut vitaminique satisfaisant chez l'adolescent et le grand enfant ²⁴.

La supplémentation vitaminique fait intervenir le plus souvent la vitamine D₃, qui semble présenter une efficacité supérieure à la vitamine D₂ ³.

V. Les hypervitaminoses D

1- Risques des hypervitaminoses D

S'il existe une limite inférieure à partir de laquelle la concentration en 25(OH)-D est jugée suffisante, il s'avère qu'une limite supérieure optimale existe également.

Melamed *et al.* ont mis en évidence une association de type « J-inversé » ou « en U » entre le taux de 25(OH)-D et le risque de mortalité toutes causes confondues, à partir des données de la cohorte américaine NHANES III de plus de 13 000 patients suivis pendant 9 ans²⁶. L'équipe de Sempos *et al.* en 2013 s'est appuyé sur cette même cohorte, suivie sur une période de 15 ans et a confirmé cette observation. L'association en U semble même s'intensifier avec la durée de suivi, et ce même en éliminant les données des patients décédés dans les 3 ans post-inclusion, probablement porteurs d'une pathologie pouvant biaiser l'observation ³² (cf. figure 7).

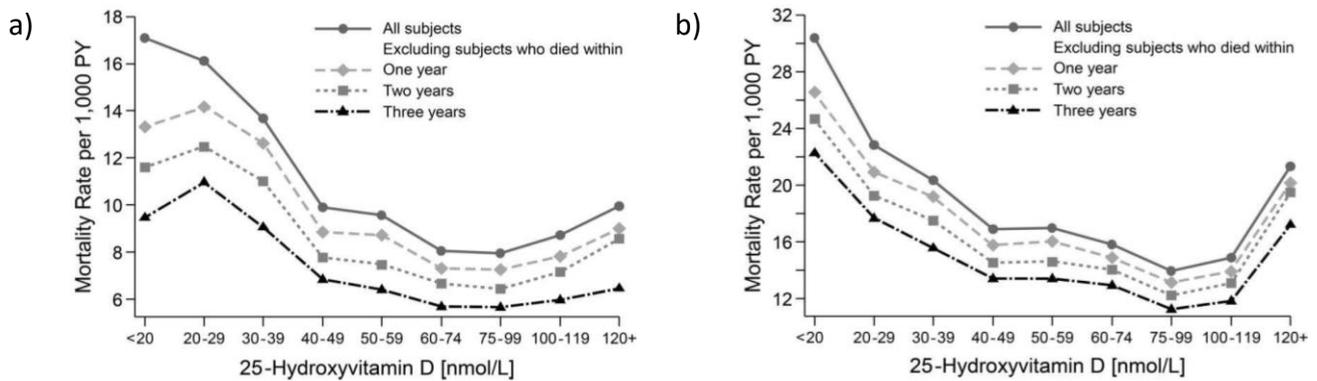


Figure 7 : Relation mortalité et concentrations sériques en 25(OH)-D

Taux de mortalité pour 1 000 habitants/an, ajusté selon l'âge, le sexe, l'ethnie et la saison en fonction des concentrations sériques en 25(OH)-D (en nmol/L) après suivi de la cohorte NHANES III (n=15 099) pendant a) 9 ans, jusqu'en 2000 b) 15 ans, jusqu'en 2006. Issu de ³².

Entre temps, une telle association a également été observée sur une vaste cohorte de 247 574 patients, aboutissant à la conclusion qu'une concentration de 25(OH)-D de 50 nmol/L, serait celle correspondant à un taux de mortalité le plus faible ³³. Ceci peut néanmoins paraître surprenant compte tenu de la concentration minimale de 75 nmol/L couramment utilisée pour considérer le statut vitaminique comme correct ³, avec un intervalle jugé optimal selon d'autres sources de 62-200 nmol/L ²². A partir de la cohorte NHANES III, les nadirs de mortalité toutes causes confondues se trouvent pour des concentrations en 25(OH)-D de 74-122 nmol/L et de 80 nmol/L, respectivement selon les études de Melamed *et al.* ²⁶ et de Sempos *et al.* ³².

2- Premiers cas d'hypersensibilité à la vitamine D : Hypercalcémie idiopathique infantile (IIH)

En 1952, Lightwood fait pour la première fois état du cas d'un enfant britannique de 8 mois hospitalisé pour suspicion d'acidose tubulaire rénale, maladie liée à une diminution de la capacité d'excrétion d'acides par les tubules rénaux. Il souffrait de perte d'appétit, de vomissements avec déshydratation, de constipation ainsi que d'une cassure de la courbe de croissance. Le pH urinaire étant bas, l'acidose rénale a été écartée. Evoquée par les signes cliniques, une hypercalcémie chronique a été mise en évidence, compliquée de néphrocalcinose visible à l'imagerie. Ce syndrome fut alors nommé provisoirement « Hypercalcémie idiopathique infantile » (IIH). Cet enfant avait reçu depuis l'âge d'un mois de vie une supplémentation en vitamine D à la dose élevée de 1 400 UI/jour, considérée comme « non toxique » ³⁴, mais égale à 3,5 fois la dose médiane recommandée pour cette tranche d'âge de nos jours (400 UI/L) ²⁴.

Concomitamment à une augmentation importante des doses recommandées pour la supplémentation en vitamine D au début des années 1950, une épidémie de plus de 200 cas d'IIH a été observée en Grande-Bretagne en l'espace de deux ans ^{35,36}. Dans le même temps, seuls 10 cas étaient déclarés aux USA, où les posologies administrées s'élevaient à environ 10-25% des doses anglaises ⁹. Ceci a conduit à des réflexions sur l'utilité et la sécurité de la supplémentation en vitamine D, allant jusqu'à des interdictions temporaires d'enrichissement de produits alimentaires dans certains pays ²⁴. Néanmoins, il était évident que cette supplémentation ne constituait pas le seul facteur déclenchant d'IIH, dans la mesure où la majorité des enfants britanniques recevant de telles doses n'étaient pas affectés. À partir de ce constat, l'hypothèse d'une hypersensibilité innée à la vitamine D a été émise.

3- Premières hypothèses d'un support génétique de l'IIH

Plusieurs études dans les années 1950-1960 ont suggéré une transmission génétique de certains syndromes d'IIH. Le cas d'une première famille parmi laquelle deux sœurs de 3 et 11 ans souffraient d'hypercalcémie idiopathique a été rapporté à la fin des années 1950. Il a été montré que leur mère, mais pas leur père, devenait également hypercalcémique en cas de faible supplémentation en vitamine D. Un défaut d'inactivation de la vitamine D avait alors été évoqué, avec une transmission sur un mode récessif ^{37,38}. En 1975, l'étude d'une agrégation familiale de 3 cas (un père, sa fille et son fils) a permis de suggérer une transmission plutôt autosomique dominante de l'IIH ³⁹.

Nguyen *et al.* ⁴⁰ ont recherché en 2010 des anomalies dans la régulation, le métabolisme ou la réponse à la vitamine D chez 20 enfants caucasiens atteints d'IIH. Pour tous les patients étudiés, la normalisation de la calcémie suite à un arrêt de la supplémentation vitaminique et à une réduction de l'exposition solaire abonde l'hypothèse d'un mécanisme vitamine D-dépendant. *A fortiori*, chez 10 de ces patients, le traitement par kétoconazole, inhibiteur entre autres de la 1 α -hydroxylase, accélère la normalisation de la calcémie, suggérant là encore l'implication de la vitamine D dans la physiopathologie de certains cas d'IIH.

Une culture de fibroblastes à partir d'une biopsie cutanée de l'un des patients a permis d'étudier la liaison du calcitriol au récepteur VDR, ainsi que l'activité 24-hydroxylase reflétant les premières étapes du catabolisme de la vitamine D active. Il n'a pas été mis en évidence d'hyperactivité du récepteur VDR par rapport à 7 témoins apparentés. En revanche, en comparaison aux fibroblastes témoins, il a été observé une absence d'augmentation de l'activité 24-hydroxylase en réponse à une exposition à la $1,25(\text{OH})_2\text{-D}$ (cf. figure 8). Devant des concentrations détectables de $24,25(\text{OH})_2\text{-D}$ chez ce patient, plusieurs hypothèses peuvent être émises⁴¹ : une activité 24-hydroxylase résiduelle du CYP24A1, une voie métabolique alternative ou une interférence analytique (déjà décrite dans la littérature avec le métabolite $25,26(\text{OH})_2\text{-D}$ par exemple⁴²).

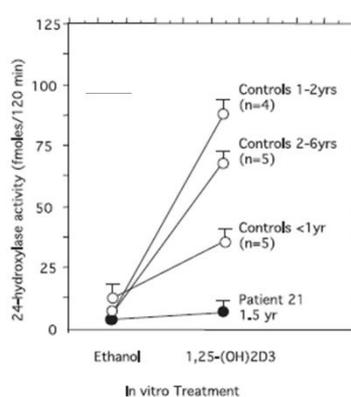


Figure 8 : Perte de stimulation de l'activité 24-hydroxylase par la $1,25(\text{OH})_2\text{-D}_3$

Activité 24-hydroxylase au sein de cultures de fibroblastes cutanés, chez un enfant souffrant d'IIH (patient 21) et chez 14 témoins apparentés sur l'âge, en l'absence ou en présence de 10 nmol/L de $1,25(\text{OH})_2\text{-D}_3$. Les valeurs représentées correspondent à la moyenne plus ou moins l'écart-type de culture en duplicat pour 4 à 5 témoins apparentés ou pour le patient 21. Issu de⁴⁰.

Des analyses moléculaires ont été pratiquées chez 17 de ces 20 patients hypercalcémiques étudiés : la fréquence de certains polymorphismes (Single Nucleotide Polymorphism ou SNP) a été comparée à une population de 207 patients sains. Aucune différence n'a été observée concernant les 5 SNP étudiés suivants : SNP C-1260A du promoteur du gène du *CYP27B1*, SNP A-1012G du promoteur du gène du *VDR*, SNP -369 du promoteur du gène du *CYP24A1*, SNP M239T dans l'exon 3 de *FGF23* et SNP F352V dans l'exon 2 de *Klotho*. En revanche, les deux SNP H589H et A749A dans l'exon 4 de *Klotho* étaient plus fréquents dans la population souffrant d'IIH⁴⁰. Si l'effet de ces SNP n'est pas connu précisément, on sait que la protéine Klotho est une protéine transmembranaire cofacteur du *FGF23*. Cette voie dite Klotho/*FGF23* est inhibitrice de l'expression du *CYP27B1* et activatrice de la transcription du gène *CYP24A1* au niveau rénal^{8,43}. Une altération de cette voie pourrait être une hypothèse de mécanisme à l'origine de certains syndromes d'IIH, par augmentation de la production et diminution de la clairance de la $1,25(\text{OH})_2\text{-D}$ active⁴⁰.

4- Découverte de mutations dans le gène *CYP24A1*

A la recherche d'autres mécanismes génétiques d'IIH, Schlingmann *et al.* ont procédé par une approche gène-candidat, en étudiant 4 gènes clés du métabolisme ou de la régulation de la vitamine D : *CYP27B1*, *FGF23*, *Klotho* et *CYP24A1*. Ces derniers ont été séquencés dans leur intégralité chez des patients appartenant à deux cohortes. La première cohorte rassemblait 6 cas d'IIH dont l'histoire familiale évoquait une transmission autosomique récessive, parmi lesquels 4 cas index et 2 cas apparentés. Cinq de ces 6 cas avaient reçu depuis leur naissance une supplémentation en vitamine D à la dose de 500 UI/jour, le dernier patient n'en ayant pas reçu par décision des parents devant les antécédents de son grand frère. La 2^{de} cohorte était composée de 4 cas d'IIH survenus dans les 3 semaines suivant une supplémentation en vitamine D sous forme de bolus de 600 000 UI en une prise. Aucune mutation pathologique n'a pu être mise en évidence pour les gènes *CYP27B1*, *FGF23* et *Klotho*. En revanche, des mutations faux-sens ou non-sens à l'état homozygote ou hétérozygote composite du *CYP24A1* ont été découvertes chez les 10 patients. L'impact des 6 mutations différentes a été étudié *in vitro*, par transfection puis étude de l'activité enzymatique en culture cellulaire. Chacune de ces mutations conduit *in vitro* à une perte de fonction totale ou quasi-totale de l'activité 24-hydroxylase du *CYP24A1* ⁹.

Depuis lors, de nombreux cas de patients présentant un phénotype typique d'IIH associé à des mutations du gène *CYP24A1* ont fait l'objet de publications ⁴⁴⁻⁵³.

En 2015, l'équipe du laboratoire de génétique du CHU de Caen a procédé au screening de mutations du gène *CYP24A1* chez 72 patients souffrant d'hypercalcémie supérieure à 2,6 mmol/L associée à un taux de PTH effondré (<20 pg/mL). Vingt de ces patients présentaient des mutations homozygotes ou hétérozygotes composites sur le gène *CYP24A1* ; 95% d'entre eux souffraient de néphrocalcinose ou de lithiase rénale associée. En revanche, les 5 patients hétérozygotes ne présentaient aucune atteinte rénale, corroborant l'hypothèse d'une transmission récessive émise par Schlingmann *et al.* ⁹. Parmi les 28 variants du *CYP24A1* mis en évidence au sein de cette cohorte, 15 constituaient de nouvelles mutations perte de fonction (d'après le programme de prédiction de pathogénicité utilisé). Pour 5 de ces nouvelles mutations, la caractérisation *in vitro* de l'effet a confirmé cette perte de fonction ⁵⁴ (cf. figure 9).

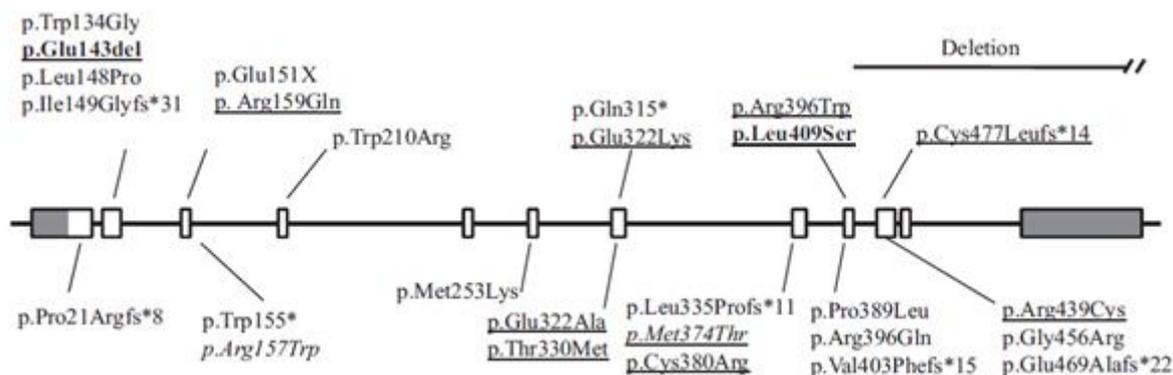


Figure 9 : Exemples de mutations recensées du gène CYP24A1

Représentation schématique du gène CYP24A1. Les exons sont représentés par des rectangles, dont les séquences codantes sont blanches et les séquences non transcrites en gris. Les introns sont représentés par les traits pleins entre les exons.

Dans la partie haute sont listées les douze mutations retrouvées dans la cohorte et déjà citées dans la littérature, avec en gras les deux mutations récurrentes. Dans la partie inférieure sont listées les quinze nouvelles mutations découvertes dans cette étude.

Les onze mutations dont les effets sont caractérisés *in vitro*, dans la littérature ou cette étude, sont soulignées. Les deux mutations en italique sont celles correspondant à des polymorphismes.

Issu de ⁵⁴.

A ce jour, plus de 1000 variants du gène CYP24A1 humain (n°OMIM 126065) ont été recensés, dont au moins 370 sont des mutations faux-sens et 61 sont des mutations perte de fonction. La plus fréquente des mutations faux-sens est le variant 20-52775532-A-G, majoritairement retrouvé chez les populations africaines et présentant une fréquence allélique de 0,8% (9% chez les populations africaines). La mutation perte de fonction la plus fréquente est le variant 20-52779402-C-CT, retrouvé exclusivement à ce jour dans les populations est-asiatiques à une fréquence allélique de 0,1% (source : données gnomad ⁵⁵).

5- Définition de l'IIH par mutation du CYP24A1

L'IIH (ou syndrome de Lightwood) rapportée à une mutation perte de fonction du gène CYP24A1 situé en position 20q13.2 est référencée sous le numéro OMIM 143880. Sa transmission est autosomique récessive et elle peut être diagnostiquée tant chez l'enfant que chez l'adulte. Elle est caractérisée par une diminution drastique de l'activité catabolique de l'enzyme CYP24A1, à l'origine d'une diminution de la clairance des métabolites actifs de la vitamine D tels que la 1,25(OH)₂-D. Elle se caractérise biologiquement par une hypercalcémie chronique symptomatique avec hypercalciurie et activité de la PTH effondrée. Cliniquement, les symptômes d'hypercalcémie dominant (vomissements, déshydratation, pics de fièvre, hypotonie et léthargie) et sont associés à une néphrocalcinose visible à l'imagerie (source : données omim.org, n° 143880).

La prise en charge immédiate consiste en l'arrêt de la supplémentation en vitamine D et calcium associé à une réhydratation. Un traitement médicamenteux peut être instauré et fait intervenir des glucocorticoïdes, des bisphosphonates, de la calcitonine, du furosémide ou encore du kétoconazole. Au long cours, elle passe par la mise en place d'un régime limitant les sources de vitamine D et calcium^{40,56}. Une limitation de l'exposition solaire est parfois recommandée^{9,40}.

VI. Mise au point d'un examen applicable en dépistage de l'IIH

1- Intérêts du dépistage de l'IIH

Le syndrome d'IIH dû à une mutation du *CYP24A1* est donc une pathologie potentiellement grave, notamment au niveau rénal et cardiaque de par l'effet direct de l'hypercalcémie, mais dont le traitement est simple et aisément applicable. Chez la femme enceinte atteinte d'IIH, une supplémentation vitaminique peut entraîner des retards de croissance intra-utérins et une prématurité⁵⁷.

L'éviction de toute supplémentation en vitamine D chez ces patients hypersensibles est donc prépondérante, à l'ère d'une instauration quasi systématique chez les nouveau-nés et femmes enceintes dans de nombreux pays²⁴.

2- Rationnel de la mise au point d'un examen de dépistage large

Le diagnostic de certitude passe par la mise en évidence d'une mutation du gène *CYP24A1* à l'état homozygote ou hétérozygote composite. Or, la recherche de mutations par technique de séquençage nouvelle génération (NGS) est longue et coûteuse, alors que la prescription de supplémentation vitaminique pour les nouveau-nés se fait souvent dès la naissance. Un dépistage génétique appliqué à l'ensemble de la population de nouveau-nés en France ne paraît donc pas raisonnable, d'autant qu'il s'agit d'une pathologie rare.

La mise au point d'un examen de biologie médicale simple, peu coûteux et rapide permettrait un dépistage plus large de cette affection, préliminaire à une étude moléculaire du gène *CYP24A1*.

3- Intérêts du dosage du métabolite 24,25(OH)₂-D₃

Le dosage du métabolite le plus abondant du CYP24A1, la 24,25(OH)₂-D₃, s'avère logiquement particulièrement intéressant dans l'estimation de l'activité 24-hydroxylase de cette enzyme, d'autant plus qu'il présente une demi-vie longue d'environ 7 jours ⁸.

L'étude princeps de Kaufmann *et al.* de 2014 a permis de mettre en évidence une corrélation entre les concentrations sériques de 25(OH)-D₃ et de 24,25(OH)₂-D₃ au sein d'une cohorte de femmes saines, avec un coefficient de corrélation r^2 de 0.80 (cf. figure 11). L'intersection de la courbe avec l'axe des abscisses suggère que pour des concentrations en 25(OH)-D₃ inférieures à 25 nmol/L, la concentration en 24,25(OH)₂-D₃ est nulle ⁴¹(cf. figure 11). Ceci met en évidence l'inhibition de l'expression du CYP24A1, et donc du catabolisme de la vitamine D, lorsque le statut vitaminique est sévèrement carenciel (cf. figure 4 page 11).

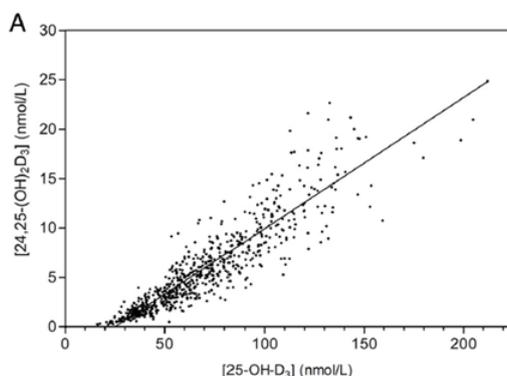


Figure 10 : Corrélation entre les concentrations sériques de 25(OH)-D₃ et de 24,25(OH)₂-D₃
Relation [25(OH)-D₃] et [24,25(OH)₂-D₃] au sein d'une cohorte de 694 patients sains. Les concentrations sont exprimées en nmol/L et déterminées par HPLC-MS/MS. Issu de ⁴¹.

Cette corrélation entre les concentrations sériques de 25(OH)-D₃ et de 24,25(OH)₂-D₃ a été démontrée par d'autres études ultérieures ^{1,6,8,10,42}. Devant une diminution des concentrations en 24,25(OH)₂-D₃, il est par conséquent indispensable d'estimer le statut vitaminique par le dosage de la 25(OH)-D₃ pour effectuer le diagnostic différentiel entre un déficit en 24-hydroxylase acquis (état carenciel) et inné (IIH par mutation du CYP24A1).

4- Vitamin D Hydroxylated metabolite Ratio (VHR) : Définition et intérêts

Il a été démontré que le ratio calculé $\frac{25(\text{OH})-D_3}{24,25(\text{OH})_2-D_3}$ présente lui aussi une forte corrélation avec la concentration en 25(OH)-D₃⁴¹. Ce ratio, que nous appellerons par la suite Vitamin D Hydroxylated metabolite Ratio ou VHR, représente le rapport entre le substrat et le produit de l'enzyme CYP24A1. Le calcul du VHR offre ainsi l'intérêt d'estimer l'activité 24-hydroxylase du CYP24A1. De manière logique, plus l'activité 24-hydroxylase augmente et plus ce rapport diminue, et inversement.

D'après la figure 11, un VHR supérieur à 20 au sein de la cohorte étudiée par Kaufmann *et al.* semble corrélé à un déficit en 25(OH)-D (concentration < 50nmol/L, cf. figure 5) et donc à une activité réduite voire nulle du CYP24A1 due à un état carenciel⁴¹.

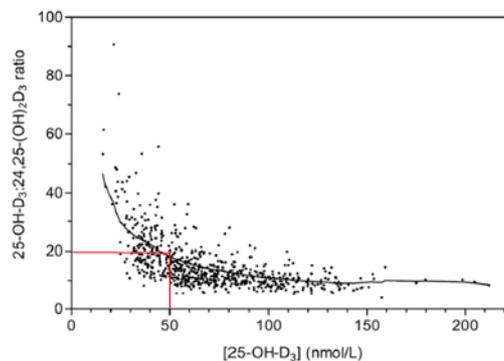


Figure 11 : Corrélation entre les concentrations sériques de 25(OH)-D₃ et le VHR, chez des patients sains
 Relation [25(OH)-D₃] et VHR au sein d'une cohorte de 694 patients sains. Les concentrations sont exprimées en nmol/L et déterminées par HPLC-MS/MS. Le trait rouge indique le VHR correspondant à un déficit en 25(OH)-D₃ ([25(OH)-D₃] < 50 nmol/L). Issu de⁴¹.

5- Utilité du VHR dans le dépistage de l'IIH

Pour évaluer la pertinence du VHR dans le dépistage de l'IIH due à une mutation perte de fonction du *CYP24A1*, il a été établi au sein de plusieurs cohortes de patients préalablement diagnostiqués par des analyses de biologie moléculaire.

Pour les deux patients étudiés par Kaufmann *et al.*, les VHR s'élevaient à 98,7 et 112,8 pour des concentrations respectives en 25(OH)-D₃ de 94,8 nmol/L et de 81,2 nmol/L. Ainsi, rapporté à la courbe de la figure 11, le VHR mettait bien en évidence la réduction d'activité de la 24-hydroxylase en dépit de statuts vitaminiques satisfaisants (cf. figure 5), due ici à des mutations perte de fonction dans le gène *CYP24A1* ⁴¹.

L'étude de Ketha *et al.* en 2016 a permis le calcul de valeurs de référence du VHR en considérant une cohorte de 91 patients sains. L'intervalle de référence obtenu est [7-35], avec ici encore une augmentation du VHR lorsque la concentration de 25(OH)-D₃ est sévèrement déficitaire (< 25 nmol/L) (cf. encart de la figure 12). De la même manière, les VHR des 12 patients présentant des mutations bialléliques du *CYP24A1* sont significativement plus élevés pour des statuts vitaminiques comparables ⁴² (cf. figure 12).

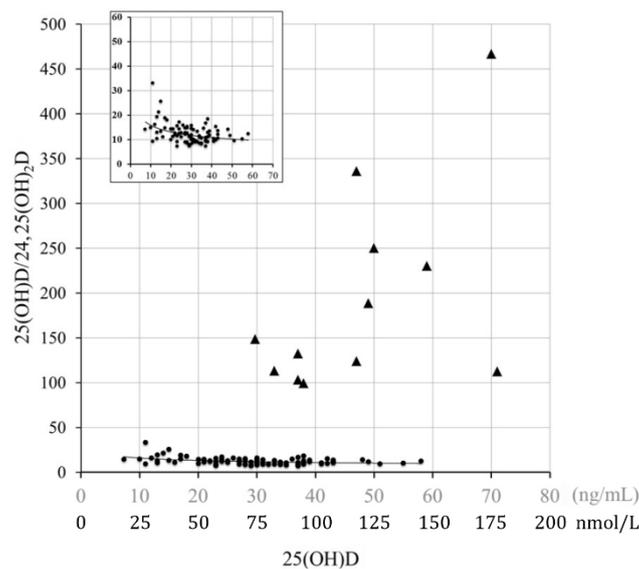


Figure 12 : Corrélation entre les concentrations sériques de 25(OH)-D et le VHR, chez des patients sains et mutés pour le *CYP24A1*

Association entre [25(OH)-D] et VHR chez des patients sains (●, n=91) et des patients avec des mutations bialléliques du *CYP24A1* (▲, n=12). L'encart montre plus précisément les données pour les patients sévèrement carencés ([25(OH)-D] < 60 ng/mL soit 24 nmol/L). Issu de ⁴².

Parmi les 72 patients hypercalcémiques de la cohorte étudiée par Molin *et al.*, le VHR établi par la méthode de dosage de Kaufmann *et al.* ⁴¹ permet là encore une discrimination sans équivoque des patients avec IIH due à des mutations bialléliques du *CYP24A1*, là où les autres paramètres du métabolisme phosphocalcique ou de la vitamine D ne le permettent pas (cf. figure 13, groupe B). Les patients hétérozygotes semblent présenter un VHR non significativement différent des patients au génotype sauvage, suggérant une activité normale du *CYP24A1* et abondant dans le sens du caractère récessif de l'anomalie ⁵⁴ (cf. figure 13, groupes C et D). Cette assertion est confirmée par l'étude familiale de Cools *et al.* au sein de laquelle 7 membres d'une même famille sont hétérozygotes et présentent des VHR non significativement différents de ceux des apparentés au phénotype sauvage ⁵⁶.

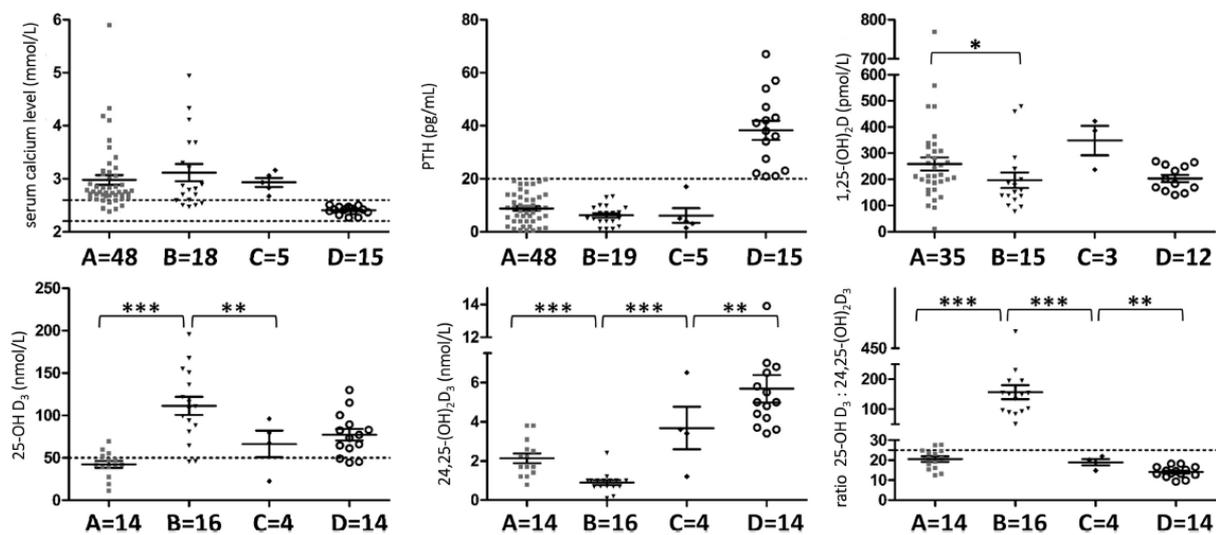


Figure 13 : Paramètres du métabolisme phosphocalcique et de la vitamine D en fonction des génotypes du *CYP24A1*

Le groupe A correspond à des génotypes sauvages ($n=47$), le groupe B à des génotypes mutés bialléliques ($n=20$), le groupe C à des génotypes mutés hétérozygotes ($n=5$) et le groupe D à des génotypes mutés hétérozygotes chez des patients asymptomatiques normocalcémiques apparentés à des patients des groupes B et C ($n=21$).

Les lignes pointillées indiquent les intervalles de référence ou les valeurs seuils décisionnelles.

Degré de significativité : * p -value $\leq 0,05$; ** p -value $\leq 0,01$; *** p -value $\leq 0,001$.

Issu de ⁵⁴.

6- Utilité du VHR dans le diagnostic différentiel des hypercalcémies

L'emploi du VHR ne semble pas mis en défaut par une hypervitaminose D due à une supplémentation excessive. En effet, sa valeur dans l'étude de Kaufmann *et al.* est restée comparable à celle des témoins, de par une production proportionnelle de 24,25(OH)₂-D₃ par le CYP24A1 fonctionnel. Il permet alors le diagnostic différentiel entre l'hypercalcémie due à une hypervitaminose D et celle due à un défaut d'activité du CYP24A1 ⁴¹.

In fine, le VHR permet de renforcer les arguments au cours du diagnostic différentiel des hypercalcémies et son augmentation drastique oriente vers une IIH avec mutation biallélique du *CYP24A1*. Il ne doit en revanche pas être interprété seul puisque son augmentation peut aussi signifier une diminution du catabolisme de la vitamine D dans un contexte carenciel ou d'insuffisance rénale, associé dans ce cas à une hypocalcémie avec hyperparathyroïdie secondaire ⁸ (cf. tableau 4).

Contexte/ Étiologie	Calcium	Phosphore	PTH	25(OH)-D	1,25(OH) ₂ -D	24,25(OH) ₂ -D	VHR
Mutation biallélique du <i>CYP24A1</i> (IIH)	↑↑	↑	↓↓	N ou très légèrement ↑	N ou très légèrement ↑	↓↓	↑↑
Hyperparathyroïdie	↑↑	↑	↑↑	↓	↓	↑	N
Sécrétion de PTHrp	↑↑	↑	↓	↓	↓	↑	N
Mobilisation osseuse du calcium (myélome multiple, métastases...)	↑↑	↑	↓	↓	↓	↑	N
Hypervitaminose D (supplémentation)	↑↑	↑	↓↓	↑↑	↑	↑↑	N
Lymphome ou sarcoïdose	↑↑	↑↑	↓↓	N*	↑↑	N ou ↑	N
Mutation hétérozygote du <i>CYP24A1</i>	N ou ±↑	N ou ±↑	N ou ± ↓	N*	N ou ±↑	N ou ±↓	N ou ±↑
Carence en vitamine D	↓	↓	↑	↓	↓	↓↓	↑↑
Insuffisance rénale	↓	↑	↑	N*	↓↓	↓↓	↑↑

Tableau 4 : Profils biochimiques attendus en fonction du contexte clinique

Evolution attendue des paramètres du métabolisme phosphocalcique, en comparaison à des valeurs obtenues chez des patients exempts de pathologies du métabolisme phosphocalcique.

D'après ^{8,41,42,54,56}.

*En l'absence d'autres causes de variation du statut vitaminique, cf. tableau 2 page 16.

En conclusion, le VHR apparaît comme un bon outil dans le screening de candidats à une exploration génétique du *CYP24A1* parmi des patients suspectés d'IIH. L'absence de détection des patients hétérozygotes asymptomatiques ⁵⁴ ne présente qu'un faible impact clinique, l'intérêt de leur dépistage étant surtout limité au conseil génétique familial ⁵⁶.

VII. Techniques de dosage des métabolites de la vitamine D développées

1- Indications du dosage des métabolites de la vitamine D

Comme nous l'avons évoqué précédemment, le métabolite 25(OH)-D, le plus abondant de l'organisme, constitue la forme de réserve de la vitamine D. De par sa demi-vie longue de 2-3 semaines et l'existence de solides preuves d'association entre sa concentration et certaines complications cliniques, il constitue le paramètre de choix pour estimer le statut vitaminique^{1,3,22}. Son dosage ne doit néanmoins pas faire l'objet d'un screening général de la population mais doit cibler des patients à risque de rachitisme, d'ostéoporose, d'ostéomalacie, d'insuffisance rénale chronique, d'insuffisance hépatocellulaire, de syndromes de malabsorption, d'hyperparathyroïdie ou de granulomatoses. Son dosage chez des patients sous traitements susceptibles d'affecter le métabolisme de la vitamine D (antiépileptiques, antirétroviraux, antifongiques...) ou ayant des antécédents de fractures traumatiques ou spontanées peut également être justifié¹. En France, le dosage du métabolite 25(OH)-D est préconisé et pris en charge par l'assurance maladie dans seulement 6 contextes cliniques d'après la fiche de l'acte 1139 de la Table Nationale de codage de Biologie (TNB) :

- Suspicion de rachitisme
- Suspicion d'ostéomalacie
- Suivi ambulatoire de l'adulte transplanté rénal au-delà de trois mois après transplantation
- Avant et après chirurgie bariatrique
- Evaluation et prise en charge des personnes âgées sujettes aux chutes répétées
- Respect des résumés des caractéristiques du produit (RCP) des médicaments préconisant la réalisation de ce dosage

Le dosage du métabolite actif de la vitamine D, la $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{-D}$, dont la demi-vie est courte (4h), peut être réalisé dans certaines situations précises. Il peut être pertinent dans les contextes de désordres suspectés du métabolisme de la vitamine D ou du phosphore suivants : granulomatoses chroniques (sarcoïdose, lymphome...), insuffisance rénale chronique, tubulopathies héréditaires avec pertes urinaires de phosphates, ostéomalacie « oncogénique », ou encore rachitisme pseudo-carentiel de type I ou II¹ (cf. tableau 2 page 16).

Le dosage du métabolite 24,25(OH)₂-D₃ n'est actuellement disponible que dans quelques laboratoires de recherche, ce qui rend le ratio VHR difficilement utilisable en pratique clinique courante.

2- Techniques de dosage

Plusieurs méthodes de dosage ont été mises au point dont certaines sont utilisées en routine dans les laboratoires de Biologie médicale. Il peut s'agir de techniques basées sur des réactions immunologiques dont la détection fait intervenir des radiomarqueurs (Radio-ImmunoAssay RIA), des réactions chimioluminescentes (ChimioLuminescence ImmunoAssay CLIA) ou des réactions enzymatiques colorées (Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay ELISA). Des principes de séparation chromatographique (Chromatographie Liquide Haute performance HPLC par exemple) suivie d'une détection par spectrophotométrie UV-visible ou par spectrométrie de masse en tandem (MS/MS) ont aussi été développées^{1,58}.

Les méthodes RIA, historiquement plus anciennes, sont les moins fréquemment employées à l'heure actuelle (3 laboratoires sur 760 participants du programme d'Evaluation Externe de la Qualité EEQ nommé Vitamin D External Quality Assessment Scheme DEQAS en octobre 2018, soit 0,4%). La majorité des laboratoires pratiquent des techniques automatisées de type CLIA ou ELISA (600 participants sur 760, soit 78,9%), permettant une cadence d'analyses soutenue. Les techniques d'HPLC-UV et d'HPLC-MS/MS sont de plus en plus employées (respectivement 14 et 143 participants sur 760, soit 1,8% et 18,8% des laboratoires), de par des performances satisfaisantes et la possibilité de surpasser certaines difficultés rencontrées avec les autres méthodes.

3- Avantages des techniques de type HPLC-MS/MS

Malgré l'existence de nombreuses techniques de dosages des métabolites de la vitamine D, de nombreuses difficultés en freinent le progrès, conférant aux méthodes HPLC-MS/MS un net avantage.

Tout d'abord, le développement de techniques de spectrométrie de masse en phase gazeuse est entravé par la formation à haute température d'isomères pyro et ispyro de ces composés⁵⁹, ce qui écarte cette option.

Par ailleurs, les métabolites de la vitamine D sont fortement liés aux protéines plasmatiques avec des affinités variables selon la nature D₂ ou D₃ des composés, ce qui impose une étape préalable de libération des protéines plasmatiques. De par l'impossibilité d'employer des solvants organiques en technique immunologique automatisée, des agents alternatifs sont utilisés pour cette étape, et parfois insuffisants dans certains contextes cliniques¹. En cas de grossesse ou de thérapie par œstrogènes par exemple, la concentration circulante en DBP est significativement plus élevée. Il a été montré une diminution des concentrations mesurées en 25(OH)-D par certaines techniques immunologiques à mesure de l'augmentation des concentrations en DBP, en comparaison avec des dosages par HPLC-MS/MS. Ceci suppose une dissociation incomplète entre la 25(OH)-D et la DBP. Dans un contexte d'insuffisance rénale avec hémodialyse, une différence significative entre les dosages immunologiques et HPLC-MS/MS a également été observée, en relation avec la concentration en 25(OH)-D. L'absence de différence significative des concentrations en DBP chez ces patients par rapport aux patients sains fait évoquer une autre interférence dans la mesure immunologique, avec l'urée par exemple qui pourrait perturber l'action des agents dissociateurs ou même l'affinité de la 25(OH)-D pour sa protéine DBP⁶⁰. Dans la mesure où les solvants organiques peuvent être employés en HPLC-MS/MS, de telles difficultés de dissociation protéique ne sont pas rencontrées.

Les méthodes employées doivent présenter une sensibilité suffisante pour quantifier des analytes présents à des concentrations circulantes très faibles, de l'ordre de 50 nmol/L pour la 25(OH)-D et de quelques dizaines de pmol/L pour la 1 α ,25(OH)₂-D⁶. Ainsi, la chromatographie avec détection UV-visible ne permet pas d'obtenir des limites de détection satisfaisantes sans nécessiter de grands volumes d'échantillons, excepté pour la 25(OH)-D⁵⁹. Les méthodes HPLC-MS/MS présentent en revanche une sensibilité généralement satisfaisante, avec des possibilités de potentialisation de celles-ci que nous détaillerons plus tard dans cet exposé.

Le principal inconvénient des techniques immunologiques ou à détection UV-visible est le défaut de distinction des différents métabolites hydroxylés de la vitamine D entre eux et des métabolites D₂ et D₃^{6,10,59,61}. Au contraire, la technique d'HPLC-MS/MS permet l'analyse simultanée et très sensible de plusieurs composés chimiquement proches, rendant possible l'établissement d'un profil métabolique complet tout en limitant la prise d'essai d'échantillon^{6,59}.

Enfin, d'après l'analyse de résultats de programmes d'EEQ tels que DEQAS, les méthodes HPLC-MS/MS utilisant des calibrants standardisés fournis par le NIST (National Institute of Standards and Technology) présentent une variabilité inter-laboratoire plus faible que les techniques immunologiques. Elles constituent actuellement la méthode de référence pour le dosage de la 25(OH)-D ¹⁰.

VIII. Principe général des techniques d'HPLC-MS/MS

Nous avons donc opté dans ce travail pour une technique d'HPLC-MS/MS, correspondant à une séparation chromatographique des analytes par HPLC, suivi d'une détection par spectrométrie de masse en tandem.

1- Chromatographie Liquide Haute Performance HPLC

La 1^{ère} étape analytique consiste à séparer par HPLC les analytes souhaités de composés susceptibles d'interférer dans l'étape de détection ultérieure.

Les métabolites de la vitamine D que nous dosons étant apolaires, nous utilisons une technique d'HPLC en phase inversée, ou RP-HPLC (Reverse-Phase HPLC). Cette technique se base sur une rétention des composés par formation de liaisons labiles avec des résidus apolaires greffés sur une phase stationnaire. L'élution de la colonne se fait par une phase mobile polaire.

2- Spectrométrie de masse MS

2-a) Principe général

Le principe général de la spectrométrie de masse réside dans la séparation en phase gazeuse de molécules chargées (ions) en fonction de leur rapport masse/charge (m/z).

Tous les spectromètres de masse suivent un processus analytique en trois étapes successives, en rouge sur la figure 14 : l'ionisation dans la source, la séparation dans l'analyseur de masse et enfin la détection. Dans la mesure où les techniques existantes pour chacune de ces étapes sont multiples, nous aborderons uniquement le fonctionnement de celles appliquées dans ce travail.

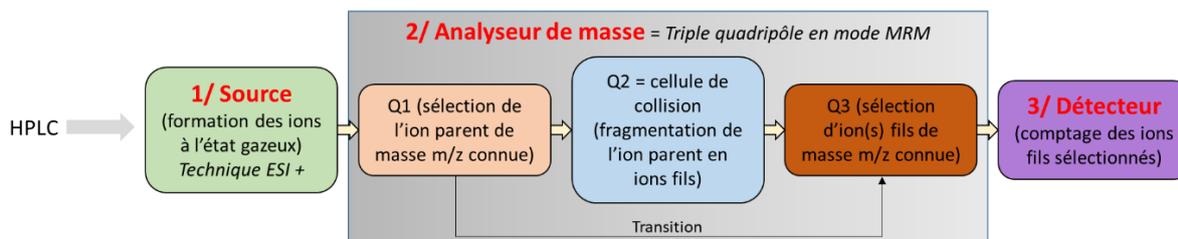


Figure 14 : Processus de l'analyse en spectrométrie de masse ESI+/MS/MS triple quadripôle en mode MRM. En rouge apparaissent les trois étapes communes à toutes les techniques de spectrométrie de masse. ESI : Electrospray Ionization ; MRM : Multiple Reaction Monitoring D'après ⁶².

2-b) Ionisation dans la source

La 1^{ère} étape consiste en la formation d'ions à l'état gazeux, par ionisation des analytes en milieu liquide dans la source du spectromètre de masse (cf. figure 14, étape 1/).

Nous employons une technique d'ionisation à pression atmosphérique, dite « douce » puisqu'elle permet d'obtenir des ions pseudo-moléculaires, c'est-à-dire peu fragmentés. Il s'agit d'une ionisation par électrospray (Electrospray Ionization ESI), paramétrée en mode positif. Elle permet de lier directement une analyse par spectrométrie de masse après une étape d'HPLC.

Un échantillon liquide contenant les analytes passe à travers un capillaire à un faible débit (0,1 à 3 $\mu\text{L}/\text{min}$) et atteint l'aiguille de nébulisation. À ce stade, le procédé consiste à appliquer un champ électrique (plusieurs milliers de volts) entre l'aiguille de nébulisation et le corps de la source afin de former des ions. L'accumulation de charges mobiles à la surface du liquide, conjuguée à l'application d'un gaz de nébulisation concentrique à l'effluent liquide (air ou azote, éventuellement chauffé entre 30 et 300°C) permet de libérer des gouttelettes. La tension de surface de ces gouttelettes leur fait prendre une forme de cône, appelée « cône de Taylor » (cf. figure 15, étape 1/).

Puis, un gaz de séchage perpendiculaire au spray entraîne une évaporation progressive des solvants : c'est l'étape de désolvatation (cf. figure 15, étape 2/). Dès que les répulsions coulombiennes entre les charges positives dépassent la tension de surface du liquide permettant la cohésion des gouttelettes (= limite de Rayleigh), ces dernières subissent une cascade de fissions.

Après évaporation totale du solvant, on obtient la désorption de molécules intactes multichargées et désolvatées, positives et négatives. Les ions d'une seule polarité (ici, positifs) sont extraits du spray par un champ électrique dirigé vers le spectromètre de masse. L'utilisation d'un gaz rideau permet d'éviter l'entrée de molécules neutres ou d'ions « parasites », mais aussi de fragmenter les clusters d'ions (ions polyatomiques) : c'est la déclusterisation (cf. figure 15, étape 3/).

Les molécules ionisées sont enfin focalisées pour leur acheminement vers l'analyseur de masse (cf. figure 15, étape 4/).

La valeur du potentiel électrique, le débit de l'échantillon liquide, la nature du solvant et la température des gaz doivent être optimisés en fonction des analytes à ioniser de manière à obtenir un fort rendement d'ionisation et une faible fragmentation moléculaire dans la source. Le but est d'éviter la modification des ions et complexes préformés en solution dans le capillaire ^{63,64} (cf. figure 15).

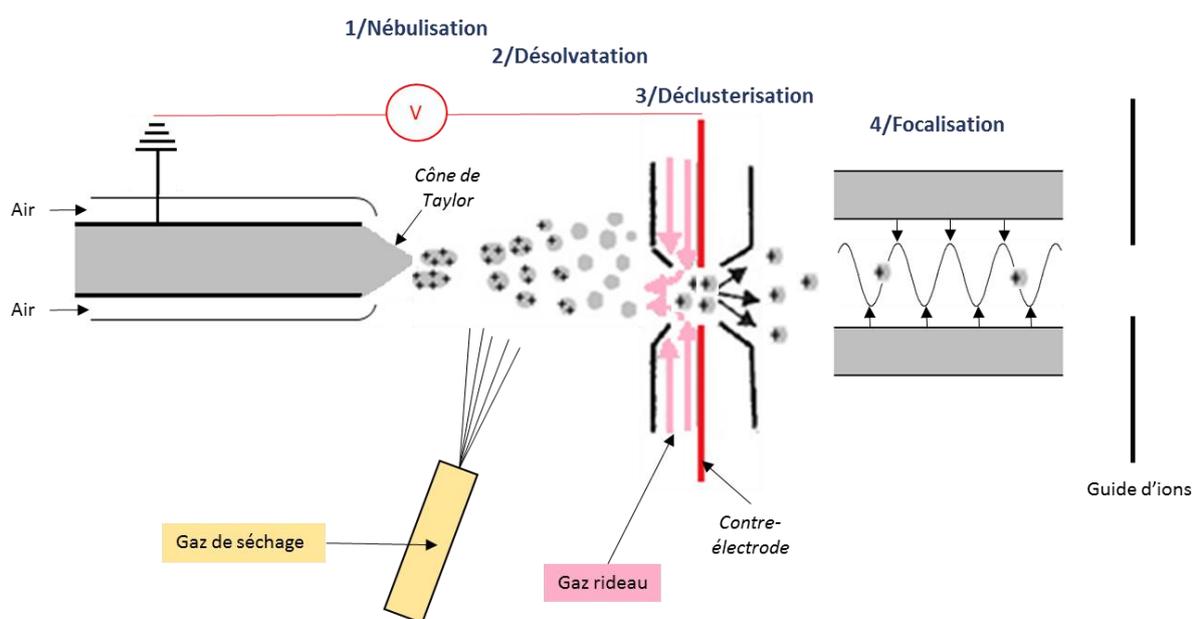


Figure 15 : Principe de l'ionisation par Electrospray en mode positif (ESI+)
 Etapes de l'ionisation des échantillons dans une source ESI+. D'après ^{63,64}.

2-c) Analyseur de masse triple quadripôle

L'étape suivante consiste en le passage des ions désolvatés au sein de l'analyseur de masse, composé d'une structure en triple quadripôle (cf. figure 14).

Un quadripôle est composé de quatre électrodes métalliques parallèles raccordées électriquement deux à deux (cf. figure 16 a). Une combinaison de voltage direct et alternatif est appliquée à chaque paire, l'un positif et l'autre négatif. Les ions pénétrant au sein du quadripôle vont osciller et leurs trajectoires seront plus ou moins stables en fonction des potentiels appliqués sur les électrodes. Ainsi, seuls les ions ayant une trajectoire stable seront sélectionnés et transmis à la sortie du quadripôle, tandis que les autres sortiront du quadripôle ou iront s'éliminer sur les électrodes. En appliquant des voltages optimisés pour stabiliser les trajectoires d'ions de rapport m/z choisi, un quadripôle peut en ce sens être considéré comme un sélecteur d'ions ⁶² (cf. figure 16 b).

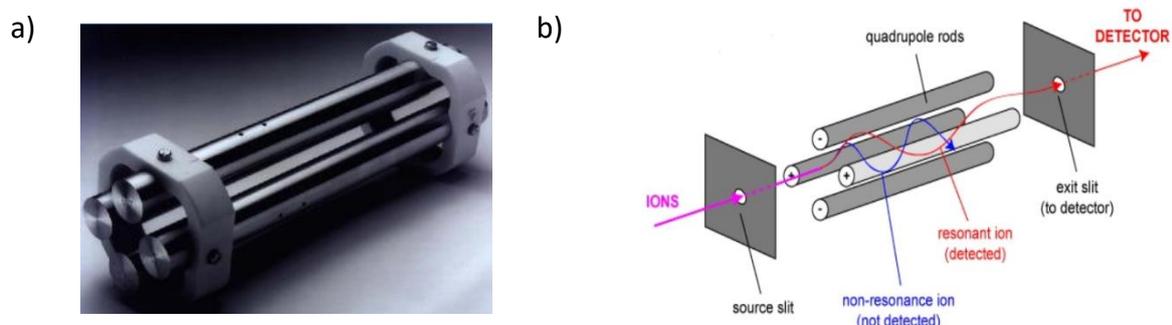


Figure 16 : Le quadripôle, un sélecteur d'ions

a) Structure d'un quadripôle b) Principe de fonctionnement d'un quadripôle. Issu de ⁶².

Plusieurs modes d'utilisation des quadripôles peuvent être envisagés et l'installation de trois quadripôles en linéaire permet une grande variété de possibilités. Nous avons opté dans ce travail pour le mode Multiple Reaction Monitoring (MRM), dont nous allons détailler le principe. Il s'agit d'une technique de spectrométrie de masse en tandem dans l'espace. Pour ce mode, seuls les quadripôles n°1 et n°3 sont utilisés en tant que sélecteur d'ions tel que nous l'avons décrit ci-avant, tandis que le 2nd quadripôle est une cellule de collision. Sous l'effet d'une source d'énergie et d'un gaz neutre (azote dans notre cas), les ions parents sélectionnés dans le 1^{er} quadripôle y sont accélérés et fragmentés par collisions en ions fils. Par la suite, le 3^{ème} quadripôle ne laisse passer vers le détecteur que les ions fils sélectionnés selon leur rapport m/z (cf. figures 14 et 17). Les couples ion parent/ion fils sélectionnés constituent ce que l'on appelle les « transitions ». Ces dernières sont partiellement spécifiques d'un composé puisque dépendantes de sa masse moléculaire initiale et de la manière dont il est fragmenté dans le 2nd quadripôle ⁶².

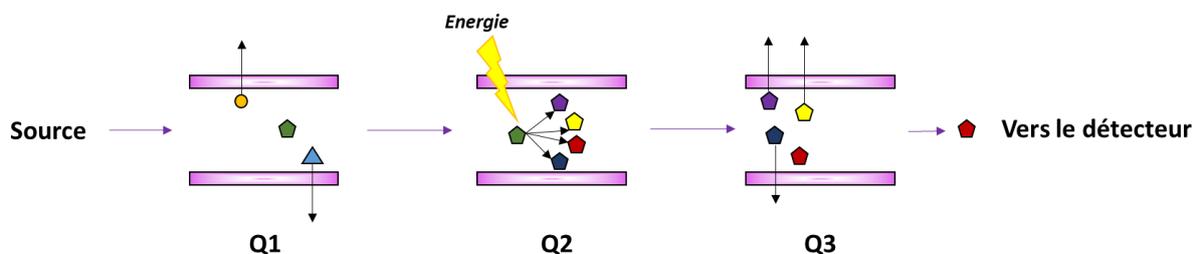


Figure 17 : Principe de fonctionnement du mode MRM en spectrométrie de masse en tandem triple quadripôle. Q1 : 1^{er} quadripôle, sélection de l'ion parent (ici ); Q2 : 2^{ème} quadripôle, fragmentation de l'ion parent  en ions fils ; Q3 : 3^{ème} quadripôle, sélection de l'ion fils à détecter (ici ) D'après ⁶⁵.

Au sein d'un quadripôle, le passage d'un voltage à l'autre est aisé et rapide. Il est donc possible de pulser les sélections d'ions et donc l'analyse de chaque transition, avec une séquence répétée toutes les x ms par exemple. Le mode MRM permet ainsi l'analyse simultanée de plusieurs composés au sein d'un unique passage d'échantillon, avec des chromatogrammes comprenant un nombre satisfaisant de données pour chaque composé, et une spécificité correcte.

Il est à noter que certains appareils comportent un système de trappe d'ions quadripolaire. Il s'agit d'un analyseur de masse en triple quadripôle fonctionnant de la même manière que précédemment décrit. La différence est que le 3^{ème} quadripôle, le filtre de masse des ions fils, fonctionne comme une trappe d'ions. Il agit par fermeture de son entrée et de sa sortie par des barrières magnétiques afin de confiner les ions sélectionnés au centre du quadripôle. Il s'ensuit donc une accumulation d'ions fils avec éjection séquentielle vers le détecteur, résultant en une augmentation du signal et donc de la sensibilité ⁶⁴.

2-d) Détection

La dernière étape analytique comporte la détection des ions sélectionnés (cf. figure 14). Elle consiste en la conversion du courant ionique arrivant au détecteur à chaque temps t en courant électrique, afin de mesurer une intensité en coups/minute.

In fine, l'HPLC-MS/MS permet d'obtenir une grande spécificité pour les analytes, basée d'une part sur la séparation des interférences par HPLC et d'autre part sur les transitions optimisées en MS/MS.

OBJECTIFS DE CE TRAVAIL

Ce travail a consisté en la mise au point d'une méthode de dosage simultané de deux métabolites hydroxylés de la vitamine D, la 25(OH)-D₃ et la 24,25(OH)₂-D₃. Le rationnel de cette mise en place est l'intérêt grandissant du rapport VHR dans l'exploration d'anomalies du métabolisme de la vitamine D, alors même que le dosage de la 24,25(OH)₂-D₃ est peu effectué en pratique courante. La méthode mise au point est basée sur une technique d'HPLC-MS/MS, pour les raisons évoquées précédemment, et adaptée des données de la littérature^{6,8,10,41,42,59,61,66-69}.

Les performances de la méthode de dosage développée seront validées selon les règles définies dans la norme ISO 15189.

Pour les trois paramètres déterminés que sont les concentrations en 25(OH)-D₃ et en 24,25(OH)₂-D₃ et le VHR, nous avons établi des valeurs de référence propres à notre technique, parmi une cohorte de sujets sains et une cohorte de sujets avec mutations bialléliques du gène *CYP24A1*.

MATERIEL ET METHODES

I. Mise au point de la méthode de dosage

Sauf mention contraire, tous les réactifs utilisés proviennent de Sigma Aldrich.

1- Traitement pré-analytique

Après analyse des données de la littérature, nous avons mis au point un processus pré-analytique et analytique des échantillons sériques pour le dosage des métabolites de la vitamine D par HPLC-MS/MS. Celui-ci est succinctement décrit dans la figure 18. Le détail et l'optimisation de chacune de ces étapes seront présentés ultérieurement dans ce document.



Figure 18 : Processus pré-analytique et analytique

Les étapes pré-analytiques sont encadrées en gris clair tandis que les étapes analytiques sont représentées en gris foncé.

SLE : Solid phase-supported Liquid Extraction

L'isopropanol, le n-hexane, l'éthanol et l'heptane servant aux trois premières étapes de traitement de l'échantillon (cf. figure 18) sont fournis par VWR International SAS. Les solvants utilisés pour le traitement pré-analytique des échantillons ne sont pas nécessairement de grade HPLC.

L'extraction des analytes d'intérêt est faite au moyen de colonnes Isolute SLE® (Biotage®).

La dérivation chimique des analytes à doser fait intervenir une solution de PTAD (4-Phenyl-1,2,4-triazoline-dione) préparée extemporanément dans un mélange acétate d'éthyle/heptane en proportion 8/92 v:v (volume : volume).

Avant injection en HPLC, les extraits dérivés évaporés (à chaud sous courant d'azote) sont repris dans une solution de méthanol/eau 70/30 v:v, solvants de grade HPLC (Biosolve®). Une solution de méthylamine 40% est ajoutée à cette solution à une concentration de 50µL/L.

2- HPLC et Spectromètre de masse

Les phases mobiles employées pour l'étape de RP-HPLC sont également de grade HPLC (Biosolve®). La phase aqueuse A est composée exclusivement d'eau. La phase organique B est composée d'acétonitrile et de méthylamine 40% à une concentration de 120µL/L.

La chaîne HPLC employée est une chaîne Shimadzu® HPLC Prominence LC-20A, associée à un spectromètre de masse triple quadripôle Sciex® QTRAP 5500. La chaîne HPLC est pilotée par un logiciel embarqué LC Shimadzu® et l'ensemble peut également être géré par le logiciel Analyst® 1.6.2 (Sciex).

Les données brutes ont d'abord été analysées par le logiciel Analyst® 1.6.2 (Sciex) puis la quantification a été établie par le biais du logiciel MultiQuant® 3.0.2 (Sciex).

3- Calibrants

Les calibrants employés pour cette méthode sont préparés à partir de solutions pures éthanoliques de concentrations connues en 25(OH)-D₃ et 24,25(OH)₂-D₃, et conservés à -80°C. Ils sont obtenus par dilutions en cascade, d'abord dans l'éthanol absolu puis dans une matrice artificielle. Cette dernière est composée d'un mélange de 20% de sérum destéroïdé (Chromsystems®) et de 80% de tampon PBS (Phosphate Buffered Saline) contenant 0,1% de BSA (Bovine Serum Albumin, PAA Laboratories). La composition de la gamme de calibration est indiquée ultérieurement dans le paragraphe « RESULTATS I.7-Optimisation de la gamme d'étalonnage » page 69.

4- Etalons internes

Les étalons internes deutérés ont été synthétisés par le Dr Mourinho de l'Université de Saint Jacques de Compostelle (Espagne). Ils ne diffèrent des analytes à doser que par la présence de six deutériums sur les carbones 26 et 27 de leurs chaînes latérales, augmentant ainsi leurs masses molaires de 6 g/mol (cf. figure 19). Ils vont donc pouvoir être analysés en spectrométrie de masse, après les mêmes étapes de traitement pré-analytique et de séparation chromatographique que les composés non deutérés, de par des propriétés physico-chimiques très proches⁷⁰. Nous les appellerons ici d₆-25(OH)-D₃ et d₆-24,25(OH)₂-D₃.

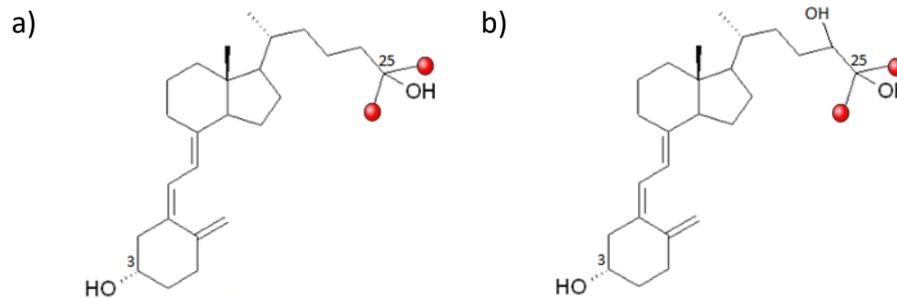


Figure 19 : Structures chimiques des étalons internes utilisés

a) d_6 -25(OH)-D₃ b) d_6 -24,25(OH)₂-D₃.

Les points rouges représentent chacun un carbone lié à 3 deutériums ²H, remplaçant 3 hydrogènes ¹H. D'après ⁴¹.

5- Contrôles internes de Qualité (CIQ)

Plusieurs Contrôles Internes de Qualité (CIQ) ont été utilisés afin de garantir la bonne réalisation de chaque série d'analyses et de valider la méthode mise au point.

Pour la validation de la méthode, des CIQ « maison », préparés à partir des solutions mères de composés purs de concentrations connues, ont été employés. Trois niveaux (niveau 1 = bas, 2 = moyen, 3 = haut) ont ainsi été inclus et analysés au début et en fin de chaque série d'analyses. Leurs concentrations, en nmol/L, sont respectivement de 5, 50 et 200 pour la 25OH-D₃ et de 0.5, 5 et 15 pour la 24,25(OH)₂-D₃. Les valeurs obtenues nous permettent d'accepter ou de rejeter l'ensemble de la série, nos critères d'acceptation nécessitant des valeurs de CIQ comprises dans un intervalle de 15% autour de leurs valeurs cibles (20% pour le CIQ niveau 1) (selon les critères de 2018 de la Food and Drug Administration FDA).

Des CIQ commerciaux, les 3 niveaux des Liquicheck TM Specialty Immunoassay control (BioRad®) sont utilisés pour la validation en routine des analyses. Les valeurs cibles et les limites acceptables pour la 25(OH)-D₃ ont été renseignées par le fournisseur sur la base de dosages effectués par technique d'HPLC-MS/MS.

II. Validation de la méthode analytique selon la norme ISO 15189

Les paramètres de la validation de méthode sont ceux décrits dans le référentiel SH-GTA 04 français (Santé Humaine – « Guide Technique d'Accréditation de vérification (portée A) / validation (portée B) des méthodes en Biologie Médicale »), se basant sur les spécifications de la norme internationale ISO 15189 : 2012. Les critères de conformité sont ceux de 2018 de la FDA.

1- Spécificité analytique

La spécificité analytique a été évaluée par la variabilité des temps de rétention (Tr) des analytes comparativement à leurs étalons internes deutérés correspondants. Elle a été calculée selon la formule $\text{Spécificité} = \frac{\text{Tr Etalon interne}}{\text{Tr analyte}}$.

2- Etendue de mesure et linéarité

La limite de détection (Limit of Detection LOD) et la limite de quantification (Lower Limit of Quantification LLOQ) ont été définies par un rapport $\frac{\text{Signal de l'analyte}}{\text{Bruit de fond}}$ (S/N) supérieur à 3 et à 10, respectivement. La limite de détection représente la plus faible concentration pour laquelle l'analyte est détecté dans l'échantillon. Par analogie, la limite de quantification correspond à la plus faible concentration pour laquelle une valeur quantitative peut être fournie. Nous avons ainsi dosé la 25(OH)-D₃ et la 24,25(OH)₂-D₃ au sein de six échantillons dits « blancs ». Ces derniers sont constitués de sérum déstéroïdé (dépourvu de métabolite de la vitamine D) auxquels on ajoute les étalons internes dans un but de quantification. Nous avons calculé l'écart-type de ces 6 mesures, désigné par « s_B », et calculé les limites de détection et de quantification selon les formules suivantes : LLOQ = 10 x s_B et LOD = 3 x s_B (source : SH-GTA 04).

La linéarité a été vérifiée en utilisant notre courbe de calibration en 4 points. Elle était jugée acceptable lorsque le coefficient de corrélation (r) calculé selon la méthode des moindres carrés basé sur les ratios $\frac{\text{Aire du pic de l'analyte}}{\text{Aire du pic de l'étalon interne}}$ était supérieur à 0,99.

La limite supérieure de linéarité a été déterminée en comparant les résultats obtenus pour des sérums très concentrés (en nmol/L, 300, 400 et 500 pour la 25(OH)-D₃ et 30, 40 et 50 pour la 24,25(OH)₂-D₃) soit purs, soit après dilution au demi par du sérum destéroïdé.

3- Répétabilité et fidélité intermédiaire

La répétabilité et la fidélité intermédiaire ont été déterminées pour les CIQ « maison » de niveau bas, moyen et haut dont les concentrations sont renseignées dans le paragraphe « MATERIEL ET METHODES I.5-Contrôles internes de Qualité (CIQ) » page 42.

Chaque niveau de CIQ a été analysé 10 à 16 fois et le coefficient de variation (CV) a été calculé selon la formule $CV (\%) = \frac{\text{Moyenne}}{\text{Ecart-type standard}}$. Pour la répétabilité, les CIQ ont été analysés le même jour et durant la même série, tandis que pour la fidélité intermédiaire, chaque niveau de CIQ a été analysé par différents opérateurs dans des séries différentes sur une période de deux mois.

4- Contamination inter-échantillon

La contamination inter-échantillon a été évaluée au moyen des CIQ de niveau haut et bas. Les deux métabolites de la vitamine D ont été dosés en triplicat pour le CIQ de niveau haut (valeurs H1, H2 et H3, de moyenne mH), puis en triplicat pour le CIQ de niveau bas (valeurs B1, B2 et B3), cette séquence analytique ayant été répétée 4 fois au total. La contamination a été évaluée selon la formule suivante :

$$\text{Contamination (\%)} = 100 \times \frac{(\text{Moyenne des 4 valeurs B1}) - (\text{Moyenne des 4 valeurs B3})}{(\text{moyenne des 4 moyennes mH}) - (\text{Moyenne des 4 valeurs B3})}$$

5- Rendement pré-analytique et effet de matrice

Nous avons estimé le rendement d'extraction, le rendement de dérivation et l'effet de matrice en comparant des dosages dans 4 conditions distinctes (cf. figure 20). Pour chaque condition, nous avons opté pour deux concentrations différentes pour chacun des deux analytes, l'une proche de la LLOQ (5 et 0,5 nmol/L respectivement pour la 25OH-D₃ et 24,25(OH)₂-D₃) et la seconde proche de la limite supérieure de linéarité (400 et 40 nmol/L respectivement pour la 25OH-D₃ et 24,25(OH)₂-D₃).

- Condition A : « Solvant de Reprise Surchargé en analytes » (SRS, cf. figure 20 partie A)
 - Evaporation (sous courant d'azote) des analytes purs en solution éthanolique
 - Remise en solution dans le « solvant de reprise » (méthanol 70% additionné de 50µL/L de méthylamine 40%)
- Condition B : « Solvant de Reprise Surchargé en analytes dérivés » (SRSD, cf. figure 20 partie B).
 - Dérivation puis évaporation (sous courant d'azote) des analytes purs
 - Remise en solution dans le « solvant de reprise »
- Condition C : « Matrice Sérique Surchargée en analytes dérivés » (MSS, cf. figure 20 partie C)
 - Extraction, dérivation puis évaporation (sous courant d'azote) du sérum destéroïdé (dépourvu d'analyte d'intérêt)
 - Remise en solution dans le solvant SRSD de la condition B, contenant les analytes dérivés (cf. figure 20 partie B).
- Condition D : « Sérum Surchargé en analytes + Solvant de Reprise » (SSSR, cf. figure 20 partie D)
 - Surcharge de sérum destéroïdé par des solutions d'analytes purs
 - Extraction, dérivation puis évaporation (sous courant d'azote) du sérum destéroïdé surchargé en analytes d'intérêt
 - Remise en solution dans le « solvant de reprise »

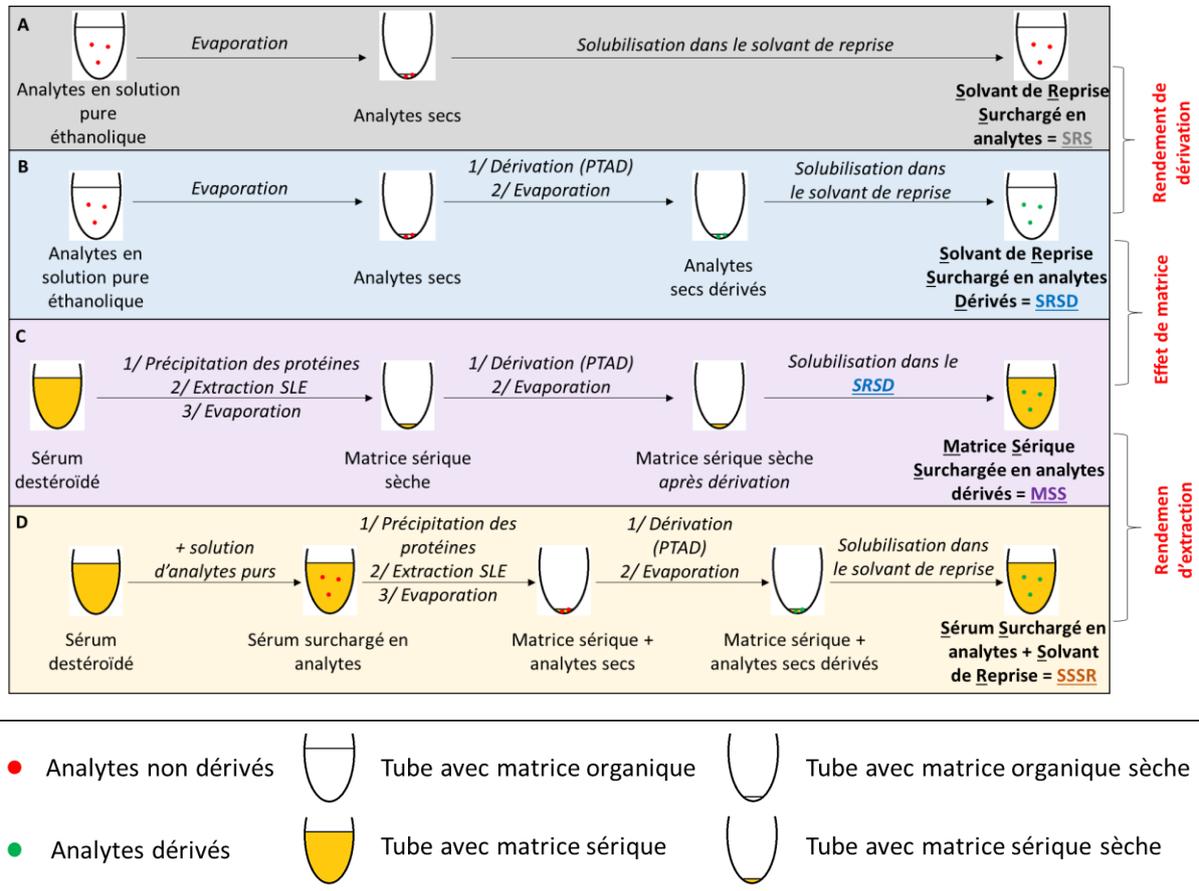


Figure 20 : Préparation des solutions pour la détermination de l'effet de matrice et du rendement d'extraction

Les solutions SRS et SRSD des conditions A et B de la figure 20 ne se distinguant que par la présence d'analytes dérivés ou non, le rendement de dérivation peut être estimé selon la formule suivante :

$$\text{Rendement de dérivation} = 100 \times \frac{\text{Concentration SRSD}}{\text{Concentration SRS}}$$

Les solutions SRSD et MSS des conditions B et C ne variant que par la nature de leur matrice (éthanolique ou sérique), nous avons pu estimer l'effet de matrice par la formule suivante :

$$\text{Effet matrice} = 100 \times \frac{\text{Concentration SRSD} - \text{Concentration MSS}}{\text{Concentration SRSD}}$$

Les solutions SSSR et MSS des conditions C et D ne variant que par le passage ou non des analytes par l'étape d'extraction, nous avons pu calculer le rendement d'extraction selon la formule suivante :

$$\text{Rendement d'extraction} = 100 \times \frac{\text{Concentration SSSR}}{\text{Concentration MSS}}$$

6- Exactitude

L'exactitude représente l'étroitesse de l'accord entre une valeur mesurée et une valeur vraie d'un mesurande (cf. SH-GTA 06 « Contrôle de qualité en Biologie médicale »). Elle a été évaluée à partir de janvier 2017 par l'analyse d'échantillons sériques provenant du programme d'EEQ DEQAS (4 séries de 5 échantillons sériques humains par an).

Créé en 1989, ce programme regroupe un grand nombre de laboratoires participants de par le monde, avec une moyenne de 797 participants entre avril 2017 et avril 2019. Il permet d'estimer l'exactitude des dosages de 25(OH)-D et de 1,25(OH)₂-D (totales, D₂ et D₃), puis, au fur et à mesure de l'évolution du programme, des dosages de la 3-épi-25(OH)-D₃ et de la 24,25(OH)₂-D₃. Dans ce but, des valeurs dites « cibles » sont établies par des centres de référence au moyen de méthodes de référence (HPLC-MS/MS dans le cadre des métabolites de la vitamine D). Des comparaisons entre laboratoires employant les mêmes techniques, constituant ce qu'on appelle des « groupes de pairs », sont également effectuées.

Le 5^{ème} échantillon de chaque session étant réservé à des fins de recherche, il est parfois surchargé en un ou plusieurs métabolites de la vitamine D ou dilué au moyen de sérums animaux⁷¹. Ainsi, nous ne présenterons dans ce travail que les résultats des 4 premiers échantillons de chaque session, permettant d'estimer l'exactitude de notre méthode.

7- Critères de validation de la méthode

Pour valider l'acceptabilité des performances de la méthode, le CV des différents paramètres de validation de méthode devaient être inférieurs à 15%, sauf pour les valeurs proches de la LLOQ pour laquelle le CV ne devait pas excéder 20% (critères de 2018 de la FDA).

8- Robustesse de la méthode

Nous avons exploré la robustesse de notre méthode, c'est-à-dire sa capacité à ne pas être affectée par des variations faibles, mais délibérées, des paramètres de la méthode. La robustesse permet de s'assurer de la fiabilité de la méthode dans les conditions normales d'utilisation (source : SH-GTA 04).

Nous avons ainsi déterminé l'influence de diverses matrices en comparant les résultats obtenus sur 6 échantillons sanguins recueillis sur trois types de tubes différents, et ce au cours de la même ponction. Nous avons employé des tubes secs avec ou sans gel séparateur afin d'obtenir des échantillons en matrices sériques et des tubes héparinés afin de recueillir des échantillons plasmatiques.

Nous avons également estimé l'influence de variations du pH de la phase mobile utilisée et déterminé la robustesse de notre méthode vis-à-vis de cycles répétés de congélation-décongélation des échantillons. Enfin, nous avons évalué la nécessité de protéger de la lumière les analytes photosensibles tout au long des étapes pré-analytiques et analytiques.

III. Détermination des valeurs de référence : cohorte de patients

Nous avons inclus dans cette étude 123 patients présentant une hypercalcémie chronique ($> 2,60$ mmol/L) associée à un taux de PTH effondré ($< 2,5$ mmol/L). Pour chacun d'eux, un consentement écrit signé par le patient et/ou ses parents autorisant la collecte de données clinico-biologiques et la conservation d'ADN dans un but de recherche et d'analyses génétiques a été obtenu (n° du Comité de Protection des Personnes CPP DC20162692).

Pour la détermination des concentrations en 25OH-D_3 et en $24,25(\text{OH})_2\text{-D}_3$ et du ratio VHR, les échantillons sanguins ont été recueillis sur tubes secs sans gel séparateur (BD Vacutainer® CAT) et centrifugés à 1900g pendant 11 minutes à température ambiante selon les procédures pré-analytiques en vigueur au laboratoire. Les sérums ont ensuite été aliquotés et conservés à -20°C avant analyse.

IV. Analyses moléculaires

L'ADN génomique des patients inclus a été extrait des leucocytes sanguins circulants par des techniques standardisées. Plusieurs couples d'amorces ont été conçus en vue de l'amplification des exons 1-11 du gène *CYP24A1*, ainsi que des jonctions intron/exon, comme précédemment décrit⁵³. Les produits de PCR ont été purifiés et séquencés par le CEQTMDCS Quick Start Kit (Beckman Coulter) sur un automate Beckman CoulterDNASequencer. Les nouvelles variations de séquence ont été recherchées sur la base de données dbSNP, et interprétées selon plusieurs programmes de prédiction de pathogénicité (PolyPhen-2, Align-GVGD, MutationTaster, SIFT) afin d'estimer l'impact délétère ou non de chaque variant. Les fréquences alléliques ont été évaluées par l'étude de la base de données Exome Variant Server établie chez des populations européennes, américaines et afro-américaines.

V. Analyses statistiques

Les analyses statistiques ont été effectuées en utilisant le logiciel GraphPad® 7. Les paramètres de la validation de méthode ont été évalués par le logiciel Plever® (Viskali ACC). Les différences ont été jugées statistiquement significatives lorsque *p-value* < 0,05.

Les valeurs de référence pour les trois paramètres déterminés (25OH-D₃, 24,25(OH)₂-D₃ et VHR) ont été établies en déterminant par une analyse non paramétrique les 2,5^{ème} et 97,5^{ème} percentiles de chacune des deux cohortes suivantes :

- Cohorte « IIH », constituée de patients présentant des mutations perte de fonction bialléliques du *CYP24A1* (homozygotes ou hétérozygotes composites)
- Cohorte « non IIH », constituée de patients présentant un génotype sauvage ou hétérozygote pour le *CYP24A1*

RESULTATS

I. Etapes de la mise au point de la méthode analytique

Il existe plusieurs freins au développement de techniques de dosage par HPLC-MS/MS des métabolites de la vitamine D, inhérents aux propriétés des analytes à doser. Nous présenterons ici les principales difficultés rencontrées et les solutions apportées étape par étape, inspirées des données de la littérature et des essais conduits au laboratoire.

Pour des raisons de lisibilité et de compréhension, les étapes de mise au point de la méthode seront exposées selon un ordre chronologique et non selon l'ordre du processus analytique.

1- Optimisation de l'ionisation dans la source

Le développement de méthodes d'HPLC-MS/MS pour le dosage des métabolites de la vitamine D est compliqué par une faible capacité d'ionisation des composés, que ce soit par des sources ESI ou APCI (Atmospheric Pressure Chemical Ionization) ⁶. Certaines équipes sont cependant parvenues à mettre au point des méthodes offrant une ionisation directe satisfaisante de ces métabolites ^{66,72}.

Nous avons commencé par évaluer si nos équipements permettaient d'obtenir une sensibilité suffisante pour la détection des métabolites de la vitamine D choisis, en injectant dans le spectromètre de masse, sans séparation chromatographique préalable, les solutions pures éthanoliques de 25(OH)-D₃ et 24,25(OH)-D₃. Le mode d'ionisation choisi est l'ESI au vu des données de la littérature ^{6,8,10,41,42,59,61,67,69,73}. Connaissant les masses molaires de ces analytes, nous avons paramétré la sélection des ions parents dans le 1^{er} quadripôle et avons observé par balayage des ions fragments (mode Product Ion Scan) l'ensemble des ions parvenant au 3^{ème} quadripôle Q3. Les ions fragments repérés en Q3 présentaient des rapports m/z rapportés dans la littérature ^{66,72}, confirmant la détection de nos composés.

Néanmoins, les solutions infusées étaient de concentrations bien supérieures aux concentrations sériques humaines habituelles et se trouvaient au sein d'une matrice éthanolique réduisant fortement le bruit de fond. La faible intensité du signal observée malgré ces conditions favorables confirme un défaut d'ionisation dans notre source, d'autant que nous avons pour objectif de mettre en évidence de très faibles concentrations en 24,25(OH)-D₃ chez des patients déficients en CYP24A1.

La faible ionisation des métabolites de la vitamine D est liée à leur structure chimique, et notamment à la labilité de la structure triène conjuguée ainsi qu'à l'absence de groupement chimique polaire aisément ionisable ⁶ (cf. figure 1). L'ajout de tels groupements par réaction chimique apparaît alors comme une solution envisageable. Ce procédé, appelé « dérivation chimique », est permis par l'existence de la structure triène conjuguée très réactive au sein de nos analytes. Elle constitue en effet une cible spécifique des réactions de Diels-Alder, qui consistent en une addition d'un diénophile sur un système diène conjugué et aboutissent à la formation de systèmes cycliques à une double liaison (figure 21).

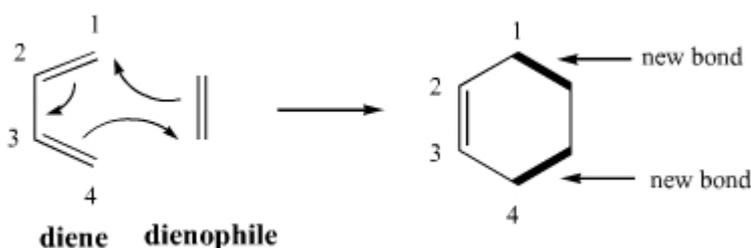


Figure 21 : Principe général de la réaction de Diels-Alder
Issu de ⁷⁴.

Dans la littérature, la dérivation des métabolites de la vitamine D est classiquement opérée par des réactifs de type 1,2,4-triazoline-3,5-dione substitués en position 4 (TADs ou réactifs de type Cookson) ^{6,8,10,41,42,59} (cf. figure 22).

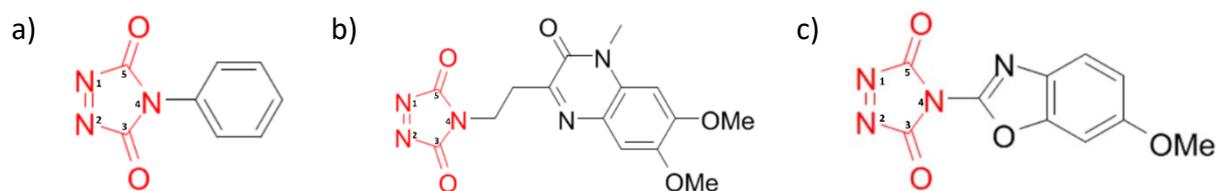


Figure 22 : Structures chimiques de trois réactifs de dérivation de type TADs disponibles sur le marché

a) 4-Phényl-1,2,4-triazoline-3,5-dione ou PTAD

b) 4-[2-(3,4-Dihydro-6,7-diméthoxy-4-méthyl-3-oxo-2-quinoxaliny)]éthyl]-1,2,4-triazoline-3,5-dione ou DMEQ-TAD

c) 4-[4-[6-Méthoxy-2-benzoxazolyl]]phényl]-1,2,4-triazoline-3,5-dione ou MBO-TAD

La structure en rouge est la 1,2,4-triazoline-3,5-dione substituée en position 4.

Issu de ⁷⁵.

La réaction de dérivation par des réactifs de type TADs permet d'ajouter d'une part un groupement polaire aisément ionisable aux analytes, tout en stabilisant la molécule par modification du système triène (cf. figure 23)

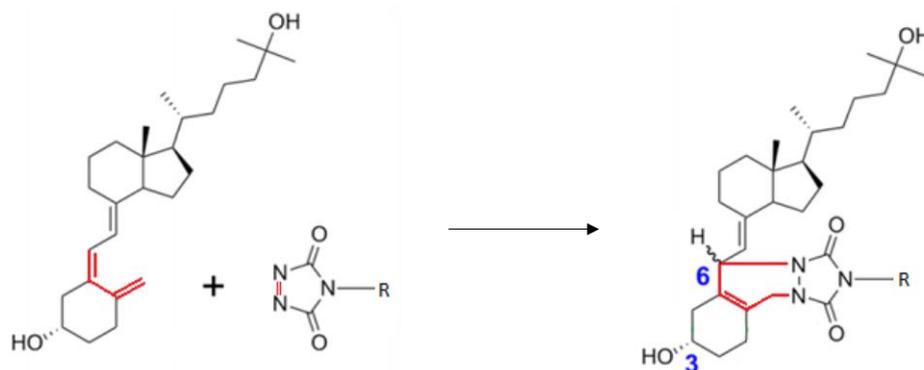


Figure 23 : Réaction de Diels-Alder entre la 25(OH)-D₃ et un réactif TAD
Réaction de dérivation par un TAD substitué en 4 par un groupement R, aboutissant à un composé dit « dérivé ». D'après ⁷⁵.

En comparaison avec les analytes non dérivés, la dérivation permet d'augmenter de 2 à 3 logs la sensibilité en détection par spectrométrie de masse. En outre, la structure moléculaire étant plus stable, le profil de fragmentation des ions parents en Q2 est plus constant (cf. figure 24), permettant de diminuer les interférences avec d'autres métabolites de la vitamine D ⁶.

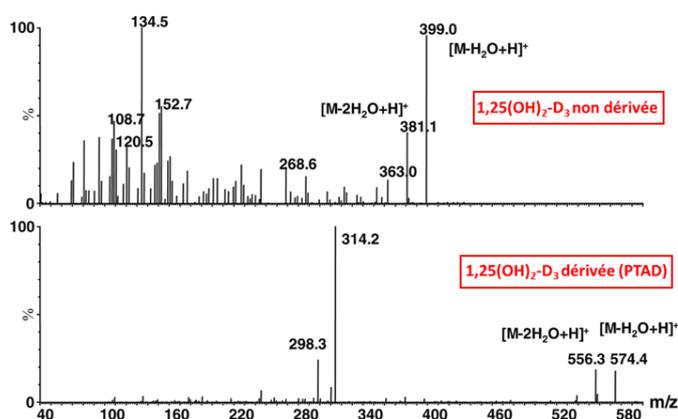


Figure 24 : Amélioration du profil de fragmentation grâce à la dérivation par un TAD
Profil de fragmentation de la 1 α ,25(OH)₂-D₃ observé dans le 3^{ème} quadripôle, selon que l'ion parent sélectionné par le 1^{er} quadripôle soit dérivé ou non par le PTAD (mode Product Ion Scan). Issu de ⁶.

Dans ce travail, nous avons testé deux procédés de dérivation, l'un par le PTAD et l'autre par le DMEQ-TAD (cf. figure 22). Après infusion directe dans le spectromètre de masse, nous n'avons pas mis en évidence de différence significative d'intensité du signal. Nous avons alors choisi de dériver nos analytes par le PTAD, comme beaucoup d'autres équipes^{6,8,10,42,59,61,67,76,77}, dans la mesure où les traitements pré-analytiques que nous avons expérimentés sont adaptés de ces travaux. En effet, l'équipe utilisant le DMEQ-TAD comme agent de dérivation⁴¹ applique un protocole pré-analytique employant du sulfate de zinc, qui peut potentiellement souiller la source du spectromètre de masse et donc nécessiter d'utiliser un spectromètre de masse dédié, ou d'ajouter d'autres solvants pour en diminuer la contamination⁶⁶.

Par ailleurs, l'efficacité de la source d'ionisation peut également être améliorée par l'ajout d'autres composés dans les solvants de l'HPLC. Certaines molécules telles que l'éthion, le malathion, le metalaxyl, le fenamifos, la méthylamine, la triéthylamine, la tributylamine, la codéine ou la morphine ont montré une capacité à améliorer l'ionisation des analytes à doser dans la source⁷⁸. L'emploi de méthylamine en particulier a été testé pour l'ionisation par ESI de diverses molécules^{79,80}. C'est un composé hydrophobe qui forme des adduits avec les ions en solution, diminuant alors leur énergie de solvation. Ceci facilite leur évaporation du solvant avant leur désorption vers l'analyseur de masse^{79,80}. Plusieurs méthodes de dosage de métabolites de la vitamine D utilisant ce procédé ont ainsi été mises au point^{10,59,73,77,81}. L'étude de Ding *et al.* a en outre mis en évidence l'augmentation de la sensibilité de la détection des métabolites de la vitamine D lorsqu'on ajoute de la méthylamine dans les phases mobiles⁵⁹ (cf. figure 25).

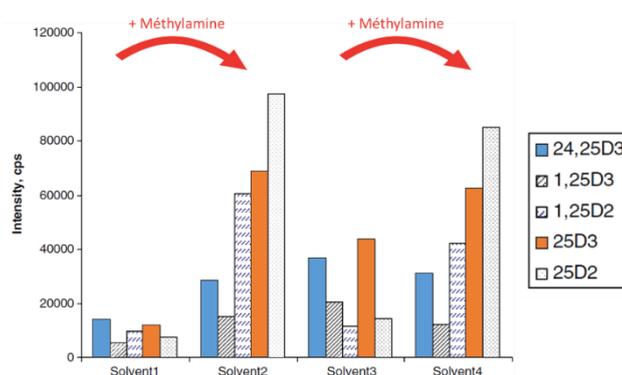


Figure 25 : Amélioration du signal par ajout de méthylamine dans les phases mobiles

Intensité du signal MRM (en coups cps) en fonction des phases mobiles aqueuses A utilisées. Toutes les phases mobiles organiques B testées ici sont constituées de méthanol + 0.1% acide formique. Les phases A sont les suivantes :

Solvant 1 : eau + 0.1% acide formique ; Solvant 2 : Idem solvant 1 + 5 mmol/L méthylamine.

Solvant 3 : eau + 10 mmol/L de formiate d'ammonium ; Solvant 4 : idem solvant 3 + 5 mmol/L méthylamine.

24,25(OH)₂-D₃ : histogrammes bleus/ 25(OH)-D₃ : histogrammes orange

Issu de ⁵⁹.

2- Transitions suivies et optimisation de leur signal

Une fois ces choix effectués, la 1^{ère} étape a consisté à déterminer les transitions à suivre pour détecter spécifiquement nos deux analytes (25(OH)-D₃ et 24,25(OH)₂-D₃) ainsi que leurs étalons internes respectifs (d₆-25(OH)-D₃ et d₆-24,25(OH)₂-D₃). Pour ce faire, nous avons injecté dans le spectromètre de masse des solutions pures de ces composés dérivés par le PTAD et contenant de la méthylamine CH₃-NH₃⁺ à une concentration de 50µL/L. Nous avons procédé pour chacune des quatre solutions en trois étapes :

1. Sélection des ions parents dans le 1^{er} quadripôle (Q1) : Un balayage des ions produits par la source et arrivant en Q1 a permis de choisir les ions majoritairement produits. Comme attendu dans une source d'ionisation dite « douce », les ions principaux sont peu fragmentés. Il s'agit des ions [Molécule dérivée - H₂O] ou [Molécule dérivée + H⁺ + CH₃-NH₃⁺].
2. Sélection des ions fils dans le 3^{ème} quadripôle (Q3) : Le mode Product Ion Scan a été employé ici. En paramétrant le 1^{er} quadripôle pour la sélection des ions parents majoritaires, un balayage des ions fils a permis de repérer ceux produisant un signal suffisant. Nous avons à ce stade déterminé les transitions à suivre (cf. tableau 5). Pour les analytes 25(OH)-D₃ et 24,25(OH)₂-D₃, deux transitions ont été choisies, l'une dans un but de quantification et l'autre dans un but de qualification (vérification de l'identification du signal). Pour chaque étalon interne, une seule transition a été sélectionnée.

	25(OH)-D ₃	24,25(OH) ₂ -D ₃	d ₆ -25(OH)-D ₃	d ₆ -24,25(OH) ₂ -D ₃
Transition 1 : Quantification	607.1 → 298.1	623.0 → 298.2	613.0 → 298.1	629.2 → 298.1
Transition 2 : Qualification	558.3 → 298.1	574.2 → 298.1		

Tableau 5 : Liste des transitions suivies et optimisées pour chaque composé

La 1^{ère} valeur représente le rapport m/z de l'ion parent sélectionné en Q1, et la 2^{ème} valeur le rapport m/z de l'ion fils sélectionné en Q3.

3. Afin de garantir une bonne sensibilité dans la détection de nos composés sans pour autant saturer le détecteur, les solutions pures ont à nouveau été infusées. Les paramètres de la source et de l'analyseur de masse ont été optimisés par le logiciel Analyst® pour chacune des 6 transitions choisies (cf. tableau 6).

Composé	25(OH)-D ₃		24,25(OH) ₂ -D ₃		d ₆ -25(OH)-D ₃	d ₆ -24,25(OH) ₂ -D ₃
	Transition	607.1 ↓ 298.1	558.3 ↓ 298.1	623.0 ↓ 298.2	574.2 ↓ 298.1	613.0 ↓ 298.1
Source	Electrospray Ionization mode positif (ESI+)					
Température de la source	550°C					
Voltage de la source	5500 V					
Gaz rideau	25 psi = 1,72 bars					
Gaz de collision	8 psi = 0,55 bars					
Fréquence de l'analyse de chaque transition	150 ms					
DP	256 V	81 V	131 V	86 V	146 V	191 V
Potentiel d'entrée	10 V					
Collision energy	29 eV	23 eV	25 eV	25 eV	27 eV	31 eV
Cell exit potential	38 V	6 V	14 V	12 V	10 V	12 V

Tableau 6 : Paramètres optimisés pour l'analyse en MS/MS de chaque composé
ms = millisecondes ; V = Volts ; eV = électronvolts

Les transitions choisies sont les mêmes que celles sélectionnées par d'autres équipes^{6,59,61,67,73,81} et s'expliquent par les structures et réactions chimiques ayant lieu dans la source et dans l'analyseur de masse (cf. figures 26 et 27). Il est admis que les structures hydroxylées sur le carbone 25 subissent aisément dans la source une déshydratation de par la formation d'un carbocation tertiaire stable en 25⁶. Cette déshydratation étant moins favorable lorsque des adduits avec la méthylamine sont formés, les ions parents dans le 1^{er} quadripôle sont les ions moléculaires. Par ailleurs, l'ion fils donnant le signal le plus important dans le 3^{ème} quadripôle pour nos deux analytes et leurs étalons internes est celui constitué du cycle A de la vitamine D (cf. Figure 1 page 7) auquel s'est ajouté le PTAD, de rapport m/z 298 (cf. figures 26 et 27).

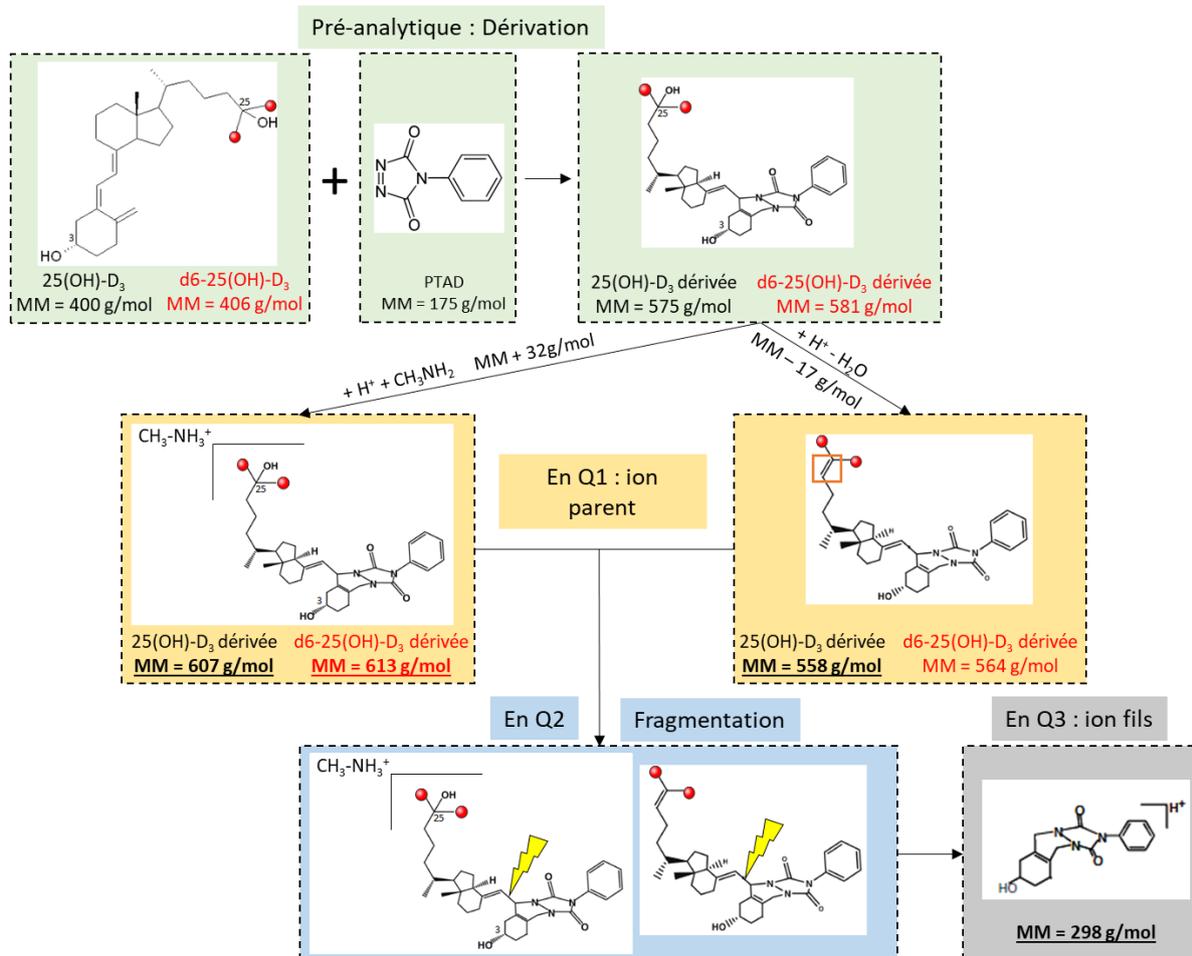


Figure 26 : Evolution des poids moléculaires des dérivés de la 25(OH)-D₃ au fur et à mesure des étapes pré-analytiques et analytiques

Les masses moléculaires (MM) subissent des variations au cours des étapes de dérivation par le PTAD, d'ionisation dans la source (vers le 1^{er} quadripôle Q1) puis de fragmentation dans le 2nd quadripôle Q2.

En gras souligné, les poids moléculaires utilisés pour les transitions.

● = 1 carbone liant 3 deutériums. ⚡ = site de fragmentation principal.

D'après ⁵⁹.

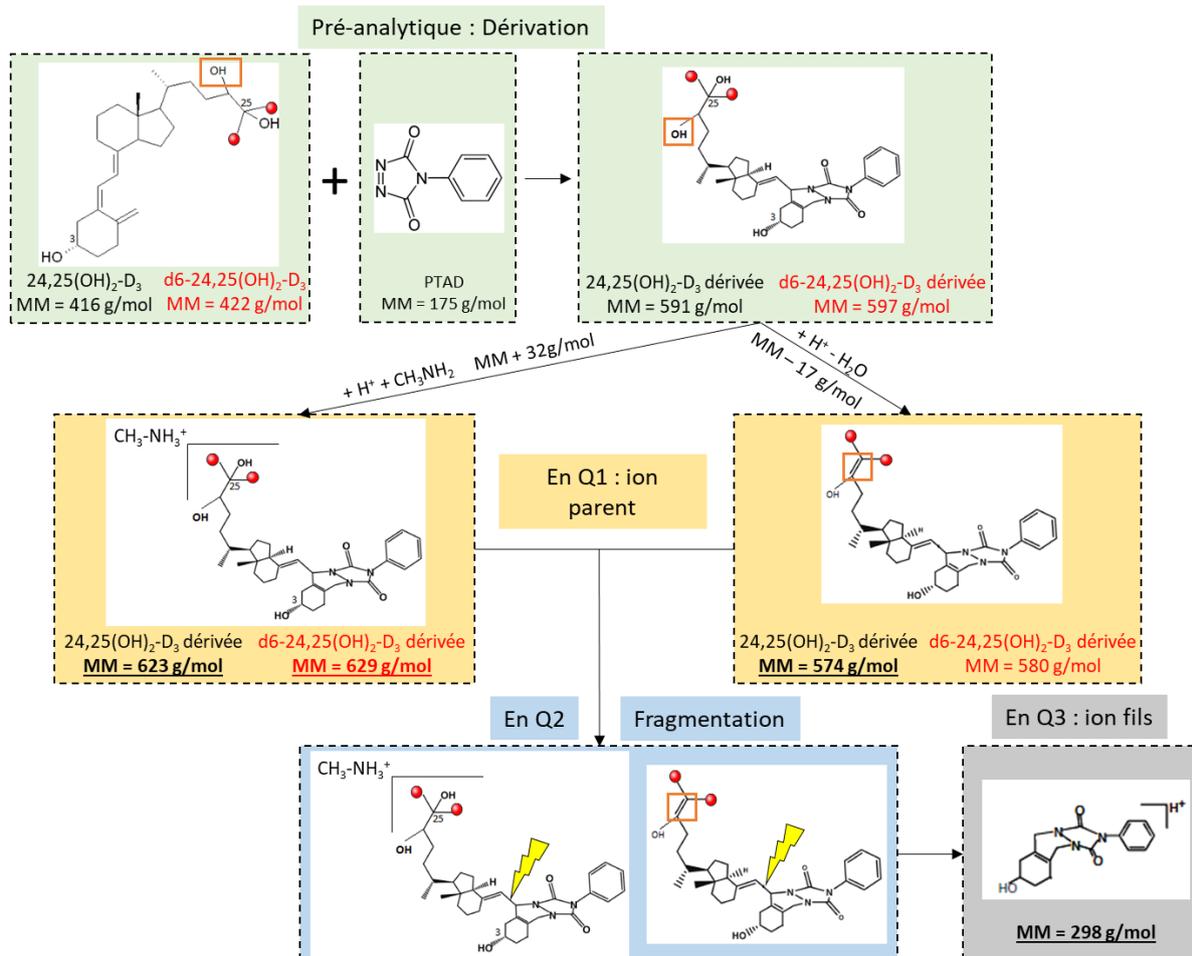


Figure 27 : Evolution des poids moléculaires des dérivés de la 24,25(OH)₂-D₃ au fur et à mesure des étapes pré-analytiques et analytiques.

Les masses moléculaires (MM) subissent des variations au cours des étapes de dérivation par le PTAD, d'ionisation dans la source (vers le 1^{er} quadripôle Q1) puis de fragmentation dans le 2nd quadripôle Q2.

En gras souligné, les poids moléculaires utilisés pour les transitions.

● = 1 carbone liant 3 deutériums. ⚡ = site de fragmentation principal.

D'après ⁵⁹.

Les abondances relatives des différents ions en Q1 et en Q3 pour le métabolite 25(OH)-D₃ dérivé par le PTAD et en solution avec de la méthylamine sont renseignées sur la figure 28. On peut voir que dans le 1^{er} quadripôle, l'ion majoritaire est l'ion de m/z 607, composé dérivé avec adduit CH₃-NH₃⁺ (méthylamine). On peut en outre observer que l'ion de m/z 558, dérivé sans adduit, est également présent en plus faible quantité. L'ion fragmenté 298 est également déjà présent en faible quantité. Ceci explique donc que l'on va pouvoir obtenir un signal pour les transitions dont l'ion parent est 607 mais aussi dont l'ion parent est 558, avec une plus faible intensité. Il est alors possible de choisir la transition avec adduits, la plus intense, pour quantifier les analytes, tandis que la transition sans adduits servira à confirmer l'identité de l'analyte (qualification) ⁸¹.

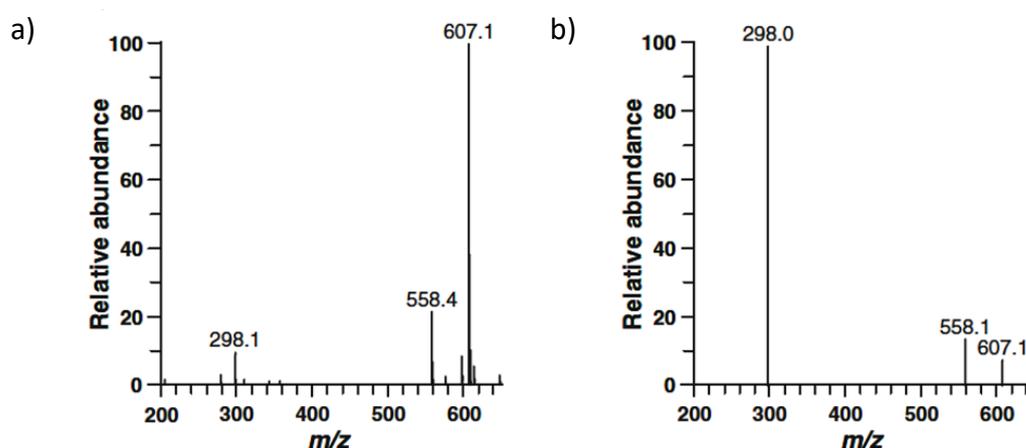


Figure 28 : Exemples de profils des ions retrouvés en Q1 et Q3 après dérivation et ajout de méthylamine. Abondance relative (en %) des ions produits pour le métabolite 25(OH)-D₃ dérivé par le PTAD, en solution contenant de la méthylamine 5mM a) Dans le 1^{er} quadripôle Q1 b) Dans le 3^{ème} quadripôle Q3. Issu de ⁸¹.

3- Optimisation de l'extraction des analytes

Nous avons vu que les métabolites de la vitamine D sont de par leurs structures chimiques très lipophiles et doivent être transportées dans le compartiment sanguin par des protéines de liaison telles que la DBP. Il est donc nécessaire d'appliquer aux échantillons à doser un traitement pré-analytique consistant en une précipitation des protéines suivie d'une extraction des analytes d'intérêt (cf. Figure 18 page 40). Plusieurs solvants de précipitation des protéines ont été expérimentés par d'autres équipes au cours de leur mise au point de méthode : l'acétonitrile ^{6,10,59}, la soude ⁸, l'acide chlorhydrique ^{41,42}, le sulfate de zinc ^{41,66} ou encore l'isopropanol/eau 50:50 v:v ¹⁰.

Nous avons tout d'abord opté pour une précipitation des protéines par l'acétonitrile suivie d'une extraction de type liquide-liquide (LLE) des analytes, adaptée de la méthode de Wang *et al.* ⁶¹. Deux mL d'acétonitrile sont ajoutés à une prise d'essai de 1mL de sérum, puis l'ensemble est centrifugé après 30 minutes d'incubation à température ambiante avant récupération de la phase organique supérieure. Cette méthode permet d'obtenir un culot assez stable de protéines, facilitant la récupération totale de la phase supérieure contenant les analytes libres.

Une Extraction Liquide-Liquide (LLE) est ensuite pratiquée par deux fois 1,5mL d'acétate d'éthyle, avec récupération de la phase organique supérieure. Cette technique est inspirée de méthodes précédemment décrites ^{59,61} et évite l'utilisation de méthyl tert-butyl éther MTBE cancérigène utilisé par d'autres équipes ^{6,8,41,72}. La prise d'essai de 1mL de sérum paraissant déraisonnable en application clinique, notamment pour des nouveau-nés, nous sommes parvenus à la ramener à 250µL en conservant un signal en spectrométrie de masse satisfaisant. Néanmoins, cette méthode présente une lourdeur technique avec multiplication d'étapes non automatisables et opérateur-dépendantes, telles que la séparation des phases supérieures et inférieures.

D'autres alternatives peuvent alors être envisagées. Ding *et al.* ont comparé les rendements d'extraction de métabolites de la vitamine D, selon que l'extraction soit de type liquide-liquide (LLE) ou solide-liquide (Solid-Phase Extraction SPE). Globalement, les taux d'extractions sont semblables quelle que soit la technique d'extraction ⁵⁹ (cf. figure 29), ce qui nous permet de choisir la technique la plus simple à mettre en œuvre au laboratoire.

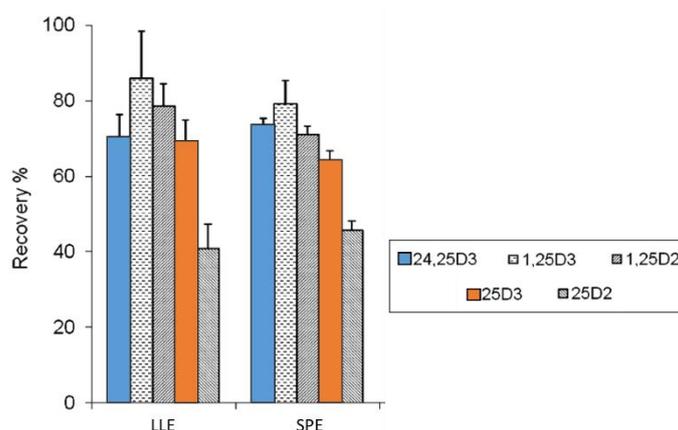


Figure 29 : Rendement d'extraction selon la technique employée.

Rendement d'extraction en % selon que l'extraction soit de type LLE ou SPE.

LLE : deux extractions successives par acétate d'éthyle

SPE : extraction pratiquée sur colonne Oasis HLB® activées, équilibrées, chargées, lavées puis éluées par de l'acétonitrile.

24,25(OH)₂-D₃ : histogrammes bleus/ 25(OH)-D₃ : histogrammes orange

Issu de ⁵⁹.

Le principe de l'extraction SPE consiste en l'utilisation d'une phase solide choisie pour ses interactions préférentielles avec les analytes à extraire. De par son fonctionnement, elle présente tout comme la LLE un nombre d'étapes important (cf. figure 30). La première est le conditionnement de la colonne de phase solide, généralement par ajouts successifs de plusieurs solvants. Les échantillons sont par la suite chargés sur la colonne, permettant la liaison des analytes aux résidus de la phase solide. Un lavage est ensuite effectué afin d'éliminer les impuretés non liées. Enfin, on procède à l'éluion des analytes par un solvant approprié ayant la capacité de rompre les liaisons analytes-phase solide. Toutes ces étapes sont néanmoins plus aisément automatisables que celles de la LLE, orientant le choix de beaucoup d'équipes vers cette technique d'extraction pour les métabolites de la vitamine D 6,42,59,68.

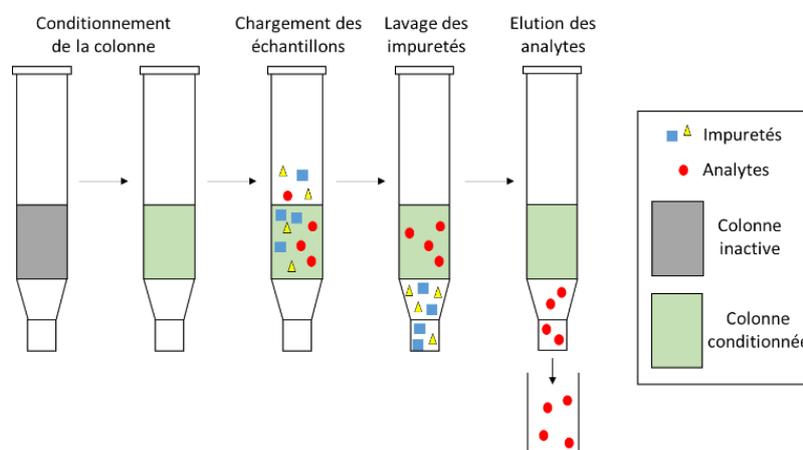


Figure 30 : Principe de fonctionnement d'une extraction Solide-Liquide (SPE) D'après ⁸².

Cependant, l'emploi de solvants protiques et polaires tels que l'eau et le méthanol dans les étapes de conditionnement et de lavage des colonnes peut constituer un frein à l'utilisation des techniques extractives de type SPE. En effet, la 24,25(OH)₂-D est un métabolite plus polaire que les autres, et peut selon les colonnes être éluée lors des étapes de lavage ⁶. De même, des résidus de ces solvants protiques peuvent être retrouvés dans les éluats. Or, les composés de dérivation de type TADs sont instables en solvant protique et peuvent être désactivés, gênant alors l'étape de dérivation ultérieure ⁶. Par ailleurs, en comparant une extraction LLE à une extraction SPE, l'équipe de Wang *et al.* a quant à elle mis en évidence de meilleurs rendements par LLE ⁶¹. Enfin, l'élimination de la matrice est meilleure en cas d'extraction LLE, ce qui peut avoir un impact important en détection par spectrométrie de masse ⁸³.

Il existe cependant une technique d'extraction constituant un compromis entre les extractions LLE et SPE : il s'agit de l'Extraction Liquide supportée par une phase Solide (Solid phase-supported Liquid Extraction SLE). Le principe de cette méthode est basé comme pour la LLE sur l'extraction d'un échantillon liquide par un solvant non miscible dans lequel les analytes sont solubles. La différence est qu'en SLE, l'échantillon liquide est adsorbé sur une phase solide constituée de terres de diatomée. La délicate séparation des solvants liquides de la LLE est remplacée par une élution, par le solvant d'extraction, des analytes adsorbés sur la colonne (cf. figure 31). On dispose donc d'une méthode simple et rapide, cumulant les avantages pratiques de la SPE et les performances de la LLE, tout en s'affranchissant de leurs inconvénients ⁸³.

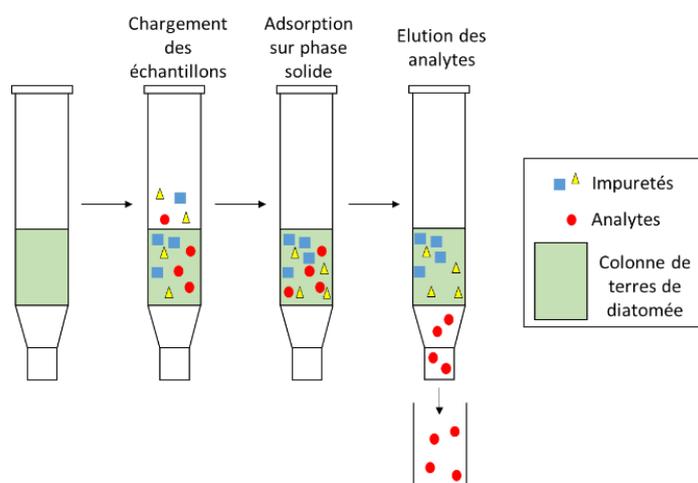


Figure 31 : Principe de fonctionnement d'une extraction SLE
D'après ⁸³.

Une méthode de dosage de métabolites de la vitamine D appliquant une extraction par des colonnes de type Isolute SLE[®] (Biotage[®]) a été publiée en 2017 ¹⁰. Ces colonnes sont décrites comme capables de retenir les impuretés de types sels, protéines mais aussi phospholipides. Or, l'élimination des phospholipides présente un intérêt essentiel puisqu'ils sont connus pour présenter un effet suppresseur d'ion dans la source du spectromètre de masse ⁷³. L'efficacité des colonnes Isolute SLE[®] s'est avérée excellente puisque le phospholipide co-éluant avec la 25(OH)-D₃ est totalement éliminé par l'étape d'extraction ¹⁰.

Pour la mise au point de notre technique, et sauf indication contraire, nous nous sommes appuyés sur la note d'application AN857 de Biotage[®] décrivant le dosage de la 1,25(OH)₂-D₃ qui est le métabolite le moins abondant de l'organisme ⁸⁴.

Le protocole de précipitation protéique et d'extraction est le suivant (cf. figure 32) : 250µL d'échantillon sont incubés 30 minutes à température ambiante avec les étalons internes (EI), puis les protéines sont précipitées par 250µL d'isopropanol/eau 50:50 v:v pendant 15 minutes. Par la suite, 300µL de ce mélange sont chargés pendant 5min sur les colonnes Isolute SLE® puis les analytes sont élués par deux fois 700µL d'hexane, en terminant par quelques secondes de pression positive afin d'éluier la totalité du solvant.

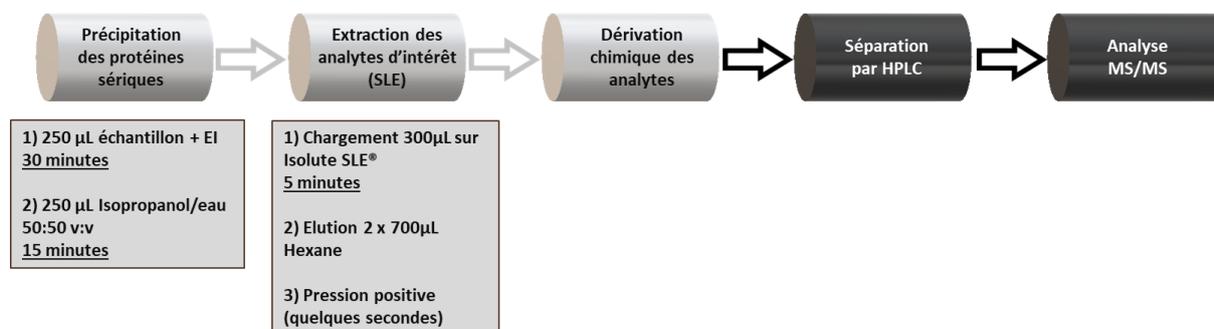


Figure 32 : Processus pré-analytique et analytique, détails de l'extraction

4- Optimisation de l'étape de dérivation

L'étape pré-analytique suivante est la dérivation chimique des analytes par le PTAD (cf. Figure 18 page 40). Nous avons testé diverses conditions de dérivation en faisant varier la température, la durée d'incubation et la concentration en PTAD afin d'optimiser l'étape en termes de simplicité, de coût et d'efficacité.

Nos analytes n'étant pas thermosensibles ², nous avons pu expérimenter trois températures de dérivation, à savoir la température ambiante, 50°C et 75°C. N'ayant pas observé de différence d'intensité de signal quelle que soit la condition, nous avons opté pour une dérivation à température ambiante, plus simple au niveau organisationnel et décrite dans la majorité des autres méthodes publiées ^{6,8,10,59,61,73}.

De la même manière, nous avons fait varier les durées de dérivation entre 4 conditions trouvées dans la littérature : 30 minutes ¹⁰, 60 minutes ^{59,61}, 90 minutes ⁴¹ et une nuit entière⁶. Nous n'avons pas mis en évidence de différence significative d'intensité de signal et avons opté pour l'option la plus rapide, à savoir 30 minutes.

Au vu de la divergence des données de la littérature, nous avons optimisé au laboratoire la concentration en PTAD à employer. Nous avons testé deux concentrations en PTAD : 0,25 mg/mL, issue de la note d'application AN857 de Biotage® et 1mg/mL, la plus élevée employée dans la littérature ⁶¹. Nous n'avons pas observé de différence d'intensité de signal. En considérant qu'à 0,25 mg/mL, soit 1,43 mmol/L, le PTAD est largement en excès par rapport aux analytes à dériver sur toute notre gamme de mesure (de l'ordre de la dizaine de nmol/L), nous avons sélectionné cette condition, moins consommatrice de réactif et moins pourvoyeuse d'interférence. Il faut savoir qu'Aronov *et al.* ont observé dans leurs expérimentations une diminution du rendement de dérivation à partir d'une concentration en PTAD supérieure à 2mg/mL ⁶.

Nous avons également testé deux types de solvants de reconstitution du PTAD : l'acétonitrile ^{6,8,10,42,59,61,73} et un mélange acétate d'éthyle/heptane 8/92 v:v ⁸⁴. Nous n'avons pas mis en évidence d'influence du solvant de reconstitution et avons sélectionné le mélange acétate d'éthyle/heptane, de par une meilleure solubilité du PTAD.

Enfin, la question de dériver des extraits préalablement séchés ^{10,41,61,73} ou en solution dans le solvant d'extraction ⁸⁴ s'est posée. La dérivation des éluâts non évaporés est rendue possible par le fait que l'heptane est un solvant aprotique, sans influence néfaste sur la structure du PTAD. Nous avons cette fois encore suivi la procédure publiée par Biotage®, puisque satisfaisante, afin d'optimiser la durée de cette étape.

Pour synthétiser, notre étape de dérivation optimisée consiste à recueillir les éluâts de l'extraction SLE directement dans des tubes contenant 200µL de PTAD à 0,25 mg/mL. Ce dernier est préparé extemporanément dans un mélange acétate d'éthyle/heptane 8/92 v:v. L'incubation se fait à température ambiante sous agitation pendant 30 minutes (cf. figure 33).

Avant l'étape d'injection en HPLC-MS/MS, le procédé d'arrêt de la réaction de dérivatisation et la nature des solvants injectés doivent être sélectionnés. Certaines équipes ont choisi d'arrêter la réaction par ajout de solvant protique tel que l'eau^{10,67} et d'injecter ensuite directement¹⁰. Néanmoins, ces équipes avaient opté pour une dérivatisation des extraits secs. Or, pour des questions pratiques, nous avons choisi de dériver les analytes dans le solvant d'extraction ; nous avons donc un volume important de solvant et une concentration apparaît nécessaire à ce stade afin de détecter de faibles quantités de métabolites. Nous avons choisi de sécher les analytes extraits et dérivés à chaud sous un courant d'azote, puis de les remettre en solution par un solvant de reprise. Dans la littérature, la reprise des extraits secs et dérivés se fait soit par de l'acétonitrile/eau 40/60 v:v⁶¹, soit par un mélange méthanol/eau en proportions variables^{41,42,73,84}. Nous avons expérimenté trois solutions de reprise : méthanol 70%, éthanol 70% et acétonitrile 40%. A noter que selon la note d'application AN857 de Biotage®, le solvant de reprise lui-même comprend de la méthylamine à une concentration de 50µL/L⁸⁴. Nous avons là encore suivi la méthode mise au point par Biotage®, avec reprise par 150µL de méthanol/eau 70/30 v:v⁸⁴ additionné de méthylamine et injection de 20µL en HPLC-MS/MS, permettant d'obtenir des pics plus fins et plus intenses, et rendant ainsi la détection et la quantification plus aisée (cf. figure 33).

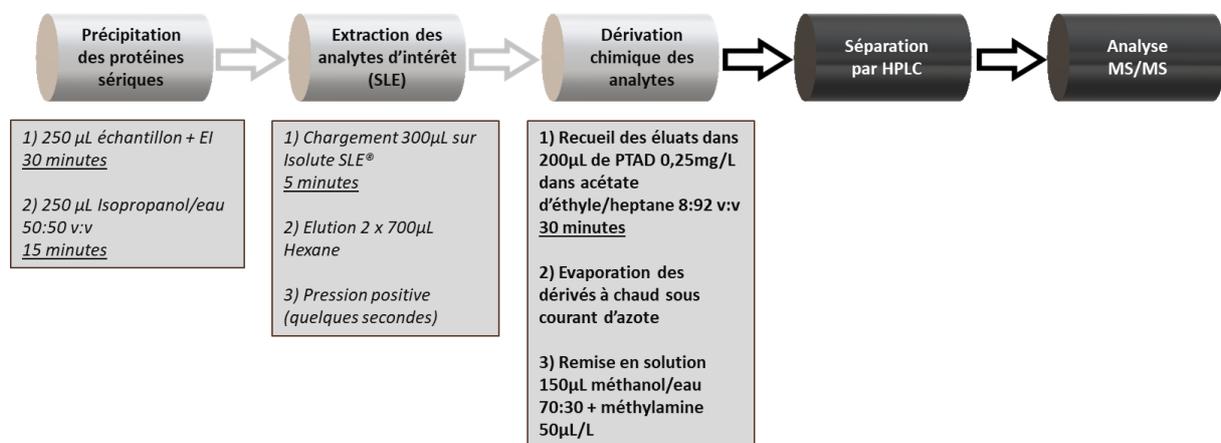


Figure 33 : Processus pré-analytique et analytique, détails de la dérivation

5- Optimisation des paramètres de l'HPLC

L'étape de séparation chromatographique par HPLC est essentielle : elle permet de séparer les analytes à doser d'éventuelles interférences avec des composés ayant les mêmes transitions en MS/MS, mais aussi entre eux. Il est donc nécessaire d'en optimiser les paramètres afin de garantir cette séparation tout en obtenant des pics exploitables, avec un temps d'analyse minimisé et un temps de rétention stable.

Pour ce faire, quatre paramètres critiques de l'HPLC doivent être maîtrisés :

- La nature de la colonne chromatographique, en fonction de l'affinité des analytes à doser pour les groupements chimiques greffés sur la phase stationnaire.
- La nature des solvants constituant la phase mobile, composée d'un mélange entre une phase aqueuse A et une phase organique B.
- Le mode d'HPLC, soit isocratique, soit gradient : dans le mode isocratique, la proportion des phases A et B l'une par rapport à l'autre reste constante tout au long de l'analyse d'un échantillon. Au contraire, le mode gradient consiste à faire varier la proportion des phases A et B au cours de l'analyse afin de moduler la polarité de la phase mobile.
- Le débit de phase mobile appliqué, afin d'optimiser le temps d'analyse sans pour autant soumettre la colonne chromatographique à une pression trop importante qui diminuerait sa durée d'utilisation.

Ainsi, nous avons commencé par sélectionner les solvants à employer pour la phase mobile. Dans la littérature, les phases aqueuses (phase A) sont composées d'eau^{10,41,42,59,61,66,68,73,77,81} tandis que les phases organiques (B) sont composées soit d'acétonitrile^{61,77}, soit de méthanol^{6,10,41,42,59,66-69,73,81}. Ces phases sont éventuellement additionnées de tampons formiate d'ammonium^{42,66,68,81}, acétate d'ammonium⁴¹ ou acide formique 0,1%^{6,10,41,59,61,66,69,73,77}. Enfin, certaines équipes ont enrichi de méthylamine leurs phases aqueuses⁵⁹ ou organiques⁶⁸, voire les deux^{10,73,77}. Nous avons effectué des tests de phase mobile sur une colonne C18, c'est-à-dire dont la phase stationnaire est greffée de groupements alkyles à 18 carbones, comme décrit dans la littérature^{6,10,59,68,69,73,77,85}. Nous avons testé 5 combinaisons de phases mobiles A et B présentées dans le tableau 7. La 1^{ère} combinaison est inspirée de la méthode de Wang *et al.*⁶¹, avec en plus l'ajout de formiate d'ammonium dans les deux phases. La 2^{nde} combinaison est celle utilisée par Mena Bravo *et al.*⁶⁸. Dans les deux cas, nous avons suivi les modes gradients décrits dans les publications

correspondantes. Aronov *et al.* ont mis en évidence l'amélioration du signal par l'utilisation du méthanol, plus volatil ⁶. Cependant, le méthanol étant plus visqueux que l'acétonitrile, il en résulte une pression dans la colonne de séparation plus importante. En l'absence d'amélioration de la forme ou de l'intensité des pics par le méthanol, nous avons opté pour une phase organique à base d'acétonitrile. Or, la méthode mise au point par Biotage® ⁸⁴ emploie une phase organique B composée d'acétonitrile/eau 50:50, et comprenant 5mM de méthylamine. Nous avons testé cette phase mobile (combinaison n°3 du tableau 7) et comme attendu, nous avons observé une augmentation du signal pour nos deux analytes grâce à la méthylamine. Nous avons ensuite fait varier la base de la phase organique B (méthanol/eau 70/30 pour la combinaison n°4 et acétonitrile/eau 70/30 pour la combinaison n°5 du tableau 7). Comme précédemment, l'emploi du méthanol augmente la pression exercée sur la colonne. Par ailleurs, l'augmentation de la proportion d'acétonitrile conduit à une diminution de la discrimination des pics. Nous avons donc opté pour la combinaison de phase n°3 du tableau 7, issu de la note d'application AN857 de Biotage® ⁸⁴.

Combinaison	Phase A (aqueuse)		Phase B (organique)	
	Base	Additifs	Base	Additifs
n°1	Eau	Formiate d'ammonium 2mM Acide formique 0,1%	Acétonitrile	Formiate d'ammonium 2mM Acide formique 0,1%
n°2	Eau	Acide formique 0,1%	Méthanol	Acide formique 0,1%
n°3	Eau	Méthylamine 5mM	Acétonitrile 50%	Méthylamine 5mM
n°4	Eau	Méthylamine 5mM	Méthanol 70%	Méthylamine 5mM
n°5	Eau	Méthylamine 5mM	Acétonitrile 70%	Méthylamine 5mM

Tableau 7 : Nature des solvants de phases mobiles aqueuses et organiques testées

Pour les combinaisons n°3, 4 et 5 du tableau 7, nous avons expérimenté 3 modes isocratiques (70%, 80% et 100% de phase B) et deux modes gradients (début à 70% ou 80%, passage à 100% puis retour à 70% ou 80% de phase B). Le mode gradient présente l'avantage de moduler au fil de l'analyse la rétention des composés sur la colonne, afin d'obtenir une séparation plus fine de certains analytes ou de réduire la durée d'analyse d'autres. En revanche, il présente l'inconvénient de devoir réserver un temps de rééquilibrage de la

colonne aux conditions de début d'analyse avant l'échantillon suivant ⁶. Dans la mesure où le mode isocratique à 100% de phase B nous permet d'obtenir un temps d'analyse raisonnable, sans pour autant rogner sur la qualité de séparation de nos analytes, c'est cette méthode qui a été sélectionnée. Elle correspond là encore à la méthode mise au point par Biotage® ⁸⁴.

Nous avons également fait varier la nature des colonnes de séparation chromatographique. Une colonne de type C8, avec de la silice greffée avec des groupements alkyles à 8 carbones, et non plus 18, a été testée ^{42,72}. Celle-ci n'apporte pas une meilleure séparation de nos analytes, ni une augmentation de signal. Nous avons également testé une colonne de type PFP (PentaFluoroPhenyls), avec de la silice greffée de groupements phényles perfluorés. A noter que pour cette dernière colonne, il est nécessaire d'utiliser des phases méthanoliques dans la mesure où la triple liaison de l'acétonitrile entre elle-même en interaction avec la phase stationnaire. La pression étant trop forte par rapport au bénéfice de séparation de nos analytes, nous avons conservé notre choix initial de colonne de type C18.

Enfin, nous avons optimisé le débit de phase mobile appliqué sur la colonne. Nous avons testé un débit de 0,3 mL/min ⁵⁹, 0,4 mL/min ^{6,10,41,66} et 0,5 mL/min ^{73,84}. Le débit le plus élevé testé est celui retenu, puisqu'il permet d'obtenir une durée d'analyse totale de 5min, tout en conservant une pression exercée sur la colonne raisonnable et une séparation satisfaisante des analytes.

Au final, la méthode chromatographique mise au point par Biotage® ⁸⁴ est apparue pour nous comme la plus satisfaisante. Nous utilisons une colonne Kinetex C18 de marque Phenomenex et de dimensions 50x2,1 mm, avec des particules de 2,6µm et 100 Å. La phase mobile est composée d'acétonitrile/eau 50/50 v:v avec 5mM de méthylamine (soit 60µL/L de méthylamine 40%). Elle est appliquée à un débit de 0,5mL/min en mode isocratique (cf. figure 34).

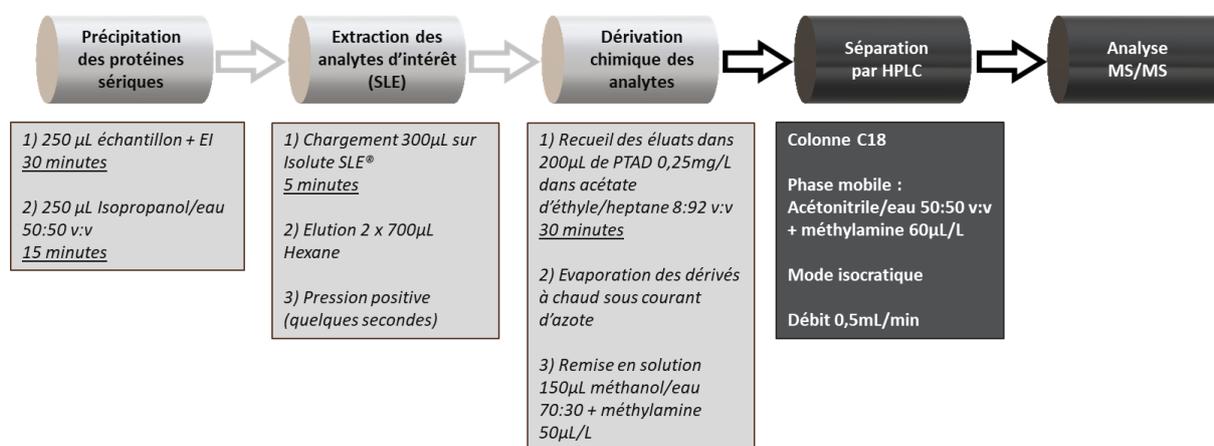


Figure 34 : Processus pré-analytique et analytique, détails des paramètres HPLC

6- Exemples de chromatogrammes types

En appliquant les étapes pré-analytiques et les paramètres HPLC et MS/MS décrits ci-avant, nous obtenons des chromatogrammes tels que présentés dans la figure 35. Le tracé global est présenté en figure 35 a) et on observe que l'analyse complète d'un échantillon dure 5 minutes, alors que le temps de rétention des composés 25-hydroxylés est d'environ 3,10 minutes. Ceci permet de s'assurer de la sortie de colonne de la totalité de l'échantillon, afin d'éviter la contamination de l'échantillon suivant par d'éventuels composés accrochés dans la colonne. A noter que les échantillons ne sont injectés dans la source du spectromètre de masse qu'entre le temps 0,5 minutes et 4,5 minutes, afin d'éviter la contamination inter-échantillon dans la source. La figure 35 b) et c) montre les tracés pour les composés 25-hydroxylés et 24,25-dihydroxylés respectivement, et l'on peut voir que les étalons internes ont des temps de rétention très semblables aux composés non deutérés. Ceci confirme la pertinence du choix des étalons internes qui présentent des propriétés physico-chimiques semblables à leurs analytes attribués.

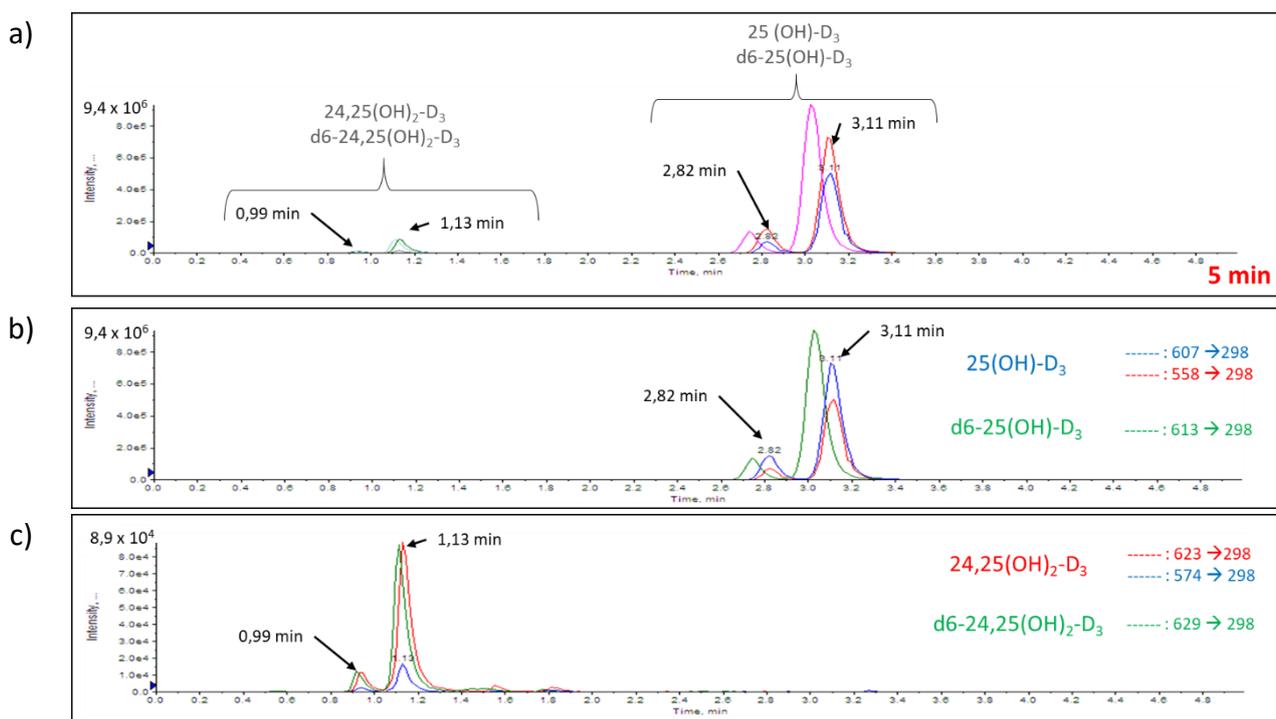


Figure 35 : Chromatogrammes types obtenus avec les paramètres pré-analytiques et analytiques optimisés. L'axe des abscisses représente le temps d'analyse en minute et l'axe des ordonnées l'intensité de détection des ions en coups/minute.

a) Tracé global et identification des pics avec leurs temps de rétention

b) Sélection des transitions des composés 25(OH)-D₃ et d₆-25(OH)-D₃

c) Sélection des transitions des composés 24,25(OH)₂-D₃ et d₆-24,25(OH)₂-D₃

Il est intéressant de noter que pour chacun des 4 composés suivis, deux pics distincts sont présents sur les chromatogrammes (cf. figure 35). Ceci est dû au fait que la réaction de dérivation par le PTAD aboutit à la formation de deux épimères 6S et 6R en proportion constante 4:1^{59,61}. La figure 36 présente les structures chimiques de ces deux épimères⁸¹.



Figure 36 : Structures chimiques des isomères 6S et 6R issus de la dérivaison de la 25(OH)-D₃ par le PTAD Issu de⁸¹.

Se pose alors la question de l'exploitation des chromatogrammes. Certaines équipes ont fait le choix de baser leur intégration des données sur l'aire du pic majoritaire correspondant à l'isomère 6S^{6,41,59}. D'autres ont choisi d'exploiter l'aire de l'ensemble des deux pics afin de minimiser les erreurs de calculs⁶¹. Nous avons expérimenté les deux méthodes et n'avons pas mis en évidence de différence significative dans les résultats de quantification. Nous avons choisi de travailler sur l'aire du pic le plus intense, afin d'éviter les surestimations lorsque le pic minoritaire est confondu avec le bruit de fond dans le cas de concentrations très faibles.

7- Optimisation de la gamme d'étalonnage

La question du choix de la matrice dans laquelle constituer notre gamme d'étalonnage s'est posée. Certaines équipes ont travaillé sur des gammes d'étalonnages en milieu non sérique tel que l'éthanol ou l'acétonitrile^{6,59,85}. Le principal défaut de ces techniques est la négligence d'un éventuel effet de matrice au cours du dosage, et notamment dans l'étape d'HPLC-MS/MS. Pour s'en affranchir, il est donc nécessaire de se rapprocher au maximum d'une matrice sérique.

Certaines équipes se sont servies de calibrants existants dans le commerce et fabriqué au sein d'une matrice sérique humaine^{10,41}. Ces calibrants commerciaux, tels que le SRM972 (Standard Reference Material 972) par exemple, présentent l'inconvénient d'un coût important.

Beaucoup de méthodes mises au point sont basées sur des gammes de calibration élaborées à partir de dilutions successives des analytes purs dans un sérum humain déplété en vitamine D ^{10,41,66,84}. Ce type de sérum étant relativement onéreux, une solution plus économique doit être employée. Nous avons tenté de dépléter du sérum humain en stéroïdes et vitamine D par une méthode d'adsorption sur charbon actif suivie d'une étape d'ultracentrifugation. La technique s'est avérée insuffisante, avec une rémanence faible, mais significative malgré tout, de métabolites de la vitamine D, à environ 10 nmol/L de 25(OH)-D₃. Une autre solution consiste à reconstituer une matrice sérique artificielle, diminuant ou supprimant alors la consommation de sérum déplété en vitamine D. Plusieurs types de matrices artificielles ont été décrits dans la littérature. Par exemple, l'une d'elles est composée de 30 mg/mL d'albumine sérique humaine (HSA) dans du PBS ^{61,67}; une autre est établie à partir de PBS à pH 7,5 comprenant 140 mmol/L de chlorure de sodium (NaCl) et 8% d'albumine sérique bovine (BSA) ⁸⁶. La solution que nous avons retenue est celle mise au point par Kaufmann *et al.* et constituée de 80% de PBS comprenant 0,1% d'albumine sérique bovine (BSA) et de 20% de sérum humain déplété en stéroïdes et vitamine D ⁴¹.

Nous avons fait le choix d'une quantification basée sur une gamme d'étalonnage en 4 points, préparée pour chaque série d'analyses. Les concentrations des 4 calibrants sont renseignées dans le tableau 8 et permettent de couvrir une large gamme de concentrations rencontrées en médecine humaine. Le calibrant le plus haut est obtenu par dilution au 1/8, dans la matrice artificielle décrite ci-avant, d'une solution éthanolique des analytes purs 25(OH)-D₃ et 24,25(OH)₂-D₃ non dérivés à des concentrations respectives de 2,4 μmol/L et 240 nmol/L et conservée à -20°C. Les calibrants suivants sont élaborés par dilutions successives au ¼ dans la matrice artificielle.

	Calibrant 4	Calibrant 3	Calibrant 2	Calibrant 1
25(OH)-D ₃	300	75	18,75	4,69
24,25(OH) ₂ -D ₃	30	7,5	1,88	0,47

Tableau 8 : Concentrations en analytes d'intérêt, en nmol/L, des calibrants constituant la gamme d'étalonnage

La courbe d'étalonnage est établie en attribuant à chaque rapport des aires $RA = \frac{\text{Aire du pic de l'analyte}}{\text{Aire du pic de l'étalon interne}}$ la concentration théorique des standards. L'équation de la droite de régression linéaire obtenue est de la forme $RA = a \times [\text{concentration}] + b$. La concentration des échantillons est ensuite déterminée par cette équation après calcul du rapport RA.

Pour chaque série d'analyses, un échantillon dit « double blanc » (matrice artificielle seule) et un échantillon dit « blanc » (matrice artificielle et étalons internes) sont insérés. Ces deux échantillons servent à vérifier l'absence de contamination lors des étapes pré-analytiques et permettent de vérifier que l'ensemble HPLC-MS/MS ne comporte pas d'impuretés interférentes.

La dernière étape de mise au point a consisté à moduler la concentration en étalons internes ajoutée dans l'ensemble des tubes afin d'obtenir des pics d'intensités comparables avec ceux des analytes à doser. Nous avons après plusieurs essais fixé la concentration de la solution d'étalons internes à 360 nmol/L de d_6 -25OH-D₃ et 36 nmol/L de d_6 -24,25(OH)₂-D₃. Ceci nous permet d'avoir, dans chaque tube de dosage, des concentrations proches de celles des analytes à doser (60 nmol/L et 6 nmol/L, respectivement pour la d_6 -25OH-D₃ et la d_6 -24,25(OH)₂-D₃). Cette solution est ajoutée dans chaque tube à analyser, excepté le « double blanc », à un volume de 50µL.

II. Validation et performance de la méthode

1- Spécificité analytique

Dans le but de calculer la spécificité telle que définie dans le chapitre « Matériel et méthode », 8 séries d'analyses pratiquées entre mai et septembre 2017 ont été exploitées. En ce qui concerne la 25(OH)-D₃, la spécificité moyenne est de 2,36%. La 24,25(OH)₂-D₃ présente quant à elle une spécificité moyenne de 1,91%. Cette spécificité est stable au cours des séries d'analyses, avec des CV de 4,5% et 10,6%, respectivement. Les CV étant inférieurs à 15%, la spécificité analytique a été jugée acceptable d'après la procédure de validation de méthode séparative de notre laboratoire et les critères de 2018 de la FDA.

Nous avons également procédé à l'analyse de 4 échantillons de sérum déstéroïdé comportant chacun un seul des composés purs suivants : 25(OH)-D₃, 24,25(OH)₂-D₃, d_6 -25(OH)-D₃ et d_6 -24,25(OH)₂-D₃. Nous avons ainsi pu exclure toute réaction croisée entre les 6 transitions suivies, chaque composé donnant un signal uniquement pour les transitions qui lui sont attribuées.

2- Etendue de mesure et linéarité

En suivant les modes opératoires décrits dans le chapitre « Matériel et méthode », nous avons établi les limites de quantification et de détection mentionnées dans le tableau 9.

	25(OH)-D ₃	24,25(OH) ₂ -D ₃
Limite de détection	1,0 nmol/L	0,15 nmol/L
Limite de quantification	3,4 nmol/L	0,4 nmol/L

Tableau 9 : Limites de détection et de quantification des analytes 25(OH)-D₃ et 24,25(OH)₂-D₃

La linéarité tout au long de notre étendue de mesure est présumée devant des coefficients de corrélation linéaire r^2 de nos gammes de calibration toujours supérieurs à 0,99. Nous avons néanmoins exploré les limites supérieures de linéarité en analysant des échantillons très concentrés, purs et dilués dans du sérum destéroïdé. Nous avons effectué des tests sur deux jours différents pour les 3 concentrations théoriques mentionnées au paragraphe « MATERIEL ET METHODES- II.2-Etendue de mesure et linéarité » page 43. Même pour des échantillons bien plus concentrés que notre calibrant le plus élevé, les différences entre les mesures effectuées sur échantillon pur et dilué au ½ sont acceptables (<15% de la concentration théorique). Les limites supérieures de linéarité ont donc été fixées pour cette méthode à 500 nmol/L et 50 nmol/L, respectivement pour la 25(OH)-D₃ et la 24,25(OH)₂-D₃.

3- Répétabilité et fidélité intermédiaire

Les 3 niveaux de CIQ « maison » ont été dosés selon les modalités définies dans le chapitre « Matériel et méthodes » page 44. L'ensemble des CV est inférieur à 15%, sauf pour la répétabilité du CIQ de niveau bas de la 24,25(OH)₂-D₃ (cf. tableau 10). Néanmoins, la concentration théorique de ce CIQ est de 0,5 nmol/L, ce qui est très proche de notre limite de quantification ; le CV limite de 20% est applicable dans ce cas (critères FDA 2018). La répétabilité et la fidélité intermédiaire sont donc jugées conformes d'après les critères d'acceptation de notre laboratoire et de la FDA 2018.

	25(OH)-D ₃		24,25(OH) ₂ -D ₃	
	Niveau de CIQ	CV (en %)	Niveau de CIQ	CV (en %)
Répétabilité	5 nmol/L	12,5	0,5 nmol/L	19,5
	50 nmol/L	8,3	5 nmol/L	9,7
	200 nmol/L	3,4	15 nmol/L	3,7
Fidélité intermédiaire	5 nmol/L	8,0	0,5 nmol/L	12,2
	50 nmol/L	5,6	5 nmol/L	8,8
	200 nmol/L	6,5	15 nmol/L	7,7

Tableau 10 : Répétabilité et fidélité intermédiaire

Les résultats sont exprimés en CV%, pour chaque analyte et chaque niveau de CIQ

4- Contamination inter-échantillon

La contamination inter-échantillon, déterminée selon le protocole décrit dans le chapitre « Matériel et méthode » page 44 est inférieure à 1% pour chacun de nos analytes. Elle est en effet de 0,01% et -0,44% pour la 25(OH)-D₃ et la 24,25(OH)₂-D₃, respectivement. Elle est donc considérée comme conforme.

5- Rendement pré-analytique : extraction et dérivation

Le rendement d'extraction de notre méthode d'extraction SLE a été déterminé selon les modalités décrites dans la partie « Matériel et méthode » page 45, par comparaison des conditions C et D de la figure 20. Pour chacune des deux concentrations expérimentées pour chaque composé, trois analyses ont été pratiquées sur une période de 5 jours. Les rendements d'extraction détaillés et moyens sont renseignés dans le tableau 11. Pour chaque concentration d'analyte, les rendements d'extraction sont non significativement différents de 100% (Test de Tukey). Nous pouvons considérer que notre technique d'extraction permet de récupérer la quasi-totalité des analytes d'intérêt.

		Rendement moyen (%)	Significativement différent de 100% ? (<i>p</i> -value)
25(OH)-D ₃	5 nmol/L	99,8	Non (<i>p</i> >0,9999)
	400 nmol/L	109,8	Non (<i>p</i> =0,3047)
24,25(OH) ₂ -D ₃	0,5 nmol/L	99,2	Non (<i>p</i> =0,9998)
	40 nmol/L	102,8	Non (<i>p</i> =0,9750)

Tableau 11 : Estimation du rendement d'extraction

Rendement d'extraction moyen, en %, pour deux concentrations en 25(OH)-D₃ et 24,25(OH)₂-D₃ différentes.

La détermination du rendement de dérivation selon la méthode décrite dans la partie « Matériel et méthode » s'est avérée impossible. La quantification de la concentration en 24,25(OH)₂-D₃ non dérivée dans la condition A de la figure 20 est en effet limitée par un manque de sensibilité de notre technique. Ceci nous conforte donc dans notre choix de développement d'une méthode comprenant une étape pré-analytique de dérivation, mais nous contraint à estimer différemment notre réaction de dérivation. Pour ce faire, nous avons vérifié l'absence de détection des composés non dérivés en étudiant les transitions spécifiques de ces métabolites ce qui nous oriente vers un rendement de réaction proche de 100%. Notre observation est par ailleurs confortée par la littérature qui précise la cinétique de la réaction de dérivation par le PTAD. La demi-vie de la réaction est de 1 minute et de 8 minutes, respectivement pour la 25(OH)-D₃ et pour la 24,25(OH)₂-D₃, avec une réaction dite complète (rendement de dérivation > 99%)⁶. *A fortiori*, après 30 minutes d'incubation, notre étape de dérivation peut donc être considérée comme complète.

De plus, l'ajout, dès les premières étapes pré-analytiques, d'étalons internes aux propriétés physico-chimiques semblables aux analytes d'intérêt, permet de s'affranchir d'éventuelles variations de rendement de ces étapes^{6,59}. Les deutériums des étalons internes se situant sur la chaîne latérale de la structure carbonée, à distance du site de la réaction de Diels-Alder (cf. figures 19 et 23), ils n'interfèrent pas avec l'étape de dérivation⁶.

6- Effet de matrice et matrices acceptables

L'effet de matrice a également été établi selon les modalités décrites dans la partie « Matériel et méthodes », par comparaison des conditions B et C de la figure 20. De la même manière que pour l'estimation du rendement d'extraction, trois analyses sur une période de 5 jours ont été effectuées pour chacune des concentrations de nos deux analytes. Les effets de matrices moyens sont cités dans le tableau 12 : on observe des effets de matrices non significativement différents de 0% (Test de Tukey), quelques soient les concentrations en analytes.

		Effet de matrice moyen (%)	Significativement différent de 0% ? (<i>p-value</i>)
25(OH)-D ₃	5 nmol/L	2,1	Non (<i>p</i> =0,9800)
	400 nmol/L	-2,2	Non (<i>p</i> =0,9770)
24,25(OH) ₂ -D ₃	0,5 nmol/L	-1,1	Non (<i>p</i> =0,9983)
	40 nmol/L	4,4	Non (<i>p</i> =0,7830)

Tableau 12 : Estimation de l'effet de matrice

Effet de matrice moyen, en %, pour deux concentrations en 25(OH)-D₃ et 24,25(OH)₂-D₃ différentes.

L'emploi d'étalons internes aux propriétés physico-chimiques semblables aux analytes permet de s'affranchir d'un éventuel effet de matrice ; ce point a néanmoins été vérifié au laboratoire. Nous avons ainsi analysé 6 échantillons sanguins recueillis sur 3 types de tubes différents au cours de la même ponction, tels que cités dans la partie « Matériel et méthodes ». Les résultats des dosages de 25(OH)-D₃ et de 24,25(OH)₂-D₃ ainsi que les VHR correspondants sont visibles sur les graphiques de la figure 37. On observe ainsi que les résultats ne sont pas significativement différents d'une matrice à l'autre. Ceci permet donc d'accepter, avec dérogation, des échantillons qui ne seraient pas prélevés sur tube sec sans gel séparateur, dans le cas où ceux-ci seraient difficilement renouvelables.

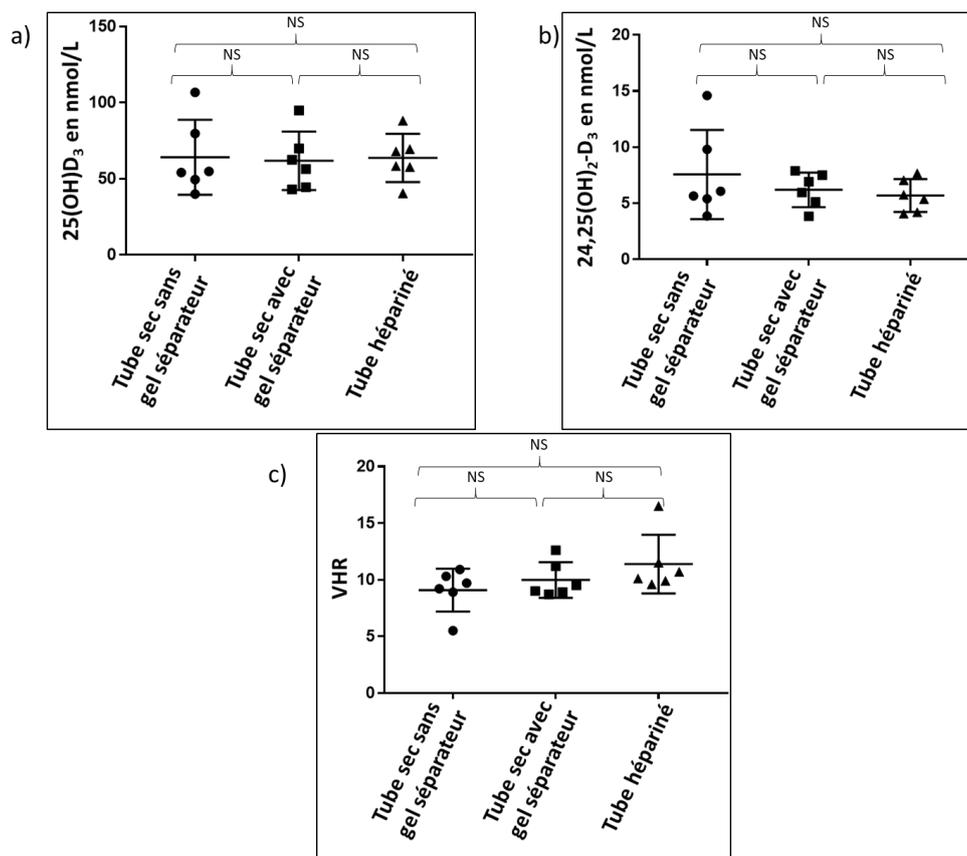


Figure 37 : Matrices acceptables avec dérogation

Dosages de 6 échantillons recueillis sur trois types de tubes différents.

a) 25(OH)-D₃ en nmol/L. b) 24,25(OH)₂-D₃ en nmol/L. c) VHR.

La moyenne des valeurs et l'écart-type sont représentées par les barres horizontales.

NS = Différence Non Significative

7- Exactitude

7-a) Confrontation des résultats aux valeurs cibles des techniques de référence

Les valeurs-cibles pour chaque échantillon ont été établies par des techniques de référence en HPLC-MS/MS au sein de laboratoires de références. Ces valeurs ont été déterminées par la méthode RMP (Reference Measurement Procedure) du NIST dès la session d'octobre 2017 pour le métabolite 25(OH)-D₃. Elles sont déterminées, toujours par une technique de référence HPLC-MS/MS, par le CDC (Center for Disease Control and Prevention) depuis la session d'octobre 2018, et ce pour les métabolites 25(OH)-D₃ et 24,25(OH)₂-D₃, permettant le calcul du VHR cible.

Les figures 38 et 39 présentent les résultats obtenus par notre technique au sein des échantillons de plusieurs sessions du programme DEQAS, respectivement pour la 25(OH)-D₃ et pour la 24,25(OH)₂-D₃ et le VHR. Ils montrent les biais entre nos résultats et la valeur cible, en pourcentage de la valeur cible et hiérarchisés par un code couleur. Ces résultats nous permettent de distinguer 3 périodes durant lesquelles notre méthode a subi des modifications de mise au point ou de réactifs.

Entre avril 2017 et octobre 2017, les solutions mères employées pour l'élaboration des calibrants étaient constituées des composés purs en poudre en flacons ambrés de 1mg (Sigma Aldrich) repris par 1mL d'éthanol absolu afin d'obtenir des solutions d'une concentration de 1mg/mL. Or, on observe dans la figure 38 que pour les sessions d'avril à octobre 2017, nos résultats présentent un biais négatif systématique, toujours supérieur à 10%. Après renseignements auprès du fournisseur, il s'avère que la masse des poudres présente une marge d'erreur importante. Nous avons alors supposé que notre sous-estimation des concentrations en 25(OH)-D₃ des échantillons d'EEQ était due à une sous-estimation des concentrations de nos calibrants, de par une masse de poudre reçue supérieure à 1mg. Pour y remédier, nous avons procédé à l'acquisition de solutions éthanoliques de produits purs à une concentration garantie et vérifiée (Sigma Aldrich).

Entre janvier et juillet 2018, nous avons rencontré des difficultés d'exploitation des chromatogrammes. Ceux-ci présentaient des anomalies de proportion des épimères 6S et 6R, habituellement en proportion constante ^{59,61}. Suite aux résultats peu satisfaisants pour la session de janvier 2018 (cf. figure 38), nous avons procédé en avril et juillet 2018 à une quantification basée non plus sur le pic majoritaire de l'épimère 6S, mais sur l'ensemble des deux pics. Les biais étaient alors moindres en avril, mais supérieurs à 25% en juillet. Néanmoins, le biais systématique négatif auparavant observé semble avoir été corrigé par l'acquisition des solutions mères aux concentrations garanties.

L'acquisition de produit de dérivation PTAD neuf a permis de retrouver les proportions d'isomères 6S et 6R attendues. Nous avons ainsi pu mesurer des concentrations en métabolites 25(OH)-D₃ et 24,25(OH)₂-D₃ et calculer le VHR correspondant avec des biais par rapport aux valeurs cibles très satisfaisants, pour les sessions d'octobre 2018, janvier 2019 et avril 2019 (cf. figures 38 et 39).

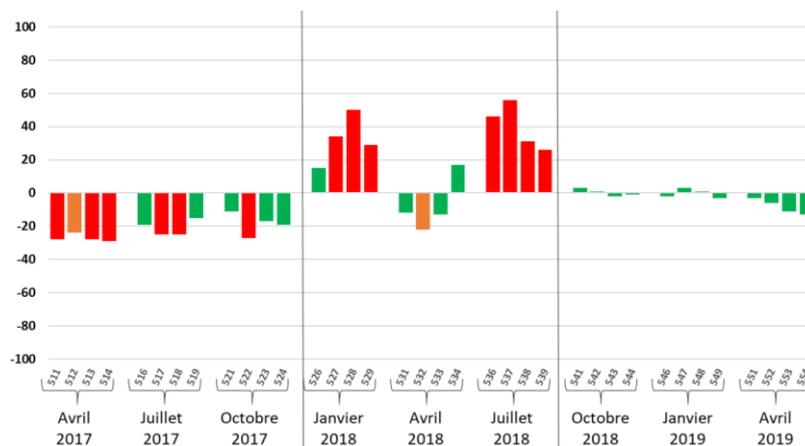


Figure 38 : Résultats d'EEQ pour la 25(OH)-D₃, en comparaison avec les valeurs cibles.

Biais entre nos résultats et la valeur cible pour chaque échantillon, en pourcentage de la valeur cible, pour le dosage du métabolite 25(OH)-D₃ au sein des échantillons d'EEQ fournis par le programme DEQAS. Les valeurs cibles ont été déterminées par une technique de référence du NIST (NIST RPM) entre avril 2017 et juillet 2018 puis par le CDC à partir d'octobre 2018.

En vert : biais < 20%. En orange : 20% < biais < 25%. En rouge : biais > 25%.

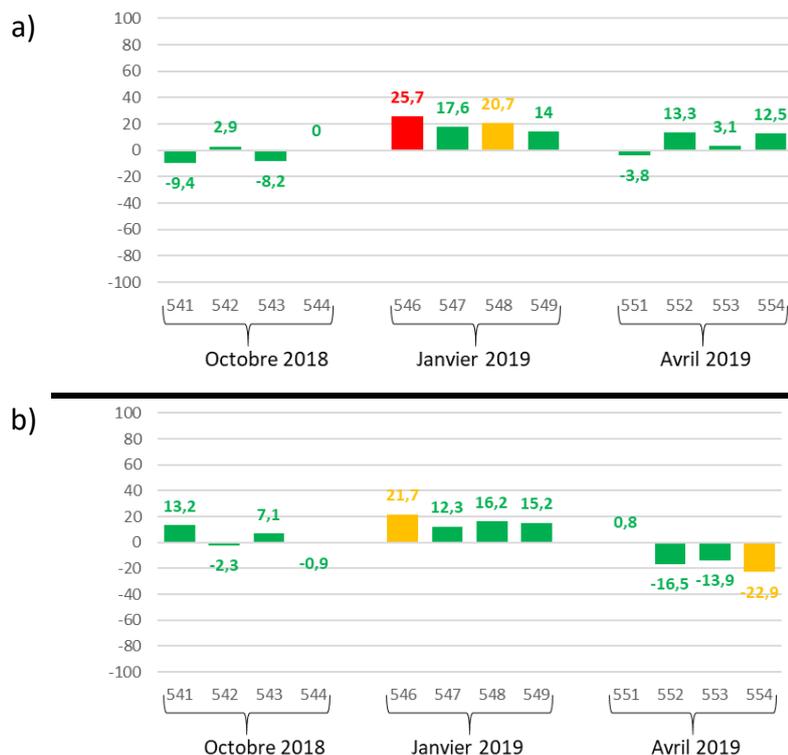


Figure 39 : Résultats d'EEQ pour la 24,25(OH)₂-D₃ et le VHR, en comparaison avec les valeurs cibles.
 Biais entre nos résultats et la valeur cible pour chaque échantillon, en pourcentage de la valeur cible, a) pour le dosage du métabolite 24,25(OH)₂-D₃ et b) pour le VHR au sein des échantillons d'EEQ fournis par le programme DEQAS. Les valeurs cibles ont été déterminées par le CDC.
 En vert : biais < 20%. En orange : 20% < biais < 25%. En rouge : biais > 25%.

7-b) Confrontation des résultats avec le groupe de pairs

La grande majorité des laboratoires participants au programme DEQAS dose les métabolites de type D₂ et D₃ sans distinction là où nous ne dosons que les métabolites D₃. Il ne nous est donc pas paru judicieux d'établir nos performances de dosages vis-à-vis de ceux-ci, et avons décidé de nous restreindre à notre groupe de pairs dosant les mêmes paramètres que nous en HPLC-MS/MS, malgré une puissance statistique limitée. Les données pour notre groupe de pairs sont disponibles depuis la session d'octobre 2017 pour les 3 paramètres 24,25(OH)₂-D₃, 25(OH)-D₃ et VHR.

A chaque session, pour chaque échantillon et chaque paramètre, plusieurs données sont à notre disposition :

- Le nombre n de laboratoires participants inclus dans notre groupe de pairs, compris entre 7 et 10 selon les sessions
- La valeur rendue par notre laboratoire, appelée « VR »
- La médiane des valeurs rendues au sein du groupe de pairs, appelée « cible médiane »
- L'écart-type des valeurs rendues au sein de notre groupe de pairs, appelé « s_D »

Ces données nous permettent de calculer le z-score selon la formule suivante :

$$z\text{-score} = \frac{VR - \text{cible médiane}}{s_D}$$

Plus la valeur du z-score est bas, plus le biais entre notre résultat et ceux du groupe de pairs est faible. La figure 40 représente les z-scores calculés pour les échantillons des sessions d'octobre 2017 à avril 2019, pour les 3 paramètres.

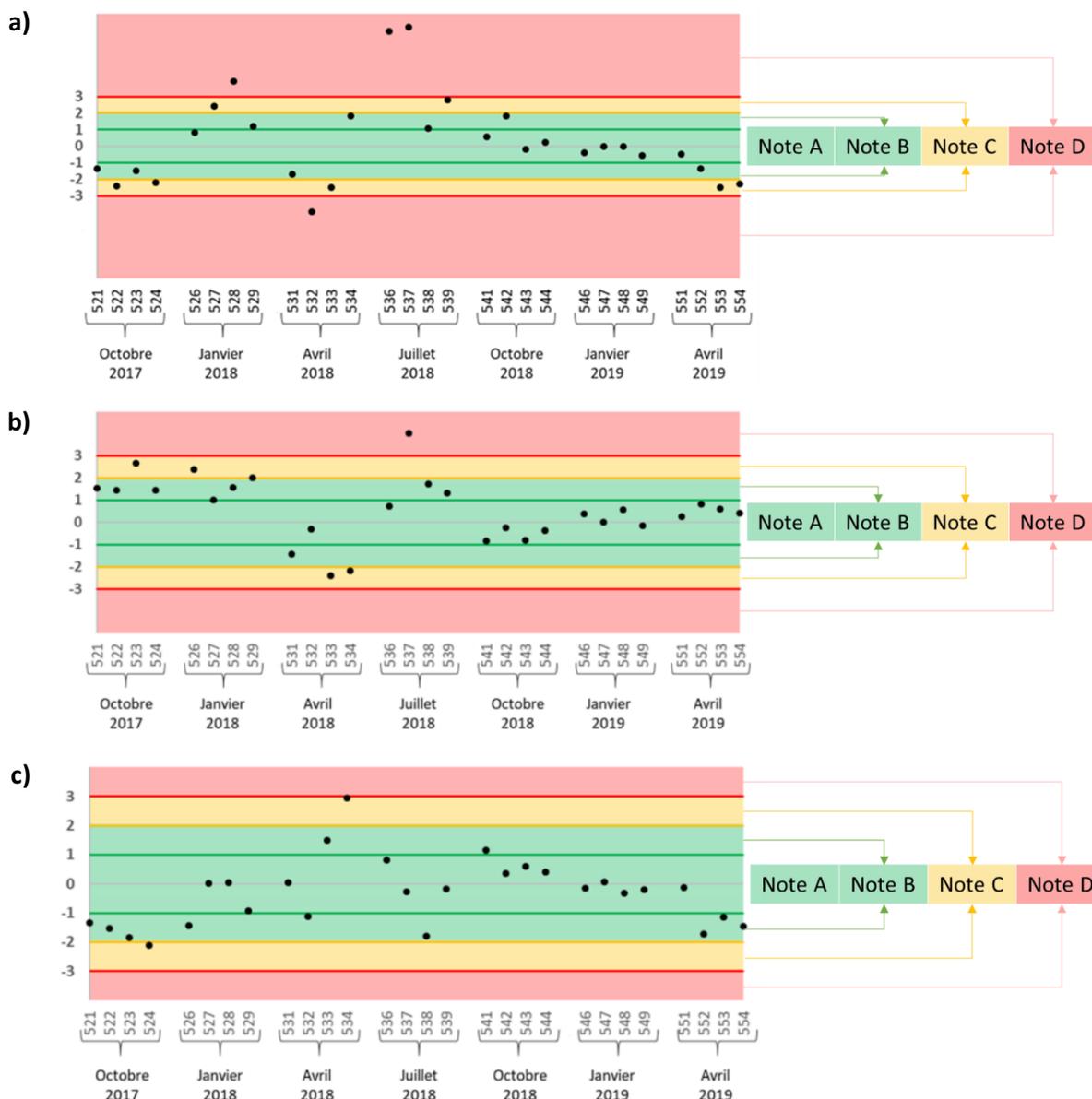


Figure 40 : Résultats des EEQ en comparaison avec le groupe de pairs
Valeurs des z-scores en fonction des échantillons du programme d'EEQ DEQAS entre octobre 2017 et avril 2019 pour a) la 25(OH)-D₃, b) la 24,25(OH)₂-D₃ et c) le VHR

Une note est attribuée en fonction de la valeur du z-score :

- Si $|z\text{-score}| \leq 1,00$: note A (zone verte de la figure 40)
- Si $1,00 < |z\text{-score}| \leq 2,00$: note B (zone verte de la figure 40)
- Si $2,00 < |z\text{-score}| \leq 3,00$: note C (zone jaune de la figure 40)
- Si $|z\text{-score}| > 3,00$: note D (zone rouge de la figure 40)

Les notes B et C nécessitent une attention particulière, notamment aux résultats des EEQ précédents et ultérieurs afin de détecter une éventuelle dérive. Une note D entraîne un rejet de la valeur de l'EEQ et doit faire l'objet d'une enquête approfondie.

Les résultats des EEQ en comparaison avec le groupe de pairs permettent de distinguer les 3 périodes mentionnées au paragraphe « RESULTATS II.7-a) Confrontation des résultats aux valeurs cibles des techniques de référence » page 76.

Entre janvier et octobre 2017, nous travaillions avec des solutions mères en poudre dont la masse fournie ne pouvait être garantie par le fournisseur. On retrouve ainsi le biais systématique négatif en octobre 2017 pour le paramètre 25(OH)-D₃, déjà observé dans la comparaison avec les valeurs cibles (cf. figure 40). En revanche, on observe un biais positif pour le métabolite 24,25(OH)₂-D₃, ce qui laisse supposer que la masse fournie était probablement inférieure à la masse théorique de 1mg pour cet analyte.

Entre janvier et juillet 2018, les difficultés rencontrées dans les étapes de quantification dues à un défaut dans les proportions d'isomérisation de la réaction de dérivation sont également perceptibles. Il en résulte des notes attribuées basses, particulièrement pour le paramètre 25(OH)-D₃. L'impact sur le VHR est néanmoins limité (cf. figure 40 c)). En effet, durant cette période, les difficultés étaient tangibles sur les deux analytes puisque c'est l'étape de dérivation qui était en cause. Les biais allant dans le même sens, le calcul du rapport VHR permet d'en limiter l'impact.

L'utilisation de produits purs en solutions de concentrations garanties associés à un réactif de dérivation non altéré permet d'obtenir des résultats comparables au groupe de pairs entre octobre 2018 et avril 2019, avec des notes plus satisfaisantes.

Il est à noter que pour le VHR, paramètre d'intérêt clinique dans notre travail, les notes sont en grande majorité A et B, plus particulièrement depuis la résolution des problèmes techniques cités ci-avant (cf. figures 40 c) et 41).

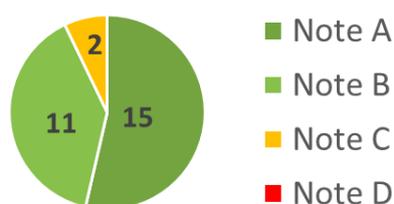


Figure 41 : Notes attribuées en fonction du z-score par rapport au groupe de pairs, pour le VHR
Répartition des notes attribuées en fonction du z-score, par comparaison au groupe de pairs, pour les échantillons d'EEQ du programme DEQAS des sessions d'octobre 2017 à avril 2019. Les chiffres représentent le nombre de fois où la note a été attribuée sur cette période, sur un total de 28 échantillons.

8- Evaluation de la robustesse

Nous avons observé au cours de nos essais que lorsque nous utilisons une phase mobile d'HPLC dont la préparation n'était pas contemporaine à l'essai, les temps de rétention de nos analytes diminuaient au cours de la série d'analyses et la résolution des pics correspondant aux deux isomères de chaque composé était moins satisfaisante. Nous avons attribué cet effet à une variation du pH de notre phase organique B, constituée d'un mélange acétonitrile/eau 50:50 et additionnée de méthylamine (60 μ L/L). Un suivi du pH de ce mélange a mis en évidence une décroissance régulière que nous avons reliée à une diminution de la qualité de nos analyses. Nous avons remédié à cet écueil en modifiant notre méthode HPLC. Initialement, nous employions un mode isocratique avec 100% de phase B telle que décrite précédemment (page 65). Nous sommes passés à un mode isocratique avec 50% de phase B composée d'acétonitrile additionnée de méthylamine (120 μ L/L) et 50% de phase A composée d'eau. De cette manière, la nature de la phase mobile dans la colonne est identique, mais le mélange acétonitrile/eau se fait de manière extemporanée, au sein des pompes du système HPLC.

Nous avons également évalué l'impact des cycles de congélation/décongélation sur nos résultats. Pour ce faire, nous avons sélectionné deux échantillons sériques de patients, l'un au phénotype de *CYP24A1* sauvage et l'autre homozygote muté. Nous avons effectué un premier dosage de ces sérums, puis nous les avons congelés puis décongelés pour analyse 5 fois sur une période de 5 mois. Nous avons donc pu observer la variation des concentrations de 25(OH)-D₃ et de 24,25(OH)₂-D₃ au cours de ces cycles. On peut voir sur la figure 42 que pour chacun des échantillons, la concentration en 25(OH)-D₃ tend à augmenter tandis que celle en 24,25(OH)₂-D₃ tend à diminuer, et ce de manière franche à partir du 5^{ème} cycle de congélation/décongélation. Il en résulte une nette augmentation du VHR, avec le risque de voir apparaître des faux positifs. Nous avons donc fixé une limite de 4 cycles de congélation/décongélation, garantissant des résultats stables.

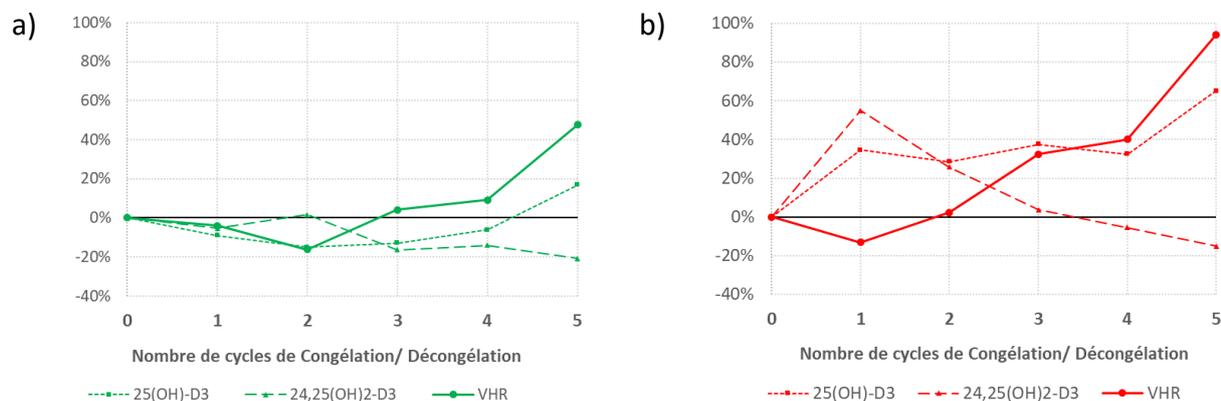


Figure 42 : Détermination du nombre maximal de cycles congélation/décongélation
Pourcentage d'évolution des concentrations en 25(OH)-D₃ et 24,25(OH)₂-D₃ et du VHR en fonction du nombre de cycles de congélation/décongélation de l'échantillon.

a) Chez un patient au CYP24A1 non muté. b) Chez un patient avec mutation biallélique du CYP24A1.

Si les métabolites de la vitamine D ne sont pas thermosensibles, ils sont photosensibles, ce qui nous impose de travailler en garantissant la protection de nos analytes de la lumière. Nous avons ainsi choisi de conserver et traiter nos échantillons dans des tubes préalablement entourés de film d'aluminium, comme certaines équipes avant nous ^{6,10,41,61}. Dans le but de vérifier l'impact de la lumière sur les analytes d'intérêt, nous avons comparé les valeurs obtenues en dosant les mêmes aliquots de sérums de patients et de CIQ, en les protégeant de la lumière d'une part, et sans protection d'autre part. Les pourcentages de différences par rapport aux dosages effectués à l'obscurité sont visibles sur les graphiques a), b) et c) de la figure 43. On observe que le biais n'est pas systématique, avec des discordances majeures dans certains cas, et notamment concernant le VHR. Nous avons par conséquent choisi de poursuivre le dosage à l'obscurité, en protégeant nos tubes de film aluminium.

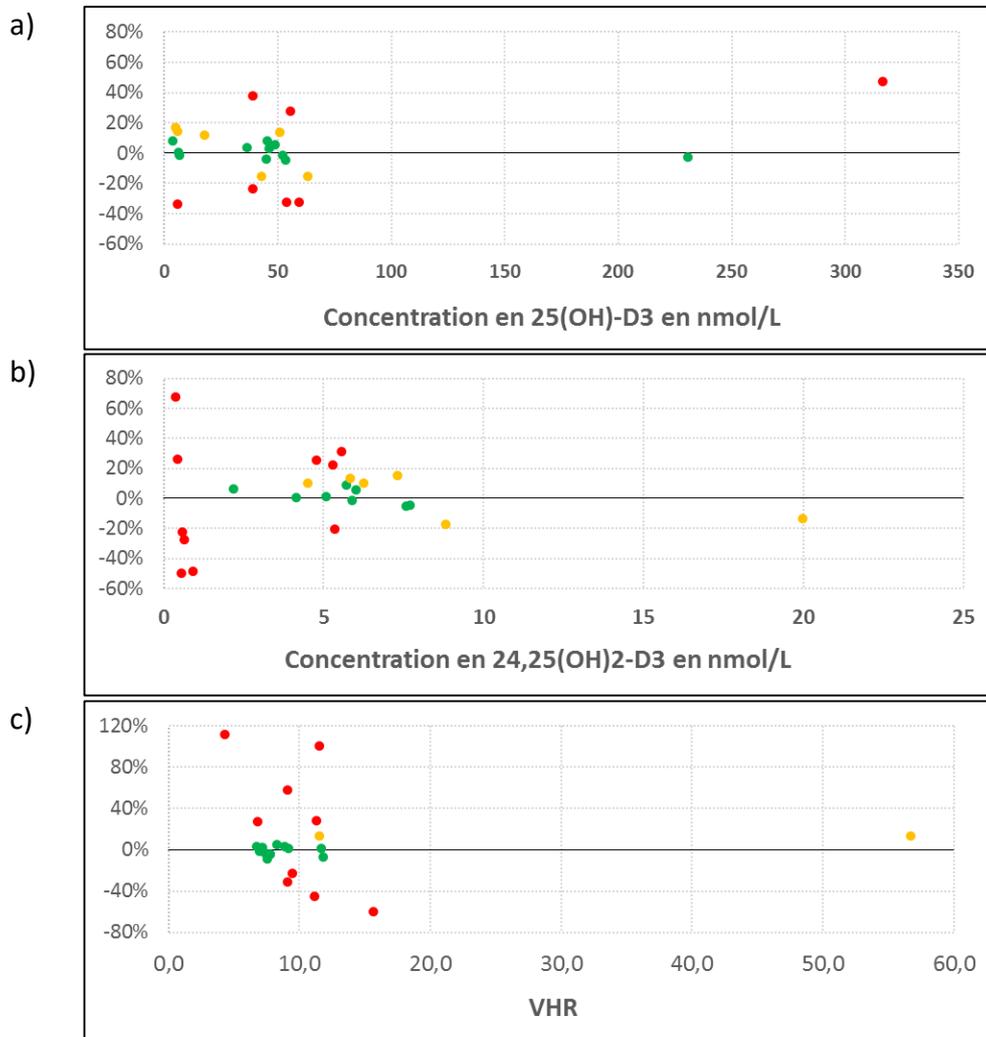


Figure 43 : Evaluation de la nécessité d'une photoprotection

Comparaison des dosages effectués à l'obscurité Vs à la lumière.

L'axe des ordonnées correspond au rapport $\frac{\text{Dosage à la lumière} - \text{Dosage à l'obscurité}}{\text{Dosage à l'obscurité}}$ en pourcentage.

L'axe des abscisses représente a) la concentration en 25(OH)-D₃ en nmol/L, b) la concentration en 24,25(OH)₂-D₃ en nmol/L et c) le VHR.

● = différence > 20%, ● = différence > 10% et ● = différence < 10%.

III. Détermination des valeurs de référence

Nous avons constitué une cohorte de 123 patients hypercalcémiques dont le gène *CYP24A1* a été analysé au laboratoire de Génétique du CHU de Caen. Parmi ceux-ci, 13 d'entre eux ont été diagnostiqués déficitaires en *CYP24A1*, avec un statut hétérozygote composite ou homozygote muté, et constituent la cohorte « IIH ». Les caractéristiques de sexe et d'âge de ces patients sont renseignées dans le tableau 13.

N° Patient	Sexe	Age (au prélèvement)
1	F	44
2	F	35
3	M	53
4	M	10
5	M	30
6	M	37
7	F	28
8	M	13
9	F	4
10	M	35
11	F	44
12	F	44
13	F	24

Tableau 13 : Caractéristiques des patients déficitaires en *CYP24A1*

Pour ces 13 patients atteints d'IIH telle que décrite dans le paragraphe « INTRODUCTION V.5-Définition de l'IIH par mutation du *CYP24A1* » page 24, des dosages de 25(OH)-D₃ et de 24,25(OH)₂-D₃ ont été effectués selon notre méthode précédemment décrite dans ce travail. Nous avons calculé les VHR respectifs et les résultats détaillés sont consultables dans le tableau 14.

Patient	25(OH)-D ₃ en nmol/L	24,25(OH) ₂ -D ₃ en nmol/L	VHR
1	118,8	3,3	36,0
2	86,7	2,3	37,7
3	132,9	2,7	49,2
4	94,3	1,6	58,9
5	90,3	1,8	49,1
6	97,9	2,4	40,8
7	217,2	3,0	73,6
8	121,9	1,7	73,8
9	167,3	2,2	77,8
10	42,8	0,8	52,8
11	47,3	0,7	70,5
12	89,0	1,2	74,2
13	181,0	4,3	42,1

Tableau 14 : Valeurs des 3 paramètres déterminés chez les 13 patients déficitaires en *CYP24A1*

Les concentrations en 25(OH)-D₃ et 24,25(OH)₂-D₃ sont exprimées en nmol/L.

En vert sont renseignées les valeurs comprises dans les intervalles de référence des patients « non IIH » du tableau 15 et en rouge les valeurs non comprises dans ces intervalles.

Nous avons établi des intervalles de référence au sein de cette cohorte de 13 patients au *CYP24A1* muté (cohorte « IIH »), ainsi qu'au sein de la cohorte des 110 autres patients hypercalcémiques (cohorte « non IIH »). Les valeurs de ces intervalles à 95% sont consignées dans le tableau 15. Il est intéressant de noter que les intervalles de référence du VHR ne se chevauchent pas, contrairement aux deux autres paramètres.

	25(OH)-D ₃ en nmol/L	24,25(OH) ₂ -D ₃ en nmol/L	VHR
Patients de la cohorte « IIH » (n=13)	44,1-206,3	0,7-4,0	36,5-76,7
Patients de la cohorte « Non IIH » (n=110)	16,1-146,1	1,2-14,8	5,9-24,3

Tableau 15 : Valeurs de référence déterminées pour les 3 paramètres

*Intervalles de confiance à 95% des dosages de 25(OH)-D₃ et de 24,25(OH)₂-D₃ et du VHR, parmi la cohorte « IIH » de patients déficitaires en *CYP24A1*, i-e les patients mutés homozygotes ou hétérozygotes composites pour le gène *CYP24A1* et parmi la cohorte « non IIH » de patients non déficitaires en *CYP24A1*, i-e les patients non mutés ou hétérozygotes pour le gène *CYP24A1*.*

IV. Performances du VHR et détermination d'un seuil décisionnel

Comme nous l'avons vu précédemment, le calcul du VHR a pour objectif d'orienter, en cas d'anomalie, les patients hypercalcémiques suspectés d'IIH vers une analyse moléculaire du *CYP24A1*. La détermination d'un seuil décisionnel à partir duquel cette analyse est justifiée peut se faire à partir de nos résultats mesurés chez les 123 patients hypercalcémiques au profil moléculaire du *CYP24A1* établi.

Nous avons construit une courbe ROC pour chacun des paramètres mesurés par notre méthode (cf. Figure 44). On peut constater que le VHR, présentant une aire sous la courbe (AUC) bien meilleure que la 25(OH)-D₃ ou même la 24,25(OH)₂-D₃, constitue le paramètre le plus performant dans la distinction des patients « IIH » et « non IIH ». Pour ce paramètre, la sensibilité et la spécificité sont maximales (100% chacune) pour un seuil décisionnel fixé à 31,1 ; à ce seuil, il n'existe donc ni faux négatif, ni faux positif au sein de notre population de 123 patients.

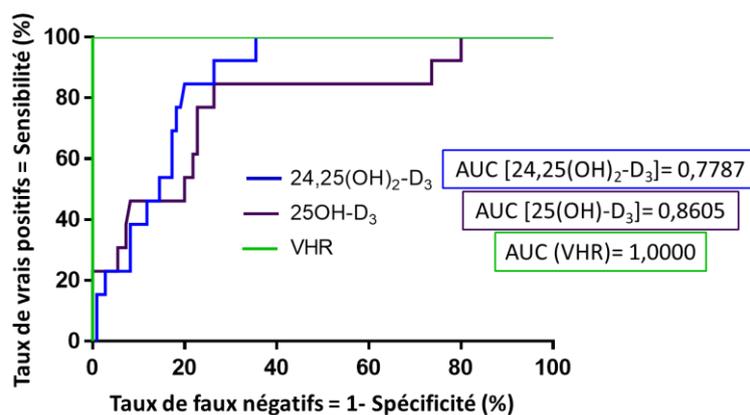


Figure 44 : Courbe ROC des 3 paramètres pour la détection d'un déficit inné en 24-hydroxylase
 Courbe ROC présentant la sensibilité en fonction de 1-spécificité pour chacun des 3 paramètres 25(OH)-D₃, 24,25(OH)₂-D₃ et VHR. La sensibilité et la spécificité sont établies à partir des deux cohortes de populations génétiquement déficitaires (n=13) et non déficitaires (n=110) en 24-hydroxylase.

Il est à noter que, quel que soit le seuil décisionnel choisi pour le VHR (24,1 ou 31,1), l'ensemble des EEQ du programme DEQAS sont non pathologiques (inférieurs au seuil) et donc correctement classés.

DISCUSSION

Depuis les années 1950, de nombreux cas d'IIH ont été recensés, avec l'hypothèse étiologique d'une hypersensibilité innée à la vitamine D. L'étude des différents acteurs du métabolisme de la vitamine D a permis la découverte chez certains patients de mutations fonctionnelles du gène *CYP24A1*, à l'origine d'une perte de l'activité 24-hydroxylase responsable des premières étapes du catabolisme^{9,41,54}. Le ratio VHR tel que nous l'avons défini apparaît comme un bon outil pour estimer cette activité 24-hydroxylase, avec un objectif d'utilisation dans le cadre de screening de patients susceptibles d'être atteints d'IIH par mutation inhibitrice du *CYP24A1*.

Des dizaines de mutations perte de fonction ont été rapportées à l'heure actuelle (cf. paragraphe INTRODUCTION V.5-Définition de l'IIH par mutation du *CYP24A1* page24), mais la fréquence précise de la plupart de celles-ci demeure inconnue. Une équipe polonaise a récemment estimé l'incidence de l'IIH par mutation du *CYP24A1* à environ 1/32 000, par l'étude du variant le plus fréquent p.R396W⁸⁷. On peut donc supposer que des milliers de patients homozygotes ou hétérozygotes composites sont sous-diagnostiqués en Pologne, et *a fortiori* de par le monde, alors qu'ils sont à risque de développer des hypercalcémies sévères⁸⁷. Le développement d'exams de biologie médicale de screening rapides et peu coûteux apparaît ainsi comme un enjeu de santé publique.

Dans ce contexte, nous avons mis au point une méthode de dosage combiné des métabolites 25(OH)-D₃ et 24,25(OH)₂-D₃ dans le but de déterminer le VHR. L'analyse se fait par technique HPLC-MS/MS après précipitation protéique, extraction des analytes d'intérêt par SLE et dérivation chimique par le PTAD.

Les performances de cette méthode sont conformes aux exigences de la norme ISO 15189 avec les limites de conformité définies par la FDA en 2018 pour les techniques séparatives. Elles sont également comparables aux performances des méthodes similaires publiées dans la littérature, notamment en ce qui concerne la répétabilité, la fidélité intermédiaire, les rendements des étapes d'extraction et de dérivation ou encore l'absence de contamination inter-échantillon^{6,8,10,41,42,61,73}. Nous avons démontré empiriquement la robustesse, en corrigeant certains écueils tels que la stabilité du pH de la phase mobile. Les résultats des tests conduits au cours de la validation de méthode indiquent que la technique répond aux exigences de qualité légalement et scientifiquement définies ; ceci nous permet de l'utiliser en routine dans notre laboratoire.

Les valeurs de LLOQ que nous avons déterminées sont-elles compatibles avec les valeurs biologiques attendues et l'objectif de cette analyse ? Les analytes que nous dosons étant chimiquement proches, il paraît logique que leurs LLOQ et LOD soient du même ordre de grandeur^{6,61}. La LLOQ du métabolite 24,25(OH)₂-D₃, de 0,4 nmol/L, est voisine de celle des méthodes optimisées par d'autres équipes^{6,8,10,41,42,61,73}. En revanche, la LLOQ du métabolite 25(OH)-D₃, de 3,4 nmol/L, est entre 4 et 100 fois plus importante que la plupart de ces techniques^{6,10,41,42,61,73}, exceptée celle développée par Bosworth *et al.* en 2012⁸. Les différences observées avec les méthodes développées dans la littérature résultent de disparités dans les protocoles d'extraction ou de dérivation et dans les paramètres et appareils employés en HPLC-MS/MS.

A titre de comparaison, la technique immunologique de dosage de la 25(OH)-D totale utilisée en routine au laboratoire de Biochimie du CHU de Caen présente une LLOQ de 5 nmol/L, du même ordre que notre technique. Cette limite est satisfaisante pour la détermination du statut vitaminique D, au vu de la définition des stades de carence présentés en figure 5 page 15.

Comme nous l'avons vu précédemment, un état carenciel en 25(OH)-D₃ entraîne une augmentation du VHR (cf. figures 11 et 12 pages 27 et 28) par inhibition physiologique de l'expression du CYP24A1^{10,41,42}. Un statut vitaminique D non carenciel doit être obtenu afin d'éviter toute confusion entre une diminution innée et acquise de l'activité 24-hydroxylase. Puisqu'il n'est pas pertinent de calculer le VHR chez des patients dont la concentration en 25(OH)-D₃ est inférieure à 3,4 nmol/L, puisque déficitaires, notre LLOQ peut être considérée comme satisfaisante et adaptée.

Entre nos deux cohortes de patients atteints et exempts d'IIH par mutation du *CYP24A1*, nous avons mis en évidence une différence significative des paramètres 25(OH)-D₃, 24,25(OH)₂-D₃ et VHR. Néanmoins, le tableau 16 montre des exemples de patients pour lesquels seul le VHR permet la mise en évidence d'un déficit inné en 24-hydroxylase, et non les métabolites seuls. Nos résultats confirment ceux de Molin *et al.*⁵⁴ (cf. figure 13), mais également ceux de Ketha *et al.*⁴² préalablement publiés, à savoir qu'il n'est pas possible d'identifier un patient déficient en 24-hydroxylase en se basant uniquement sur les valeurs brutes des concentrations circulantes en 25(OH)-D₃ et 24,25(OH)₂-D₃.

25(OH)-D ₃ (en nmol/L)	24,25(OH) ₂ -D ₃ (en nmol/L)	VHR	Génotype CYP24A1
181,0	<u>4,30</u>	42,1	Biallélique muté
83,2	<u>4,50</u>	18,5	Sauvage
<u>89,0</u>	1,20	74,2	Biallélique muté
<u>88,5</u>	8,37	10,6	Sauvage

Tableau 16 : Seul le VHR permet la mise en évidence d'un déficit en 24-hydroxylase
Exemples de cas pour lesquels seul le VHR permet la distinction entre l'absence et la présence d'un déficit inné en 24-hydroxylase.

Nous avons établi des intervalles de référence pour les 3 paramètres obtenus avec notre technique, au sein de nos deux populations. Le tableau 17 renseigne les intervalles de référence déterminés par d'autres équipes ayant mis au point leurs propres méthodes de dosage, à partir de populations exemptes d'IIH par mutation du *CYP24A1*. On constate que, malgré des populations d'étude très variables (en termes de calcémie, PTH, supplémentation et statut vitaminiques D), les intervalles de référence sont très semblables. Le VHR notamment semble très stable d'une population d'étude à l'autre, en s'appuyant sur les 2,5^{ème} et 97,5^{ème} percentiles de ces populations (cf. tableau 17).

	25(OH)-D ₃ (nmol/L)	24,25(OH) ₂ -D ₃ (nmol/L)	VHR	Méthode de détermination
Méthode présentée dans ce travail	16,1 – 146,1	1,2-14,8	5,9-24,3	2,5 ^{ème} et 97,5 ^{ème} percentiles d'une cohorte de 110 patients hypercalcémiques avec PTH effondrée non génétiquement déficitaires en 24-hydroxylase
Tang <i>et al.</i> ¹⁰	18,9-126,4	1,1 – 13,5	7-23	2,5 ^{ème} et 97,5 ^{ème} percentiles d'une cohorte de 1996 adultes de 18 à 32 ans non supplémentés en vitamine D, avec PTH et calcémie comprises dans leurs intervalles de référence
Ketha <i>et al.</i> ⁴²			7-35	2,5 ^{ème} et 97,5 ^{ème} percentiles d'une cohorte de 91 patients exempts d'anomalie clinico-biologique du métabolisme phosphocalcique et non supplémentés en vitamine D
Kaufmann <i>et al.</i> ⁴¹			< 25	Etude d'une cohorte de 694 femmes ménopausées supplémentées en vitamine D

Tableau 17 : Comparaison des valeurs de référence avec les données de la littérature
Tableau comparatif des valeurs de référence déterminées chez des patients exempts de déficit en 24-hydroxylase inné, i.e. au *CYP24A1* non muté ou hétérozygote.

De même, nous avons déterminé un seuil décisionnel pour le VHR à partir duquel un déficit inné en 24-hydroxylase peut être suspecté, en s'appuyant sur nos deux cohortes de patients. Grâce à la courbe ROC, ce seuil est fixé à 31,1 pour notre méthode, tandis que les valeurs considérées comme seuils par Ketha *et al.* et Kaufmann *et al.* sont plus élevées, respectivement de 99 et 80 ^{41,42}. La différence entre ces valeurs peut s'expliquer entre autres par la méthodologie : là où nous avons déterminé la nôtre par une méthode statistique (courbe ROC), les autres équipes ont fixé leurs seuils sur des observations de cas. Elle s'explique aussi par les disparités techniques des méthodes de dosages (étapes pré-analytiques, systèmes HPLC-MS/MS...). L'impact clinique de ces différences est nul dans la mesure où chaque laboratoire interprète ses résultats par rapport aux seuils qu'il a déterminés. Les valeurs seuils et intervalles de référence ne sont pas transférables d'un laboratoire à l'autre, en l'absence de standardisation des techniques.

Il est à noter que la puissance statistique de notre étude est limitée par le faible nombre de patients recrutés, notamment les patients atteints d'IIH par mutation du *CYP24A1*. Ce travail a pour vocation à être enrichi de nouvelles données de patients afin d'affiner la détermination des performances et le seuil décisionnel du VHR de notre méthode de dosage.

Le protocole pré-analytique a été optimisé afin d'en simplifier l'exécution et d'en minimiser les coûts, tout en garantissant une bonne qualité des résultats obtenus. Cependant, la littérature suggère d'autres options de simplification du processus.

Par exemple, l'équipe d'Aronov *et al.* procède à la construction de la gamme d'étalonnage par dilutions successives d'analytes préalablement dérivés ⁶. Dans un souci d'uniformité de traitement pré-analytique des échantillons et des calibrants, nous avons choisi de procéder à l'étape de dérivation simultanément.

Nous avons vu que la composition de la matrice des calibrants utilisés fait l'objet de nombreuses variations dans la littérature (cf. paragraphe RESULTATS I.7-Optimisation de la gamme d'étalonnage page 69). Nous n'avons pas mis en évidence d'effet de matrice significatif (cf. paragraphe RESULTATS II.6-Effet de matrice et matrices acceptables page 74) et l'addition d'étalons internes appropriés dès les premières étapes du traitement de l'échantillon permet de s'affranchir de l'influence de la matrice. Mais s'il semble possible d'utiliser des solutions de calibrants dans un milieu non sérique (type acétonitrile ^{6,59} ou éthanol ⁸⁵), nous avons maintenu la constitution d'une matrice artificielle telle que décrite

dans ce travail, toujours dans un souci de reproduction des conditions d'analyse des échantillons sériques.

L'utilisation de calibrants de référence, standardisés et élaborés par le NIST, est actuellement rare dans la littérature et limitée à certaines méthodes et métabolites de la vitamine D ¹⁰. Là encore, la question de la composition de la matrice se pose : le standard SRM972 comprenait initialement du sérum équin ⁵⁹, potentiellement à l'origine d'un effet de matrice. Si ce mélange de calibration est à présent constitué de sérum humain, nous avons écarté cette option en raison d'un coût important.

Concernant les étalons internes, leur choix est une gageure pour toute mise au point de technique séparative puisqu'ils doivent associer des propriétés physico-chimiques semblables aux analytes, une stabilité suffisante et un coût économique raisonnable. Pour le dosage des métabolites de la vitamine D, l'équivalent deutéré de la 24,25(OH)₂-D₃ n'est disponible commercialement que depuis récemment à l'étranger. Certains laboratoires ont pu comme nous en sous-traiter la synthèse par d'autres équipes, ou employer des alternatives. Plusieurs équipes ont utilisé un étalon interne commun pour doser la 25(OH)-D₃ et la 24,25(OH)₂-D₃, comme par exemple le d₆-25(OH)-D₃ ^{69,72,73}. Le principal inconvénient est qu'il présente un groupement hydroxyle de moins que la 24,25(OH)₂-D₃, avec une polarité moindre à l'origine d'une variabilité des performances de l'extraction. D'autres méthodes s'appuient sur l'étalon interne d₆-1,25(OH)₂-D₃ ^{6,59,61,67}, mais la co-élution d'interférences diminuant son signal en SM rend difficile son utilisation ⁷³.

Certaines méthodes consistent à pratiquer la dérivaison chimique préalablement à l'étape d'extraction des analytes ⁶⁷. Cette alternative n'a pas été privilégiée pour notre technique, puisque l'équipe de Ding *et al.* a montré une diminution des rendements d'extraction par SPE de par une polarité trop importante des analytes dérivés ⁵⁹.

D'autres équipes s'abstiennent de l'étape de précipitation des protéiques sériques ⁷². Nous pratiquons une extraction SLE par le biais de colonnes Isolute SLE[®], conçues d'après le fournisseur Biotage[®] pour éliminer les phospholipides mais également les protéines. La suppression de cette phase de précipitation protéique étant par conséquent envisageable, des tests seront bientôt effectués.

Par ailleurs, ces colonnes d'extraction Isolute SLE[®] sont prévues pour un chargement d'un volume maximal d'échantillon de 400µL alors que nous n'en déposons que 300µL, en suivant la note d'application de Biotage[®] ⁸⁴. On peut évoquer la possibilité d'extraire un volume plus important d'échantillon, dans le but d'augmenter le signal en SM. Ceci pourra également faire l'objet d'essais dédiés.

La méthode mise au point par l'équipe de Tang *et al.* est inspirée en grande partie de cette même note d'application AN857 de Biotage[®] ⁸⁴. L'étape d'équilibrage des liaisons protéiques entre les analytes d'intérêt et les étalons internes est en revanche supprimée, avec l'emploi d'une solution d'isopropanol/eau 50:50 v:v comprenant les étalons internes. Ainsi, la précipitation protéique concomitante permet de s'abstenir de cette étape d'équilibrage. Là encore, une expérimentation sera prochainement menée.

Concernant la stabilité de nos analytes, nous nous sommes appuyés sur les données de la littérature et des essais pratiqués au laboratoire. Les produits de dérivation sont stables au moins une semaine sans perte de signal que ce soit à température ambiante, à +4°C et à -20°C ⁶. Ceci nous permet de conserver à -20°C les échantillons évaporés ayant subi le traitement pré-analytique, en cas d'indisponibilité du système HPLC-MS/MS. De la même manière, les analytes dérivés remis en solution sont stables 3 jours à +4°C ⁶¹. Il est donc possible de réitérer l'analyse d'échantillons récemment traités, sans nécessité de renouveler le processus pré-analytique. Nous nous sommes fixés une limite de 4 cycles de congélation-décongélation, confirmant les résultats de l'équipe de Wang *et al.* qui a fixé sa limite à 5 cycles ⁶¹. Ceci nous offre la possibilité de ré-analyser complètement un échantillon en cas de besoin.

Il est stipulé dans la littérature que la méthylamine tend à se dégrader au fil du temps au sein des phases mobiles d'HPLC, obligeant à préparer extemporanément ces dernières ⁷⁷. N'ayant cependant pas constaté de perte de signal, nous avons suivi les procédures habituelles du laboratoire, consistant en une préparation de phases mobiles pour plusieurs séries d'analyses. La traçabilité de la surface des pics des solutions de calibration nous permet de détecter une éventuelle diminution du signal.

CONCLUSION ET PERSPECTIVES

En conclusion, nous avons mis au point et optimisé les différentes étapes d'une méthode de dosage simultané par HPLC-MS/MS des métabolites 25(OH)-D₃ et 24,25(OH)₂-D₃, dans le but d'établir un rapport d'utilité clinique, le VHR. Les performances de la méthode sont conformes aux exigences des référentiels ISO 15189 et SH-GTA 04 selon les critères de 2018 de la FDA.

La détermination de ces paramètres a été faite chez des patients dont le diagnostic moléculaire d'IIH par mutation du *CYP24A1* a été soit établi, soit éliminé. Nous avons montré une différence significative des valeurs entre ces deux populations, particulièrement pour le VHR. Des valeurs de référence ont été calculées et montrent une absence de chevauchement des intervalles entre les deux cohortes uniquement pour le VHR. Une sensibilité et une spécificité de 100% pour un seuil décisionnel du VHR de 31,1 conforte ses performances.

Cette méthode est actuellement utilisée en routine au laboratoire de Biochimie du CHU de Caen. Elle apporte des arguments à la décision de conduire une étude génétique du *CYP24A1* chez les patients hypercalcémiques dont les étiologies évidentes ont été rejetées. Il n'est par ailleurs pas nécessaire de répéter le calcul du VHR chez un même patient, excepté en cas de carence vitaminique où un contrôle peut être demandé après supplémentation vitaminique efficace.

Deux études complémentaires sont actuellement en cours de développement. La 1^{ère} va consister à évaluer la relation entre le VHR mesuré chez des nouveau-nés en fonction du terme à la naissance. La 2^{nde} expérimentation a pour but d'établir le lien entre le VHR et le stade d'insuffisance rénale, estimé par le débit de filtration glomérulaire, comme cela a déjà été fait dans la littérature ⁸.

Dans ce travail, une attention particulière a été apportée aux mécanismes d'élévation du VHR. Une diminution de ce dernier peut cependant présenter un intérêt clinique, et faire suspecter une activation excessive du *CYP24A1* qui pourrait expliquer une réponse minorée à la supplémentation vitaminique. En 2011 déjà, Wagner *et al.* a mis en évidence un lien entre le VHR initial et l'augmentation des réserves vitaminiques post-supplémentation ⁷². Le VHR pourrait donc avoir un intérêt dans l'estimation de la réponse à la supplémentation vitaminique, voire dans l'adaptation des doses thérapeutiques.

BIBLIOGRAPHIE

1. Herrmann M, Farrell C-JL, Pusceddu I, Fabregat-Cabello N, Cavalier E. Assessment of vitamin D status - a changing landscape. *Clin Chem Lab Med.* janv 2017;55(1):3-26.
2. Landrier J-F. Vitamine D : sources, métabolisme et mécanismes d'action. *OCL.* mai 2014;21(3):D302.
3. Sizar O, Givler A. Vitamin D deficiency. In: *StatPearls.* Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2018.
4. Holick MF. Vitamin D deficiency. *N Engl J Med.* juill 2007;357(3):266-81.
5. Tissandié E, Guéguen Y, Lobaccaro J-MA, Aigueperse J, Souidi M. [Vitamin D: metabolism, regulation and associated diseases]. *Med Sci MS.* déc 2006;22(12):1095-100.
6. Aronov PA, Hall LM, Dettmer K, Stephensen CB, Hammock BD. Metabolic profiling of major vitamin D metabolites using Diels-Alder derivatization and ultra-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Anal Bioanal Chem.* juill 2008;391(5):1917-30.
7. Schuster I. Cytochromes P450 are essential players in the vitamin D signaling system. *Biochim Biophys Acta.* janv 2011;1814(1):186-99.
8. Bosworth CR, Levin G, Robinson-Cohen C, Hoofnagle AN, Ruzinski J, Young B, et al. The serum 24,25-dihydroxyvitamin D concentration, a marker of vitamin D catabolism, is reduced in chronic kidney disease. *Kidney Int.* sept 2012;82(6):693-700.
9. Schlingmann KP, Kaufmann M, Weber S, Irwin A, Goos C, John U, et al. Mutations in *CYP24A1* and idiopathic infantile hypercalcemia. *N Engl J Med.* août 2011;365(5):410-21.
10. Tang JCY, Nicholls H, Piec I, Washbourne CJ, Dutton JJ, Jackson S, et al. Reference intervals for serum 24,25-dihydroxyvitamin D and the ratio with 25-hydroxyvitamin D established using a newly developed LC-MS/MS method. *J Nutr Biochem.* août 2017;46:21-9.
11. Prosser DE, Kaufmann M, O'Leary B, Byford V, Jones G. Single A326G mutation converts human *CYP24A1* from 25-OH-D₃-24-hydroxylase into -23-hydroxylase, generating 1 α ,25-(OH)₂D₃-26,23-lactone. *Proc Natl Acad Sci U S A.* juill 2007;104(31):12673-8.
12. Hewison M. An update on vitamin D and human immunity. *Clin Endocrinol (Oxf).* mars 2012;76(3):315-25.
13. Wang Z, Wang Y, Xu B, Liu J, Ren Y, Dai Z, et al. Vitamin D improves immune function in immunosuppressant mice induced by glucocorticoid. *Biomed Rep.* janv 2017;6(1):120-4.
14. Kočovská E, Gaughran F, Krivoy A, Meier U-C. Vitamin-D deficiency as a potential environmental risk factor in multiple sclerosis, schizophrenia, and autism. *Front Psychiatry.* mars 2017;8:47.
15. Rafiq S, Jeppesen PB. Is hypovitaminosis D related to incidence of type 2 diabetes and high fasting glucose level in healthy subjects : a systematic review and meta-analysis of observational studies. *Nutrients.* janv 2018;10(1).

16. Alkhatatbeh MJ, Abdul-Razzak KK. Association between serum 25-hydroxyvitamin D, hemoglobin A1c and fasting blood glucose levels in adults with diabetes mellitus. *Biomed Rep.* déc 2018;9(6):523-30.
17. Chandler PD, Tobias DK, Wang L, Smith-Warner SA, Chasman DI, Rose L, et al. Association between Vitamin D Genetic Risk Score and Cancer Risk in a Large Cohort of U.S. Women. *Nutrients.* janv 2018;10(1).
18. Heidari Z, Nikbakht M, Mashhadi MA, Jahantigh M, Mansournia N, Sheikhi V, et al. Vitamin D deficiency associated with differentiated thyroid carcinoma : a case-control study. *Asian Pac J Cancer Prev APJCP.* déc 2017;18(12):3419-22.
19. Heyden EL, Wimalawansa SJ. Vitamin D: Effects on human reproduction, pregnancy, and fetal well-being. *J Steroid Biochem Mol Biol.* juin 2018;180:41-50.
20. Koduah P, Paul F, Dörr J-M. Vitamin D in the prevention, prediction and treatment of neurodegenerative and neuroinflammatory diseases. *EPMA J.* déc 2017;8(4):313-25.
21. Zittermann A. The biphasic effect of vitamin D on the musculoskeletal and cardiovascular system. *Int J Endocrinol.* août 2017;2017:3206240.
22. Kennel KA, Drake MT, Hurley DL. Vitamin D deficiency in adults: when to test and how to treat. *Mayo Clin Proc.* août 2010;85(8):752-7; quiz 757-8.
23. Bischoff-Ferrari HA, Giovannucci E, Willett WC, Dietrich T, Dawson-Hughes B. Estimation of optimal serum concentrations of 25-hydroxyvitamin D for multiple health outcomes. *Am J Clin Nutr.* juill 2006;84(1):18-28.
24. Bouillon R. Comparative analysis of nutritional guidelines for vitamin D. *Nat Rev Endocrinol.* août 2017;13(8):466-79.
25. Haute Autorité de Santé. Vitamine D-Note de cadrage. janv 2013;42.
26. Melamed ML, Michos ED, Post W, Astor B. 25-hydroxyvitamin D levels and the risk of mortality in the general population. *Arch Intern Med.* août 2008;168(15):1629-37.
27. Thomas MK, Lloyd-Jones DM, Thadhani RI, Shaw AC, Deraska DJ, Kitch BT, et al. Hypovitaminosis D in medical inpatients. *N Engl J Med.* mars 1998;338(12):777-83.
28. Autier P, Gandini S. Vitamin D supplementation and total mortality: a meta-analysis of randomized controlled trials. *Arch Intern Med.* sept 2007;167(16):1730-7.
29. Mazidi M, Karimi E, Rezaie P, Vatanparast H. The impact of vitamin D supplement intake on vascular endothelial function; a systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials. *Food Nutr Res.* janv 2017;61(1):1273574.
30. Griffin N, Dowling M. Vitamin D supplementation and clinical outcomes in cancer survivorship. *Br J Nurs Mark Allen Publ.* oct 2018;27(19):1121-8.
31. Manson JE, Cook NR, Lee I-M, Christen W, Bassuk SS, Mora S, et al. Vitamin D supplements and prevention of cancer and cardiovascular disease. *N Engl J Med.* janv 2019;380(1):33-44.

32. Sempos CT, Durazo-Arvizu RA, Dawson-Hughes B, Yetley EA, Looker AC, Schleicher RL, et al. Is there a reverse J-shaped association between 25-hydroxyvitamin D and all-cause mortality? Results from the U.S. nationally representative NHANES. *J Clin Endocrinol Metab.* juill 2013;98(7):3001-9.
33. Durup D, Jørgensen HL, Christensen J, Schwarz P, Heegaard AM, Lind B. A reverse J-shaped association of all-cause mortality with serum 25-hydroxyvitamin D in general practice: the CopD study. *J Clin Endocrinol Metab.* août 2012;97(8):2644-52.
34. Lightwood R. Idiopathic hypercalcaemia with failure to thrive: nephrocalcinosis. *Proc R Soc Med.* 1952;45:401.
35. Lightwood R, Stapleton T. Idiopathic hypercalcaemia in infants. *Lancet Lond Engl.* août 1953;265(6779):255-6.
36. Lightwood R. Hypercalcaemia in Infants and Vitamin D. *Br Med J.* juill 1956;2(4985):149.
37. Smith DW, Blizzard RM, Harrison HE. Idiopathic hypercalcemia ; a case report with assays of vitamin D in the serum. *Pediatrics.* août 1959;24(2):258-69.
38. Kenny FM, Aceto T, Purisch M, Harrison HE, Harrison HC, Blizzard RM. Metabolic studies in a patient with idiopathic hypercalcemia of infancy. *J Pediatr.* avr 1963;62:531-7.
39. Méhes K, Szelid Z, Tóth P. Possible dominant inheritance of the idiopathic hypercalcemic syndrome. *Hum Hered.* 1975;25(1):30-4.
40. Nguyen M, Boutignon H, Mallet E, Linglart A, Guillozo H, Jehan F, et al. Infantile hypercalcemia and hypercalciuria: new insights into a vitamin D-dependent mechanism and response to ketoconazole treatment. *J Pediatr.* août 2010;157(2):296-302.
41. Kaufmann M, Gallagher JC, Peacock M, Schlingmann K-P, Konrad M, DeLuca HF, et al. Clinical utility of simultaneous quantitation of 25-hydroxyvitamin D and 24,25-dihydroxyvitamin D by LC-MS/MS involving derivatization with DMEQ-TAD. *J Clin Endocrinol Metab.* juill 2014;99(7):2567-74.
42. Ketha H, Kumar R, Singh RJ. LC-MS/MS for Identifying Patients with *CYP24A1* Mutations. *Clin Chem.* janv 2016;62(1):236-42.
43. Yoshida T, Fujimori T, Nabeshima Y-I. Mediation of unusually high concentrations of 1,25-dihydroxyvitamin D in homozygous *klotho* mutant mice by increased expression of renal 1 α -hydroxylase gene. *Endocrinology.* févr 2002;143(2):683-9.
44. Streeten EA, Zarbalian K, Damcott CM. *CYP24A1* mutations in idiopathic infantile hypercalcemia. *N Engl J Med.* nov 2011;365(18):1741-2; author reply 1742-1743.
45. Dauber A, Nguyen TT, Sochett E, Cole DEC, Horst R, Abrams SA, et al. Genetic defect in *CYP24A1*, the vitamin D 24-hydroxylase gene, in a patient with severe infantile hypercalcemia. *J Clin Endocrinol Metab.* févr 2012;97(2):E268-274.
46. Tebben PJ, Milliner DS, Horst RL, Harris PC, Singh RJ, Wu Y, et al. Hypercalcemia, hypercalciuria, and elevated calcitriol concentrations with autosomal dominant

- transmission due to *CYP24A1* mutations: effects of ketoconazole therapy. *J Clin Endocrinol Metab.* mars 2012;97(3):E423-427.
47. Meusburger E, Mündlein A, Zitt E, Obermayer-Pietsch B, Kotzot D, Lhotta K. Medullary nephrocalcinosis in an adult patient with idiopathic infantile hypercalcaemia and a novel *CYP24A1* mutation. *Clin Kidney J.* avr 2013;6(2):211-5.
 48. Fencel F, Bláhová K, Schlingmann KP, Konrad M, Seeman T. Severe hypercalcemic crisis in an infant with idiopathic infantile hypercalcemia caused by mutation in *CYP24A1* gene. *Eur J Pediatr.* janv 2013;172(1):45-9.
 49. Colussi G, Ganon L, Penco S, De Ferrari ME, Ravera F, Querques M, et al. Chronic hypercalcaemia from inactivating mutations of vitamin D 24-hydroxylase (*CYP24A1*): implications for mineral metabolism changes in chronic renal failure. *Nephrol Dial Transplant Off Publ Eur Dial Transpl Assoc - Eur Ren Assoc.* mars 2014;29(3):636-43.
 50. Wolf P, Müller-Sacherer T, Baumgartner-Parzer S, Winhofer Y, Kroo J, Gessl A, et al. A case of « late-onset » Idiopathic Infantile Hypercalcemia secondary to mutations in the *CYP24A1* gene. *Endocr Pract Off J Am Coll Endocrinol Am Assoc Clin Endocrinol.* mai 2014;20(5):e91-95.
 51. Nesterova G, Malicdan MC, Yasuda K, Sakaki T, Vilboux T, Ciccone C, et al. 1,25-(OH)₂D-24 hydroxylase (*CYP24A1*) deficiency as a cause of nephrolithiasis. *Clin J Am Soc Nephrol CJASN.* avr 2013;8(4):649-57.
 52. Dinour D, Beckerman P, Ganon L, Tordjman K, Eisenstein Z, Holtzman EJ. Loss-of-function mutations of *CYP24A1*, the vitamin D 24-hydroxylase gene, cause long-standing hypercalciuric nephrolithiasis and nephrocalcinosis. *J Urol.* août 2013;190(2):552-7.
 53. Castanet M, Mallet E, Kottler M-L. Lightwood syndrome revisited with a novel mutation in *CYP24* and vitamin D supplement recommendations. *J Pediatr.* oct 2013;163(4):1208-10.
 54. Molin A, Baudoin R, Kaufmann M, Souberbielle JC, Ryckewaert A, Vantyghem MC, et al. *CYP24A1* mutations in a cohort of hypercalcemic patients : evidence for a recessive trait. *J Clin Endocrinol Metab.* oct 2015;100(10):E1343-1352.
 55. *CYP24A1* | gnomAD [Internet]. [cité 26 août 2019]. Disponible sur: <https://gnomad.broadinstitute.org/gene/ENSG00000019186>
 56. Cools M, Goemaere S, Baetens D, Raes A, Desloovere A, Kaufman JM, et al. Calcium and bone homeostasis in heterozygous carriers of *CYP24A1* mutations: A cross-sectional study. *Bone.* déc 2015;81:89-96.
 57. Dinour D, Davidovits M, Aviner S, Ganon L, Michael L, Modan-Moses D, et al. Maternal and infantile hypercalcemia caused by vitamin-D-hydroxylase mutations and vitamin D intake. *Pediatr Nephrol Berl Ger.* janv 2015;30(1):145-52.
 58. Carter GD. 25-hydroxyvitamin D: a difficult analyte. *Clin Chem.* mars 2012;58(3):486-8.

59. Ding S, Schoenmakers I, Jones K, Koulman A, Prentice A, Volmer DA. Quantitative determination of vitamin D metabolites in plasma using UHPLC-MS/MS. *Anal Bioanal Chem.* sept 2010;398(2):779-89.
60. Heijboer AC, Blankenstein MA, Kema IP, Buijs MM. Accuracy of 6 routine 25-hydroxyvitamin D assays: influence of vitamin D binding protein concentration. *Clin Chem.* mars 2012;58(3):543-8.
61. Wang Z, Senn T, Kalhorn T, Zheng XE, Zheng S, Davis CL, et al. Simultaneous measurement of plasma vitamin D₃ metabolites, including 4 β ,25-dihydroxyvitamin D₃, using liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Anal Biochem.* nov 2011;418(1):126-33.
62. La_quantification_en_spectrometrie_de_masse_triple_quadripoles.pdf [Internet]. [cité 3 janv 2019]. Disponible sur: http://fed-chimiebalard.cnrs.fr/IMG/pdf/La_quantification_en_spectrometrie_de_masse_triple_quadripoles.pdf
63. CFSM. Principe de la source ionisation électrospray [Internet]. Spectrométrie de masse. 2016 [cité 26 août 2019]. Disponible sur: <https://masse-spec.fr/electrospray>
64. Marquet P. Théorie et instrumentation des techniques de LC-MS et LC-MS/MS applicables à la toxicologie. *Ann Toxicol Anal.* mars 2005;17(1):5-12.
65. CHM3102_MS2.pdf [Internet]. [cité 26 août 2019]. Disponible sur: http://www.esi.umontreal.ca/~badiaa/CHM3102_MS2.pdf
66. Fabregat-Cabello N, Farre-Segura J, Huyghebaert L, Peeters S, Le Goff C, Souberbielle J-C, et al. A fast and simple method for simultaneous measurements of 25(OH)D, 24,25(OH)₂D and the Vitamin D Metabolite Ratio (VMR) in serum samples by LC-MS/MS. *Clin Chim Acta Int J Clin Chem.* oct 2017;473:116-23.
67. Duan X, Weinstock-Guttman B, Wang H, Bang E, Li J, Ramanathan M, et al. Ultrasensitive quantification of serum vitamin D metabolites using selective solid-phase extraction coupled to microflow liquid chromatography and isotope-dilution mass spectrometry. *Anal Chem.* mars 2010;82(6):2488-97.
68. Mena-Bravo A, Ferreira-Vera C, Priego-Capote F, Maestro MA, Mouriño A, Quesada-Gómez JM, et al. Quantitative analytical method to evaluate the metabolism of vitamin D. *Clin Chim Acta Int J Clin Chem.* mars 2015;442:6-12.
69. Priego Capote F, Jiménez JR, Granados JMM, de Castro MDL. Identification and determination of fat-soluble vitamins and metabolites in human serum by liquid chromatography/triple quadrupole mass spectrometry with multiple reaction monitoring. *Rapid Commun Mass Spectrom RCM.* mars 2007;21(11):1745-54.
70. Coldwell RD, Trafford DJ, Varley MJ, Kirk DN, Makin HL. Stable isotope-labeled vitamin D, metabolites and chemical analogs: synthesis and use in mass spectrometric studies. *Steroids.* oct 1990;55(10):418-32.
71. DEQAS - Participant Portal [Internet]. [cité 26 août 2019]. Disponible sur: <http://deqas.org/>

72. Wagner D, Hanwell HE, Schnabl K, Yazdanpanah M, Kimball S, Fu L, et al. The ratio of serum 24,25-dihydroxyvitamin D₃ to 25-hydroxyvitamin D₃ is predictive of 25-hydroxyvitamin D₃ response to vitamin D₃ supplementation. *J Steroid Biochem Mol Biol.* sept 2011;126(3-5):72-7.
73. Burild A, Frandsen HL, Jakobsen J. Simultaneous quantification of vitamin D₃, 25-hydroxyvitamin D₃ and 24,25-dihydroxyvitamin D₃ in human serum by LC-MS/MS. *Scand J Clin Lab Invest.* août 2014;74(5):418-23.
74. ChemHelper. Diels-Alder Mechanism [Internet]. [cité 26 août 2019]. Disponible sur: <http://www.chemhelper.com/dielsalder.html>
75. Amplifex_Diene_125DHvD3.pdf [Internet]. [cité 26 août 2019]. Disponible sur: https://sciex.com/Documents/brochures/Amplifex_Diene_125DHvD3.pdf
76. Strathmann FG, Laha TJ, Hoofnagle AN. Quantification of 1 α ,25-dihydroxy vitamin D by immunoextraction and liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Clin Chem.* sept 2011;57(9):1279-85.
77. Lipkie TE, Janasch A, Cooper BR, Hohman EE, Weaver CM, Ferruzzi MG. Quantification of vitamin D and 25-hydroxyvitamin D in soft tissues by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci.* août 2013;932:6-11.
78. Khayamian T, Jafari MT. Design for electrospray ionization-ion mobility spectrometry. *Anal Chem.* avr 2007;79(8):3199-205.
79. Lee D-Y, Chang G-D. Quantitative liquid chromatography-electrospray ionization-mass spectrometry analysis of amine-containing metabolites derivatized with cyanuric chloride and methylamine isotopologues. *J Chromatogr A.* avr 2015;1388:60-8.
80. Zhao H-Y. Improvement of detection sensitivity of triglyceride with methylamine formate as ionization enhancer in reversed phase liquid chromatography-electrospray ionization mass spectrometry. *Chin J Anal Chem.* sept 2017;45(9):1323-9.
81. Higashi T, Shibayama Y, Fuji M, Shimada K. Liquid chromatography-tandem mass spectrometric method for the determination of salivary 25-hydroxyvitamin D₃: a noninvasive tool for the assessment of vitamin D status. *Anal Bioanal Chem.* mai 2008;391(1):229-38.
82. Płotka-Wasyłka J, Marć M, Szczepańska N, Namieśnik J. New polymeric materials for solid phase extraction. *Crit Rev Anal Chem.* sept 2017;47(5):373-83.
83. Silvestro L, Savu SR. An update on solid phase-supported liquid extraction. *Bioanalysis.* 2015;7(17):2177-86.
84. Biotage. Ultra-sensitive method for determining vitamin D₂ and D₃ metabolites in serum [Internet]. 2015 [cité 22 août 2019]. Disponible sur: <https://www.biotage.com/news/ultra-sensitive-method-for-determining-vitamin-d2-and-d3-metabol>

85. Tsugawa N, Suhara Y, Kamao M, Okano T. Determination of 25-hydroxyvitamin D in human plasma using high-performance liquid chromatography--tandem mass spectrometry. *Anal Chem.* mai 2005;77(9):3001-7.
86. Adamec J, Jannasch A, Huang J, Hohman E, Fleet JC, Peacock M, et al. Development and optimization of an LC-MS/MS-based method for simultaneous quantification of vitamin D₂, vitamin D₃, 25-hydroxyvitamin D₂ and 25-hydroxyvitamin D₃. *J Sep Sci.* janv 2011;34(1):11-20.
87. Pronicka E, Ciara E, Halat P, Janiec A, Wójcik M, Rowińska E, et al. Biallelic mutations in *CYP24A1* or *SLC34A1* as a cause of infantile idiopathic hypercalcemia (IIH) with vitamin D hypersensitivity: molecular study of 11 historical IIH cases. *J Appl Genet.* août 2017;58(3):349-53.



UNIVERSITÉ
CAEN
NORMANDIE

U.F.R Santé

Faculté des Sciences Pharmaceutiques

VU, LE PRESIDENT DU JURY

CAEN, LE

VU, LE DIRECTEUR DE LA FACULTE DES SCIENCES PHARMACEUTIQUES

CAEN, LE

L'université n'entend donner aucune approbation ni improbation aux opinions émises dans les thèses et mémoires. Ces opinions doivent être considérées comme propres à leurs auteurs.

TITRE

MISE AU POINT ET VALIDATION D'UNE METHODE DE DOSAGE PAR HPLC-MS/MS DE METABOLITES HYDROXYLES DE LA VITAMINE D

Résumé

L'hypersensibilité à la vitamine D est caractérisée par une hypercalcémie majeure avec hypercalciurie, un taux de parathormone (PTH) effondré et une élévation de la 1,25-dihydroxyvitamine D circulante. Retrouvée chez l'adulte et l'enfant, elle est due dans 20% des cas à une diminution de l'activité 24-hydroxylase de l'enzyme CYP24A1, impliquée dans le catabolisme de la vitamine D. Le diagnostic de ce déficit repose sur des analyses de biologie moléculaire longues, coûteuses et d'interprétation parfois délicate.

L'utilisation du ratio entre les concentrations sériques des métabolites 24,25(OH)₂-vitamine D₃ et 25(OH)-vitamine D₃ a été récemment proposée afin d'identifier les patients susceptibles de présenter un déficit en 24-hydroxylase. Ce rapport, nommé Vitamin D Hydroxymetabolite Ratio (VHR), tend à augmenter chez des patients présentant des mutations sur le gène CYP24A1.

Ce travail a pour objet la mise au point d'une méthode de dosage rapide et simultanée des composés 24,25(OH)₂-D₃ et 25(OH)-D₃ par technique de chromatographie liquide haute performance couplée à la spectrométrie de masse en tandem. La validation de la méthode a été réalisée selon les exigences de la norme ISO 15 189.

Nous avons déterminé des intervalles de référence chez des patients hypercalcémiques avec PTH effondrée. La valeur seuil de 31,1 pour le VHR permet de distinguer avec une sensibilité et une spécificité maximales les patients présentant un déficit en 24-hydroxylase de ceux pour lesquels le gène CYP24A1 n'est pas muté.

Le VHR constitue ainsi une aide au diagnostic différentiel des hypercalcémies et permet un screening simple préliminaire à une étude moléculaire du gène CYP24A1.

TITLE

DEVELOPMENT AND VALIDATION OF AN HPLC-MS/MS ASSAY METHOD FOR VITAMIN D HYDROXYLATED METABOLITES.

Summary

Hypersensitivity to vitamin D is defined by major hypercalcemia with hypercalciuria, sharp decreased level of parathormon (PTH) and increase of circulating 1,25-dihydroxyvitamin D. Diagnosed in adults and children, up to 20% of cases are due to a decline in the 24-hydroxylase activity of the CYP24A1 enzyme, involved in vitamin D catabolism. The diagnostic of this deficiency is based on long and expensive molecular analysis, sometime difficult to interpret.

The use of the ratio between the serum concentrations of the metabolites 25OH-vitamin D₃ and 24,25(OH)₂-vitamin D₃ has recently been suggested to identify patients who might present 24-hydroxylase deficiency. This ratio, named Vitamin D Hydroxymetabolite Ratio (VHR), tends to increase in patients with CYP24A1 mutations.

This work has the objective of developing a fast and simultaneous assay for 24,25(OH)₂-D₃ et 25(OH)-D₃ using high performance liquid chromatography combined with tandem mass spectrometry. Method validation was conducted following the ISO 15189 guidelines.

We set reference ranges for both compounds and VHR in a cohort of hypercalcaemic patients with decreased PTH. A threshold value of 31.1 for VHR allows to identify with maximal sensitivity and specificity patients with 24-hydroxylase deficiency from those without mutation on CYP24A1 gene.

VHR could thus be a support for differential diagnosis of hypercalcemia when classical etiologies have been ruled out and allow a simple screening before molecular analysis of CYP24A1 gene.

Mots-clés

Vitamine D ; Lightwood ; CYP24A1 ; 24,25-dihydroxy-vitamine D ; Hypercalcémie; Néphrocalcinose
