

Université de Montréal

**Développement et validation d'une méthode de séparation et
quantification des acides biliaires sériques par LC-MS/MS, profilage et
comparaison avec la méthode enzymatique traditionnelle**

Par

Caroline Lapierre

Département de biochimie

Faculté de médecine

Mémoire présenté à la faculté des études supérieures
En vue de l'obtention du grade de Maîtrise ès Sciences
en biochimie
Option générale

Juillet 2020

© Caroline Lapierre, 2020

Université de Montréal

Unité académique : Département de biochimie/Faculté de médecine/ Université de Montréal

Ce mémoire intitulé

Développement et validation d'une méthode de séparation et quantification des acides biliaires sériques par LC-MS/MS, profilage et comparaison avec la méthode enzymatique traditionnelle

Présenté par

Caroline Lapierre

A été évalué par un jury composé des personnes suivantes

James Omichinski

Président-rapporteur

Pierre-Olivier Héту

Directeur de recherche

Carine Nyalendo

Membre du jury

Résumé

La cholestase intrahépatique de la grossesse (CIG) est la maladie du foie la plus répandue au cours de la grossesse. Elle est caractérisée par un prurit et est associée à une augmentation de la concentration des acides biliaires dans le sang, ce qui peut mener à un risque accru de conséquences périnatales indésirables, y compris un accouchement prématuré spontané et une augmentation des risques de mort de l'enfant à l'accouchement, entre autres. Le traitement médical de cette maladie repose actuellement sur l'acide ursodésoxycholique (UDCA) qui diminue le prurit et les anomalies biochimiques maternelles dans certains cas. Actuellement, le diagnostic de la CIG est posé suite à un test de quantification des acides biliaires sériques totaux par une méthode enzymatique.

Nous émettons l'hypothèse que certains profils d'acides biliaires permettraient d'évaluer le risque de complications chez les femmes atteintes de CIG. En analysant les profilages, il pourrait être possible de déterminer la ou les espèces responsables de ces complications et ainsi déterminer des sous-groupes de patientes plus à risque de complications ou qui répondraient mieux au traitement. De plus, nous pensons que le traitement à l'UDCA, étant lui-même un acide biliaire, pourrait interférer lors de la quantification des acides biliaires totaux sériques, particulièrement dans les cas les plus problématiques de CIG où de fortes doses de ce composé sont administrées. Si c'était le cas, cela ferait en sorte que les valeurs de référence pourraient être modifiées en fonction du traitement administré.

Le projet de recherche présenté vise au développement d'une méthode de quantification des acides biliaires sériques par la chromatographie liquide couplée à un spectromètre de masse en tandem (LC-MS/MS), qui permettrait un profilage des acides biliaires sériques chez les femmes enceintes atteintes de la CIG et qui permettrait également d'évaluer l'effet du traitement à l'UDCA sur ce profilage.

Une méthode de quantification des acides biliaires par chromatographie liquide couplée à un spectromètre de masse en tandem a été développée et validée. Les surnageants obtenus par précipitation de protéines avec le méthanol ont été injectés sur le LC-MS/MS. La séparation est réalisée par chromatographie en phase inverse sur une colonne C₁₈ de type interactions hydrophobes. Les transitions ioniques sur le spectromètre de masse ont été déterminées pour toutes les espèces d'acides biliaires au préalable et l'acide cholique deutéré, l'acide chénodésoxycholique deutéré ainsi que l'acide désoxycholique deutéré ont été utilisés comme standards internes. Quinze acides biliaires, y compris les acides biliaires conjugués et libres, ont été séparés et quantifiés par LC-MS/MS en utilisant l'ionisation par électro nébulisation (ESI) en mode ion négatif. La quantification a été réalisée en mode de surveillance de réactions multiples (MRM) avec des méthodes de courbes d'étalonnage externes. Les coefficients de corrélation des courbes standards pour tous les acides biliaires étaient supérieurs à 0,9966. La méthode développée a démontré une précision acceptable, avec une imprécision intra analyse inférieure à 3,2% pour toutes les espèces d'acide biliaire étudiées (pour des échantillons à 0,8 et 5 µg/mL) et une imprécision inter analyse inférieure à 15%. Une suppression d'ion moyenne de 8,2% a été observée, qui a été jugée acceptable. Une bonne corrélation a été obtenue entre la méthode LC-MS/MS et une méthode enzymatique (r=0,964).

En conclusion, une méthode fonctionnelle, efficace et rapide a été développée pour quantifier les acides biliaires sériques individuels et différents profils d'acides biliaires représentant une large gamme de concentrations ont été comparés. La comparaison des profilages d'acides biliaires suggère que les acides biliaires principaux responsables de l'augmentation de la concentration des acides biliaires totaux dans le sang pour des échantillons à une concentration de plus de 10 µmol/L sont l'acide cholique glyco-conjugué (GCA), l'acide cholique tauro-conjugué (TCA) ainsi que l'acide ursodésoxycholique glyco-conjugué (GUDCA). Cette nouvelle méthode validée, et les données préliminaires sur les profils d'acides biliaires dans les échantillons cliniques, permettront de lancer des analyses cliniques prospectives pour évaluer l'effet du traitement par l'UDCA sur les concentrations

totales d'acides biliaires sériques et sur les profils d'acides biliaires individuels chez les patientes atteintes de la CIG.

Mots-clés : Foie, Cholestase intrahépatique de la grossesse, Acides biliaires, LC-MS/MS

Abstract

Intrahepatic cholestasis of pregnancy (ICP) is the most common liver disease during pregnancy. It is characterized by pruritus and is associated with an increased concentration of bile acids in blood, which may lead to an increased risk of perinatal consequences, including spontaneous preterm delivery and an increased risk of death at birth, among others. The medical treatment of this disease currently relies on ursodeoxycholic acid (UDCA) which reduces pruritus and maternal biochemical abnormalities in some cases. Currently, the diagnosis of ICP is made using an enzymatic assay to measure total serum bile acids.

We hypothesize that profiling of the individual bile acids would make it possible to assess the risk of complications in women with ICP. By analyzing the bile acid profiles, it could be possible to determine which specie(s) is responsible for these complications and thus to distinguish subgroups of patients at higher risk of complications or who would respond better to treatment. In addition, we believe that UDCA treatment, being a bile acid itself, could interfere with the quantification of total serum bile acids, particularly in the most problematic cases of CIG where high doses of this compound are administered. If this was the case, it would mean that the reference values would need to be changed depending on the administered treatment.

The research project aims to develop and validate a method for quantifying bile acids in serum by liquid chromatography coupled to a tandem mass spectrometer (LC-MS/MS), which would allow profiling of serum bile acids in affected women and which would also make it possible later to evaluate the effects of UDCA treatment on this profiling.

A method for the quantification of bile acids by liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry has been developed and validated. The supernatants obtained by precipitation of proteins with methanol were injected onto the LC-MS/MS. The separation was carried out using reversed-phase chromatography on a C₁₈ hydrophobic interactions type

column. Ionic transitions on the mass spectrometer were determined for all bile acids species beforehand and deuterated cholic acid, deuterated chenodeoxycholic acid and deuterated deoxycholic acid were used as internal standards. Fifteen bile acids, including conjugated and free bile acids, were separated and quantified by LC–MS/MS using electrospray ionization (ESI) in negative ion mode. Quantification was performed in multiple reaction monitoring (MRM) mode with external calibration curve methods. Correlation coefficients for standard curves for all bile acids were greater than 0.9966. The method developed showed acceptable precision, with intra-assay imprecision of less than 3.2% for all the bile acid species studied (for samples at 0.8 and 5 µg/mL) and inter-assay imprecision under 15%. An average ion suppression of 8.2% was observed, which was judged acceptable. Finally, a good correlation was obtained between the LC-MS/MS method and an enzymatic method ($r = 0.964$).

In conclusion, a functional, efficient and rapid method was developed to quantify the individual serum bile acids and different bile acids profiles representing a wide range of concentrations were compared. The comparison of the bile acid profiles suggests that the main bile acids responsible for the increase in total bile acids concentration in blood for samples at a concentration of more than 10 µmol/L are glycocholic acid (GCA), taurocholic acid (TCA), glyoursodeoxycholic acid (GUDCA). This new validated method, and the preliminary data on bile acid profiles in clinical samples, will allow us to initiate prospective clinical analyses to assess the effect of UDCA treatment on total bile acid concentrations and profiles in patients with intrahepatic cholestasis of pregnancy.

Keywords : Liver, Intrahepatic cholestasis of pregnancy, Bile acids, LC-MS/MS

Table des matières

Résumé	i
Abstract.....	iv
Table des matières	vi
Liste des tableaux	x
Liste des figures.....	xi
Liste des sigles et abréviations	xiii
Remerciements	xvi
1 Introduction	1
1.1 Le foie.....	1
1.1.1 Anatomie du foie	1
1.1.2 Pathologies du foie	3
1.1.3 Fonctions du foie	3
1.2 Acides biliaires	5
1.2.1 Structure des acides biliaires	5
1.2.2 Fonctions des acides biliaires	6
1.2.3 Le cholestérol	7
1.2.4 Formation des acides biliaires primaires à partir du cholestérol	10
1.2.4.1 Initiation.....	11
1.2.4.2 Modifications au noyau stéroïdien	12
1.2.4.3 Oxydation des chaînes latérales.....	14
1.2.4.4 Conjugaison.....	15
1.2.4.5 Synthèse des acides biliaires secondaires et tertiaires	17
1.2.5 Présence dans les fluides biologiques.....	18
1.2.6 Cycle entérohépatique	19
1.2.7 Transporteurs des acides biliaires.....	21
1.3 Cholestase intrahépatique de grossesse (CIG).....	22
1.3.1 Prévalence.....	22
1.3.2 Causes.....	23
1.3.3 Risques et complications	24

1.3.4	Symptômes et diagnostic	25
1.3.5	Traitements	27
1.4	Dosage des acides biliaires	28
1.5	Instrumentation	30
1.5.1	Chromatographie liquide	30
1.5.2	Spectrométrie de masse	31
1.6	Projet de recherche	33
1.6.1	Problématique et hypothèse de travail	33
1.6.2	Objectifs	34
1.6.3	Impact	35
2	Méthodologie	36
2.1	Réactifs, solvants et solutions stock	36
2.2	Solutions de travail	36
2.3	Échantillons sanguins	38
2.4	Quantification des acides biliaires par MS/MS	38
2.4.1	Optimisation des paramètres de détection par le détecteur de type quadripôle MS/MS Agilent 6410	38
2.4.1.1	Détermination de la masse des ions précurseurs : Mode SCAN	38
2.4.1.2	Optimisation du fragmenteur	39
2.4.1.3	Sélection de l'ion produit	39
2.4.1.4	Optimisation de l'énergie de collision	39
2.5	Séparation des acides biliaires par chromatographie liquide	40
2.6	Calibrateurs et contrôles de qualité	40
2.7	Analyse des résultats	41
2.8	Préparation des échantillons : Rendement d'extraction des acides biliaires à partir d'échantillons de sérum négatif fortifié	41
2.9	Validation du protocole établi	42
2.9.1	Suppression d'ion	43
2.9.2	Limite de détection (LOD)	43
2.9.3	Précisions intra et inter-jour	43

2.9.4	Linéarité.....	44
2.9.5	Évaluation de la stabilité des échantillons entreposés et congelés/décongelés 44	
2.9.6	Corrélation avec la méthode enzymatique traditionnelle	44
2.10	Exactitude des 2 méthodes pour chaque acide biliaire individuel.....	45
3	Résultats.....	47
3.1	Optimisation des paramètres de détection par le détecteur de type quadripôle MS/MS Agilent 6410.....	47
3.1.1	Détermination de la masse des ions précurseurs (mode SCAN).....	48
3.1.2	Optimisation du fragmenteur (mode SIM).....	49
3.1.3	Sélection de l'ion produit (mode PIS).....	50
3.1.4	Optimisation de l'énergie de collision (mode MRM)	51
3.1.5	Consolidation des 4 paramètres optimisés pour chacun des 18 acides biliaires étudiés	52
3.2	Séparation des acides biliaires par chromatographie liquide.....	53
3.2.1	Sélection de la colonne.....	55
3.2.2	Sélection des phases mobiles.....	56
3.2.3	Sélection des gradients	57
3.3	Rendement d'extraction.....	60
3.4	Limite de détection (LOD)	62
3.5	Imprécisions intra et inter essais.....	64
3.6	Suppression d'ions.....	66
3.7	Linéarité.....	68
3.8	Stabilité des analytes	70
3.9	Corrélation avec le kit colorimétrique de dosage des acides biliaires totaux par GenWay	75
3.10	Profilage des acides biliaires sériques	79
3.11	Sensibilité à chaque acide biliaire individuel	81
4	Discussion.....	87
4.1	Optimisation des paramètres de détection	87

4.2	Optimisation des paramètres de séparation par chromatographie liquide.....	88
4.3	Optimisation de la méthode d'extraction.....	92
4.4	Validation de la méthode.....	93
4.4.1	Limites de détection.....	93
4.4.2	Coefficients de variation intra et inter essai	94
4.4.3	Suppression d'ions.....	94
4.4.4	Linéarité.....	95
4.4.5	Stabilité des analytes dans le sérum	96
4.4.6	Corrélation avec la méthode enzymatique traditionnelle	98
4.5	Sensibilité à chaque acide biliaire individuel	99
4.6	Profilage des acides biliaires	102
5	Conclusion et perspectives	107

Liste des tableaux

Tableau I.	Facteurs de conversion des 15 acides biliaries et 3 standards internes permettant d'exprimer la concentration en $\mu\text{mol/L}$	37
Tableau II.	Paramètres de détection optimisés pour chaque espèce d'acide biliaire, tels que montrés dans la section méthodologie	52
Tableau III.	Temps de rétention des acides biliaries lors de la séparation sur colonne Kinetex XB-C ₁₈ (4,6x100 mm; 2,6 μ), avec les paramètres optimisés	59
Tableau IV.	Rendement d'extraction de chacun des acides biliaries	61
Tableau V.	Limites de détection des acides biliaries	63
Tableau VI.	Imprécision intra et inter essais	65
Tableau VII.	Suppression d'ions de chacun des acides biliaries	67
Tableau VIII.	Sensibilité à chaque acide biliaire individuel fortifié à des concentrations de 4 et 2 $\mu\text{g/mL}$ pour la méthode la méthode LC-MS/MS développée et le kit colorimétrique des acides biliaries totaux par GenWay.....	82
Tableau IX.	Sensibilité à chaque acide biliaire individuel fortifié à des concentrations de 50 et 25 $\mu\text{g/mL}$ pour la méthode la méthode LC-MS/MS développée et le kit colorimétrique des acides biliaries totaux par GenWay.....	84
Tableau X.	Sensibilité à chaque acide biliaire individuel pour la méthode la méthode LC-MS/MS développée et le kit colorimétrique des acides biliaries totaux par GenWay lors de l'ajout de ceux-ci à des échantillons de sérums de concentration en acides biliaries totaux connue.....	86

Liste des figures

Figure 1.	Emplacement et structure du foie	1
Figure 2.	Structure du foie et lobules hépatiques.....	2
Figure 3.	Structure des acides biliaires	6
Figure 4.	Voie de synthèse du cholestérol	9
Figure 5.	Initiation de la formation d'acides biliaires à partir du cholestérol.....	12
Figure 6.	Modifications au noyau cyclique.....	14
Figure 7.	Oxydation de la chaîne latérale	16
Figure 8.	Conjugaison des acides biliaires.....	17
Figure 9.	Circulation entérohépatique des acides biliaires	20
Figure 10.	Lignes directrices pour le diagnostic et le traitement de la CIG	28
Figure 11.	Méthodes enzymatiques couramment utilisées pour la quantification des acides biliaires totaux dans le sérum.....	29
Figure 12.	Représentation du fonctionnement de l'analyseur quadripôle	32
Figure 13.	Détermination de l'ion précurseur par le mode SCAN pour le GCA.....	48
Figure 14.	Optimisation du fragmenteur par le mode SIM pour le GCA	49
Figure 15.	Détermination de l'ion produit par le mode PIS pour le GCA.....	50
Figure 16.	Optimisation de l'énergie de collision par le mode MRM pour le GCA	51
Figure 17.	Comparaison des différents chromatogrammes obtenus en fonction des différentes colonnes utilisées	55
Figure 18.	Comparaison des différents chromatogrammes obtenus en fonction des différentes phases mobiles utilisées	56
Figure 19.	Comparaison des différents chromatogrammes obtenus en fonction des différents gradients testés	57
Figure 20.	Chromatogramme obtenu lors de l'injection de la solution standard contenant les 15 acides biliaires et les 3 standards internes en utilisant les paramètres de séparation optimisés.....	58
Figure 21.	Linéarité de la concentration calculée en fonction de la concentration réelle ($\mu\text{mol/L}$) pour chacune des espèces d'acides biliaires pour des concentrations s'étendant entre 0,2 et 200 $\mu\text{mol/L}$ environ	69

Figure 22.	Stabilité des acides biliaries dans le sérum après 3 cycles de gel/ dégel.....	71
Figure 23.	Stabilité des acides biliaries dans le sérum conservé à température pièce	72
Figure 24.	Stabilité des acides biliaries dans le sérum conservé à 4°C	73
Figure 25.	Stabilité des acides biliaries dans le sérum conservé à -28°C	74
Figure 26.	Corrélation entre la méthode LC-MS/MS développée et le kit colorimétrique des acides biliaries totaux par GenWay	76
Figure 27.	Corrélation entre la méthode LC-MS/MS développée et le kit colorimétrique des acides biliaries totaux par GenWay pour des échantillons de concentrations d'acides biliaries totaux inférieure à 100 $\mu\text{mol/L}$	77
Figure 28.	Corrélation entre la méthode la méthode LC-MS/MS développée et le kit colorimétrique des acides biliaries totaux par GenWay pour des échantillons de concentrations d'acides biliaries totaux supérieure à 100 $\mu\text{mol/L}$	78
Figure 29.	Profilage des acides biliaries en fonction de la concentration en acides biliaries totaux.....	80

Liste des sigles et abréviations

3- α HSD : 3- α hydroxystéroïde déshydrogénase
ACOX2 : *Branched-chain Acyl-CoA oxidase*
AKR1C4 : 3 α -hydroxystéroïde déshydrogénase
AKR1D1 : Δ^4 -3-Oxostéroïde 5 β -Réductase I
ALT : Alanine aminotransférase
ASBT : Transporteur apical d'acide biliaire sodium dépendant
BAL : *Bile acids CoA ligase*
BSDL : Lipase dépendante des sels biliaires
BSEP : Pompe d'exportation de sels biliaires
BSH : Hydrolase d'acide biliaire
CA : Acide cholique
CA-d4 : Acide cholique deutéré
CCK : Cholécystokinine
CDCA : Acide chénodésoxycholique
CDCA-d4 : Acide chénodésoxycholique deutéré
CH25H : Cholestérol 25-hydroxylase
CIG : Cholestase intrahépatique de la grossesse
CQB : Contrôle de qualité, niveau bas (0,8 $\mu\text{g/mL}$)
CQH : Contrôle de qualité, niveau haut (5 $\mu\text{g/mL}$)
CYP27A1 : Stérol 27-hydroxylase
CYP39A1 : 7 α -hydroxylase
CYP46A1 : Cholestérol 24-hydroxylase
CYP7A1 : Cholestérol 7 α -hydroxylase
CYP7B1 : Oxystérol 7-hydroxylase
CYP8B1 : 12 α -hydroxylase
DCA : Acide désoxycholique
DCA-d4 : Acide désoxycholique deutéré
ESI : Électro nébulisation
FXR : Récepteur nucléaire de Farnesoid X

GCA : Acide cholique glyco-conjugué
GCDCa : Acide chénodésoxycholique glyco-conjugué
GDCA : Acide désoxycholique glyco-conjugué
GGT : Gamma-glutamyltranspeptidase
GLCA : Acide lithocholique glyco-conjugué
GUDCA : Acide ursodésoxycholique glyco-conjugué
HMG-CoA : Hydroxy-méthyl-glutaryl-CoA
HSD : Hydroxystéroïde déshydrogénase
HSD3B7 : Δ^4 par la 3β -hydroxy- Δ^5 -C₂₇-steroid oxydoréductase
ICP : *Intrahepatic cholestasis of pregnancy*
LC-MS/MS : Chromatographie liquide couplée à un spectromètre de masse en tandem
LCA : Acide lithocholique
LOD : Limite de détection
LST-1 : *Liver-specific transporter*
NBT : Bleu de nitrotétrazolium
NTCP : Polypeptide cotransportant sodium / taurochlorate
OATP : Polypeptide transportant des anions organiques
OST α/β : Transporteur de soluté organique hétérotrimérique
PIS : *Product ion scan*
SIM : *Single ion monitoring*
TCA : Acide cholique tauro-conjugué
TCDCa : Acide chénodésoxycholique tauro-conjugué
TDCA : Acide désoxycholique tauro-conjugué
TGR5: Récepteur membranaire couplé aux protéines *G Takeda-Gprotein-receptor-5*
TLCA : Acide lithocholique tauro-conjugué
TUDCA : Acide ursodésoxycholique tauro-conjugué
UDCA : Acide ursodésoxycholique

À Chien Jaune

Remerciements

Un énorme merci à mon directeur de recherche, Dr Pierre-Olivier Héту, biochimiste clinique, pour m'avoir donné cette opportunité de maîtrise dans un domaine unique. Merci pour ton partage continu de connaissances et d'expertise. Merci à Dr Jean-François Cailhier, mon parrain, pour ton aide et tes conseils judicieux.

Merci également à tous les technologues et autres membres du personnel du département de biochimie et du laboratoire au CHUM qui m'ont accompagnée dans ce cheminement avec leur bonne humeur et leur précieuse aide. Merci également aux résidents en biochimie clinique et médicale ainsi qu'aux autres stagiaires qui ont croisé mon chemin pendant ces 2 dernières années.

Merci à mes parents, à qui je désire exprimer ma plus profonde gratitude pour leur appui inconditionnel.

Merci à mes frères et à ma sœur comptables, qui ont fait semblant de s'intéresser à mon projet de recherche à quelques reprises durant les 2 dernières années.

Merci à Saath pour ton amour, ta confiance, ta patience infinie et pour tout le reste.

1 Introduction

1.1 Le foie

1.1.1 Anatomie du foie

Le foie est un organe abdominal faisant partie de l'appareil digestif. Il se situe dans le quadrant supérieur droit de l'abdomen, en dessous du diaphragme. Il s'agit du plus grand organe humain, représentant 2 à 3% de la masse corporelle (1). La figure 1 présente l'anatomie et la structure du foie.

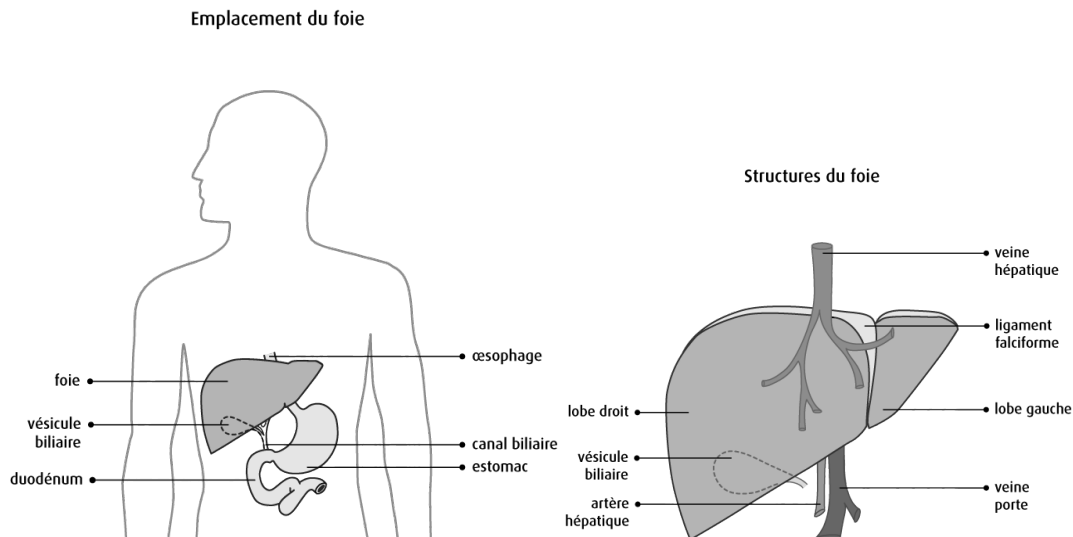


Figure 1. Emplacement et structure du foie

Vu de haut, le foie comporte 2 lobes principaux : le droit (le plus volumineux) ainsi que le gauche (qui se termine en pointe), séparés par le ligament falciforme qui relie le foie à la paroi abdominale antérieure (3). Vu du dessous, 2 parties supplémentaires peuvent être distinguées : les lobes caudé et quadrat, qui se situent entre les lobes gauche et droit. La vésicule biliaire est attachée au foie à la limite de ces 2 lobes. Le foie est organisé en millions de lobules (voir figure 2). Entre ces lobules circulent les vaisseaux sanguins qui alimentent

ceux-ci et récoltent les substances qu'ils produisent, ainsi que des canaux biliaires qui collectent la bile également produite par ceux-ci (4). Une veine centrolobulaire permet l'évacuation du sang des lobules.

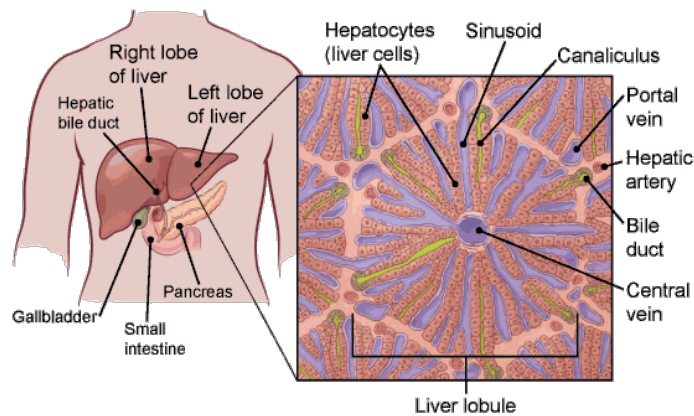


Figure 2. Structure du foie et lobules hépatiques

Les hépatocytes sont les principales cellules du foie et constituent les lobules. Ils permettent une grande variété de réactions biochimiques, dont la synthèse ou la dégradation de petites molécules. Par exemple, ils jouent un rôle important dans le métabolisme des glucides et des lipides, ainsi que dans la synthèse des protéines sanguines. Les hépatocytes ont également un rôle important de détoxification des drogues et autres contaminants environnementaux. Ces fonctions seront abordées dans la section 1,1,3. Le foie comporte 2 sources d'apport sanguin, soient la veine porte et l'artère hépatique. Le sang en provenance de la veine porte contient les nutriments en provenance de l'appareil digestif ainsi que de la rate. L'artère hépatique permet l'apport en sang riche en oxygène en provenance du cœur (5). La veine porte ainsi que l'artère hépatique sont donc principalement responsables des échanges entre le foie et le reste de l'organisme. Les canaux responsables de la formation et du transport de la bile du foie au duodénum se nomment arbre biliaire (1, 5).

1.1.2 Pathologies du foie

L'insuffisance hépatique causée par diverses pathologies du foie est un problème mondial. Les maladies hépatiques représentent toutes les affections du foie. Elles sont nombreuses. La fondation canadienne du foie rapporte qu'un canadien sur 4 serait atteint d'une maladie du foie (6). On compte plus d'une centaine de maladies hépatiques, dont les cancers primitifs du foie qui sont l'un des cancers les plus mortel au Canada (4). On compte également parmi ceux-ci les cancers secondaires (métastases issues d'autres cancers primitifs tels que les carcinomes du colon ou du sein, par exemple), les cirrhoses, et autres, et ces maladies peuvent être aiguës ou chroniques. Les plus fréquentes et les plus mortelles sont les hépatites virales (hépatites chroniques B et C), la maladie alcoolique du foie, la cirrhose, la stéatose hépatique non-alcoolique (SHNA) ainsi que le cancer du foie, comme mentionné plus tôt. Ces dernières maladies représentent environ 95% de tous les décès liés aux pathologies du foie (7). Ces maladies peuvent évoluer sur de longues périodes de temps ou très rapidement. Dans tous les cas, elles débent avec une atteinte aux hépatocytes. Un certain nombre de mécanismes tels que les dommages directs, la stimulation de la réponse immunitaire contre les cellules, la formation d'intermédiaires réactifs, les dommages cytosquelettiques, la perturbation du métabolisme cellulaire normal, le déclenchement de l'apoptose et l'hypoxie sont impliqués dans les lésions hépatocellulaires (8, 9). Dans cette revue, on s'intéresse particulièrement à la cholestase intrahépatique de la grossesse, qui sera abordée au point 1,7.

1.1.3 Fonctions du foie

Le foie a plusieurs fonctions vitales pour l'organisme, telles que des fonctions nutritionnelles, des fonctions de synthèse, des fonctions antitoxiques, et autres (10, 11). Il joue un rôle important dans le métabolisme des glucides alors que ceux-ci (glucose, fructose, galactose) sont transformés en glycogène qui est stocké dans les hépatocytes. Selon les besoins, ce glycogène est de nouveau transformé en glucose, qui est relâché dans la circulation sanguine. En cas de manque de glycogène, les cellules hépatiques peuvent aussi faire de la néoglucogenèse qui correspond à la formation de glucose à partir d'acides aminés (12). Le

foie joue également un rôle dans le métabolisme des lipides. Les lipides parvenant au foie sont transformés en triglycérides et stockés dans les cellules hépatiques. En fonction des besoins énergétiques du corps, ces triglycérides peuvent ensuite être divisés en acides gras et ceux-ci peuvent être dégradés afin de produire de l'énergie sous forme d'ATP (13). Les hépatocytes permettent aussi la synthèse d'une grande variété de protéines sanguines à partir des protéines et acides aminés issus du système digestif. Parmi celles-ci, on retrouve l'albumine, les globines ainsi que les facteurs de coagulation (14).

Les fonctions antitoxiques du foie proviennent de la capacité de celui-ci à dégrader des substances toxiques pour l'organisme. Les toxines peuvent être endogènes, présentes naturellement dans les déchets produits par l'organisme (l'ammoniac, par exemple) ou exogènes (consommation d'alcool, par exemple). Les produits liposolubles sont envoyés dans l'intestin et sont éliminés dans les selles. Les produits hydrosolubles seront quant à eux envoyés dans le sang et éliminés dans l'urine. Le foie permet également l'élimination de la bilirubine, un produit de dégradation des globules rouges qui ont une durée de vie d'environ 120 jours (15). La bilirubine libre produite par la rate lors de la dégradation des globules rouges est toxique pour l'organisme et sera transformée en bilirubine conjuguée et non toxique avant d'être sécrétée dans la bile et éliminée dans les selles (16, 17).

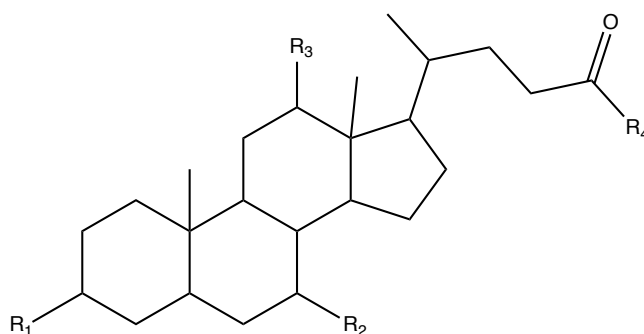
Les principales fonctions du foie comprennent également la formation et la sécrétion de la bile (5). Les hépatocytes sécrètent de la bile de façon continue. La bile est un liquide jaune-vert constitué d'entre 85 et 95% d'eau, contenant entre autres les acides biliaires, mais également du cholestérol, des phospholipides, de la bilirubine, et d'autres substances inorganiques (5). Sous le foie se trouve une petite poche permettant le stockage de la bile, il s'agit de la vésicule biliaire. Le foie est composé de canaux biliaires, permettant la circulation de la bile vers la vésicule biliaire pour l'y emmagasiner, ou encore vers l'intestin grêle pour l'excréter. Ces canaux collectent la bile et permettent son transport vers la sortie du foie, dans le canal hépatique commun, qui mène au duodénum (18). Le transport de la bile et des acides biliaires sera abordé de façon approfondie à la section 1,6. En plus de ses propriétés

détergentes qui aident à la digestion des graisses, la bile a pour fonction de transporter vers l'intestin les produits liposolubles à éliminer dans les selles (19).

1.2 Acides biliaires

1.2.1 Structure des acides biliaires

Les acides biliaires sont des composés de 24 carbones synthétisés par les hépatocytes à partir du cholestérol exogène ou endogène (20). Ils sont les plus importants constituants de la bile après l'eau. Leur synthèse se fait suite à l'oxydation du cholestérol dans le foie par la voie du cytochrome p450 (18). La concentration en acides biliaires dans le sang représente l'équilibre entre la clairance par le foie et l'absorption faite au niveau de l'intestin. Les acides biliaires se classent en 3 groupes : les acides biliaires primaires, secondaires et tertiaires. Les acides biliaires primaires synthétisés par le foie à partir du cholestérol sont l'acide cholique (CA) et l'acide chénodésoxycholique (CDCA). Les acides biliaires secondaires, soient l'acide désoxycholique (DCA) et l'acide lithocholique (LCA), sont les produits d'une réaction faite par l'action bactérienne au niveau de l'iléon et du colon. Un acide biliaire tertiaire, l'acide ursodésoxycholique (UDCA), est également détectable sous forme de trace dans le sang chez l'humain (21). L'UDCA est synthétisé par la modification d'acides secondaires par des microbes du tube digestif ainsi que par des activités métaboliques au niveau du foie (21). Chacun de ces 5 acides biliaires peut être conjugué avec la glycine ou la taurine avant qu'il ne quitte le foie, ce qui fait un total de 15 formes d'acides biliaires principaux possibles (voir figure 3). La conjugaison avec la taurine ou la glycine augmente leur solubilité. De plus, une fois conjuguées, les molécules sont trop grandes pour diffuser à travers les jonctions paracellulaires. Pour ces deux dernières raisons, les acides biliaires conjugués sont fortement concentrés dans l'intestin grêle, ce qui est très important pour permettre une bonne digestion des lipides (22, 23).



Nom	R1	R2	R3	R4
Acide cholique (CA)	OH	OH	OH	OH
Acide chénodésoxycholique (CDCA)	OH	OH	H	OH
Acide désoxycholique (DCA)	OH	H	OH	OH
Acide ursodésoxycholique (UDCA)	OH	OH	H	OH
Acide lithocholique (LCA)	OH	H	H	OH
Acide cholique tauro-conjugué (TCA)	OH	OH	OH	NHCH ₂ CH ₂ SO ₃ ⁻
Acide chénodésoxycholique tauro-conjugué (TCDCA)	OH	OH	H	NHCH ₂ CH ₂ SO ₃ ⁻
Acide désoxycholique tauro-conjugué (TDCA)	OH	H	OH	NHCH ₂ CH ₂ SO ₃
Acide ursodésoxycholique tauro-conjugué (TUDCA)	OH	OH	H	NHCH ₂ CH ₂ SO ₃ ⁻
Acide lithocholique tauro-conjugué (TLCA)	OH	H	H	NHCH ₂ CH ₂ SO ₃ ⁻
Acide cholique glyco-conjugué (GCA)	OH	OH	OH	NHCH ₂ COO ⁻
Acide chénodésoxycholique glyco-conjugué (GCDCA)	OH	OH	H	NHCH ₂ COO ⁻
Acide désoxycholique glyco-conjugué (GDCA)	OH	H	OH	NHCH ₂ COO ⁻
Acide ursodésoxycholique glyco-conjugué (GUDCA)	OH	OH	H	NHCH ₂ COO ⁻
Acide lithocholique glyco-conjugué (GLCA)	OH	H	H	NHCH ₂ COO ⁻

Figure 3. Structure des acides biliaires

1.2.2 Fonctions des acides biliaires

Les acides biliaires jouent un rôle important dans la digestion des graisses. Ils ont des propriétés amphipatiques et ont donc une grande capacité de détergent, ce qui permet la formation de gouttelettes de graisse (émulsion) permettant la digestion des lipides par l'action

de la lipase pancréatique, entre autres (22). C'est également par cette fonction qu'ils permettent la solubilisation du cholestérol, ainsi que des vitamines et autres nutriments liposolubles. En effet, ces acides biliaires conjugués facilitent la formation de micelles, ce qui favorise l'absorption des triglycérides, permettant un meilleur accès pour les lipases et menant à leur digestion (18). La lipase dépendante des sels biliaires (BSDL) est un exemple de lipase qui catalyse l'hydrolyse des esters de cholestérol en cholestérol libre et en acides gras afin de permettre leur absorption par la muqueuse intestinale (24). Les vitamines A, D, E et K sont des exemples de vitamines nécessitant une incorporation dans les micelles pour être absorbées (25). Les acides biliaires ont également d'autres fonctions, notamment la liaison de métaux lourds sous forme de cations tels que le zinc ou le fer excrétés dans les voies biliaires (26). Ils agissent comme des molécules de signalisation sur divers récepteurs, avec des effets en aval sur le métabolisme. Le récepteur nucléaire de Farnesoid X (FXR) et le récepteur membranaire couplé aux protéines G Takeda-Gprotein-receptor-5 (TGR5) sont des exemples de ces récepteurs contrôlés par les acides biliaires. La grande variété d'acides biliaires individuels permet plusieurs fonctions de contrôle de la synthèse, recyclage et modifications des voies en réponse à des facteurs environnementaux (24, 27). Les acides biliaires sont également très importants pour l'homéostasie du cholestérol alors que leur formation est une forme d'élimination de celui-ci.

1.2.3 Le cholestérol

Le foie assure l'absorption, la synthèse et la sécrétion des lipides et lipoprotéines. De plus, le foie est essentiel à l'homéostasie du cholestérol dans le corps. Le cholestérol est un lipide fabriqué par le foie. Il accomplit plusieurs fonctions essentielles et est présent dans les aliments consommés issus de source animale. Il est un important constituant des membranes des cellules alors qu'il leur confère leur stabilité. Il est un précurseur des hormones stéroïdiennes, par exemple la testostérone ou encore la cortisone, ainsi que des acides biliaires.

Le cholestérol peut provenir de source alimentaire, et peut également être synthétisé de novo dans le foie, l'intestin, la peau et les muscles, entre autres (20). La voie de biosynthèse

du cholestérol est complexe et implique plus de 30 réactions et plus d'une dizaine d'enzymes. Le substrat initial de cette voie de biosynthèse est l'hydroxy-méthyl-glutaryl-CoA (HMG-CoA). L'HMG-CoA provient de la condensation de trois acétyl-CoA venant des peroxyosomes. L'étape importante de la voie de la synthèse du cholestérol est la transformation de l'HMG-CoA en mévalonate par l'HMG-CoA réductase. Le mévalonate produit est ensuite décarboxylé en isoprénoïdes de 5 carbones. La condensation de 6 isoprénoïdes de 5 carbones mène à un squalène de 30 carbones par l'enzyme squalène synthase. Dans un 3^e temps, le squalène est cyclisé afin de produire le lanostérol, qui est finalement converti en cholestérol (28, 29). La voie de synthèse du cholestérol est illustrée à la figure 4.

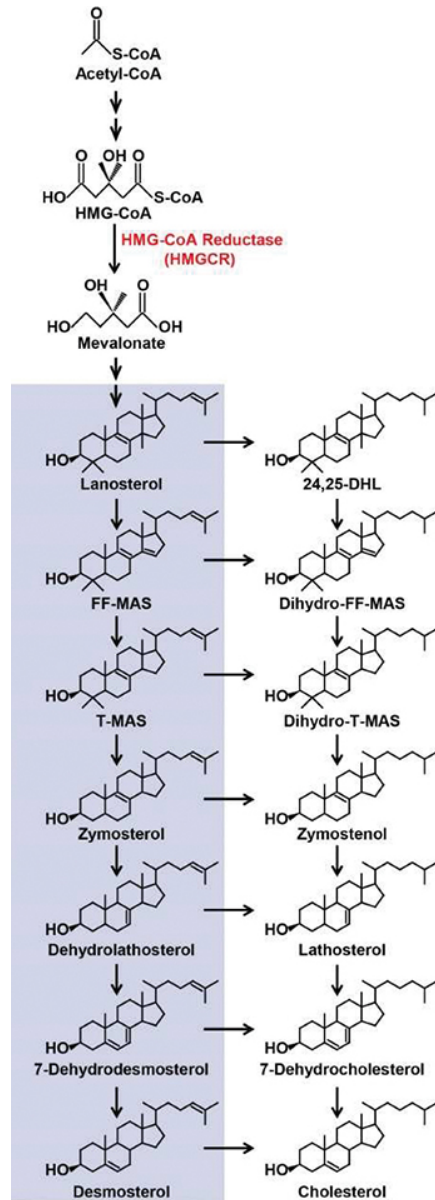


Figure 4. Voie de synthèse du cholestérol

L'étape limitante est la transformation de l'HMG-CoA en mévalonate par l'HMG-CoA réductase (rouge). À gauche : Voie Bloch. À droite : Voie Kandutsch-Russel.

Le cholestérol est transporté dans le sang par des lipoprotéines de basse densité (LDL) et de haute densité (HDL). Les lipoprotéines de haute densité captent le cholestérol qui se dépose dans les artères et le transportent vers le foie où il sera dégradé. Les lipoprotéines de

basse densité, quant à elles, fixent le cholestérol sur les parois des artères, ce qui entraînent des plaques lipidiques dans ceux-ci. Cela peut mener à un blocage des artères.

L'hypercholestérolémie est une condition médicale qui survient lorsqu'un excès de cholestérol est présent dans le sang (31). Cette condition peut fortement augmenter les chances de développer une maladie cardiovasculaire, qui est la cause principale de décès chez les adultes aux États-Unis. Les statines sont le traitement principal de l'hypercholestérolémie. Elles permettent une diminution du taux de cholestérol dans le sang par l'inhibition de la HMG-CoA réductase et une restauration de l'homéostasie du cholestérol. Cependant, les statines ont des limitations tel le développement d'une résistance au traitement, entre autres. Des thérapies complémentaires peuvent également être utilisées dans les cas extrêmes, y compris la niacine et les séquestrants des acides biliaires (31).

1.2.4 Formation des acides biliaires primaires à partir du cholestérol

Chaque jour, des acides biliaires sont synthétisés à partir du cholestérol avec l'aide de 17 enzymes afin de remplacer ceux perdus lors du cycle entérohépatique, qui sera abordé à la section 1.2.6 (20). En moyenne, environ 500 mg de cholestérol sont éliminés par la synthèse d'acides biliaires chaque jour. Ces 17 enzymes sont exprimés préférentiellement dans le foie, mais leur présence n'est pas exclue dans d'autres tissus. Les acides biliaires synthétisés à partir du cholestérol dans les hépatocytes sont les acides biliaires primaires. Chez l'homme, l'acide cholique et l'acide chénodésoxycholique sont les 2 acides biliaires primaires. 4 étapes principales mènent à la formation des acides biliaires primaires : l'initiation, la modification des structures cycliques, l'oxydation des chaînes latérales ainsi que la conjugaison avec un acide aminé. La figure 5 présente les différentes voies d'initiation.

1.2.4.1 Initiation

Plusieurs voies sont possibles, impliquant des enzymes de type cytochrome P450. Dans la voie classique, le cholestérol est converti en 7α -hydroxycholestérol par le cholestérol 7α -hydroxylase (CYP7A1) (figure 5, réaction 1). Dans la voie alternative, une modification sur la chaîne latérale a d'abord lieu. Cela mène à des intermédiaires absents de la voie classique. Celle-ci peut être initiée par l'enzyme stérol 27-hydroxylase (CYP27A1), la cholestérol 24-hydroxylase (CYP46A1) ou la cholestérol 25-hydroxylase (CH25H) qui forment les oxystérols 27-hydroxycholestérol, 24S-hydroxycholestérol et 25-hydroxycholestérol, respectivement (Figure 5, réactions 2, 3 et 4) (20, 32). Les oxystérols sont ensuite hydroxylés sur le carbone 7. L'enzyme oxystérol 7α -hydroxylase (CYP7B1) permet l'hydroxylation des oxystérols produits par les enzymes CH25H et CYP27A1. L'enzyme oxystérol 7α -hydroxylase (CYP39A1) permet l'hydroxylation du produit de la réaction de CYP46A1 (22). En condition physiologique normale, la voie classique de synthèse est considérée comme la principale voie alors que la voie alternative n'est responsable de la synthèse que de 15% des acides biliaires environ (22, 33).

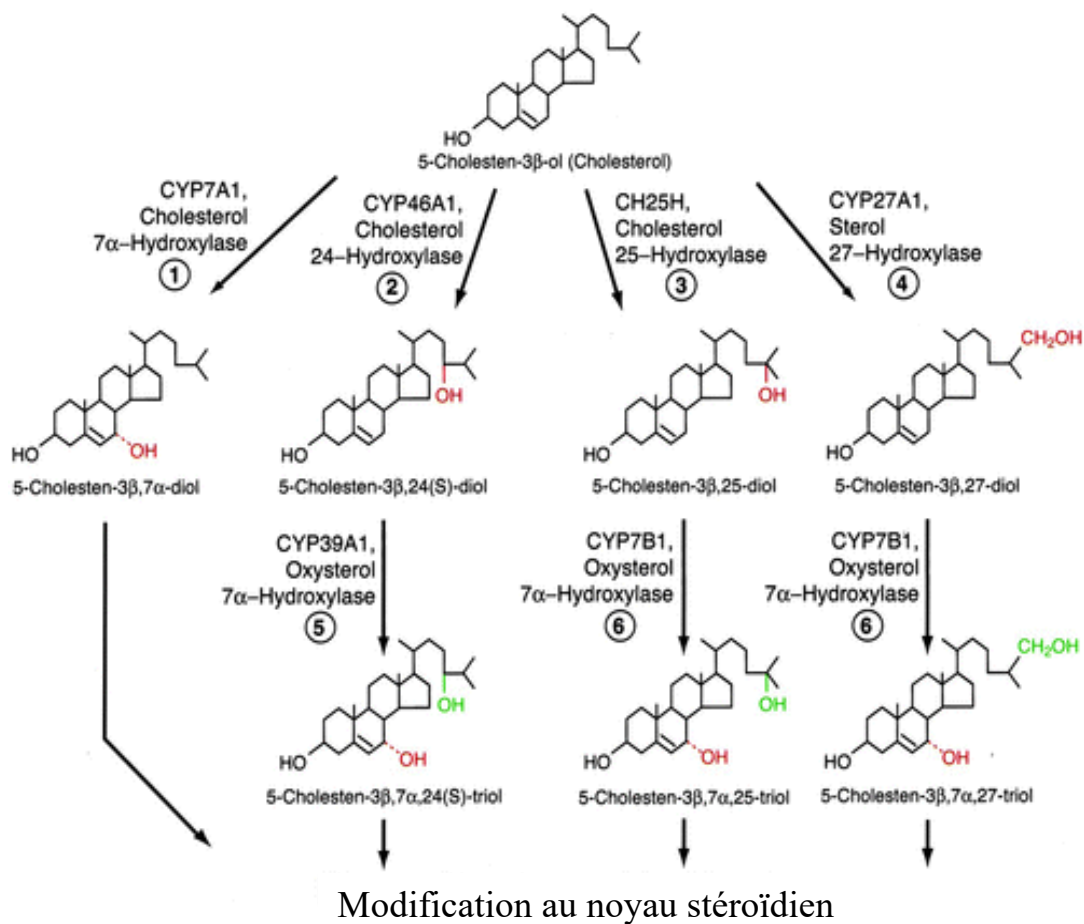


Figure 5. Initiation de la formation d'acides biliaires à partir du cholestérol

Les enzymes impliquées pour chaque étape sont indiquées à côté des flèches. La modification introduite est indiquée en rouge sur le produit. En vert sont représentés les changements cumulatifs. Les produits formés sont les substrats pour l'étape subséquente de la formation des acides biliaires : la modification au noyau stéroïdien.

1.2.4.2 Modifications au noyau stéroïdien

Les étapes suivantes de la synthèse des acides biliaires permettent l'élimination de la double liaison, ainsi que l'introduction du groupement hydroxyl en C12. La figure 6 présente les grandes lignes de cette étape. Tous les intermédiaires 7 α -hydroxylés obtenus lors de la phase d'initiation sont convertis en forme 3-oxo, par la 3 β -hydroxy- Δ 5-C₂₇-steroid

oxidoreductase (HSD3B7) (33). Le produit de cette réaction peut interagir avec l'enzyme Δ^4 -3-Oxosteroid 5 β -Reductase (AKR1D1) directement ou subir une modification par l'enzyme 12 α -hydroxylase (CYP8B1) avant que l'AKR1D1 agisse sur le produit occasionné. Ces 2 voies mènent à la formation d'acide cholique (AC) (implication de CYP8B1) ou encore d'acide chénodésoxycholique (CDCA) (sans implication de CYP8B1). AKR1D1 agit pour effectuer une 5 β -réduction. Par la suite, l'enzyme 3 α -hydroxystreoid dehydrogenase (AKR1C4) effectue une 3 α -déhydroxylation complétant ainsi la modification du noyau stéroïdien (35, 36).

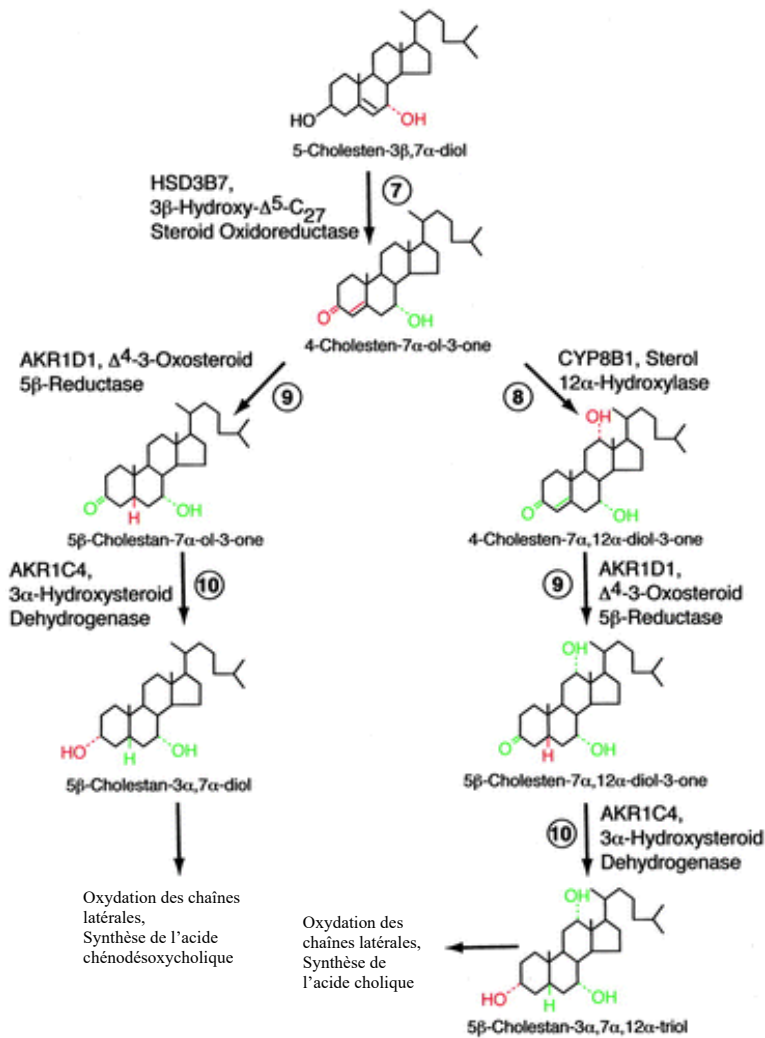


Figure 6. Modifications au noyau cyclique

Les enzymes impliquées pour chaque étape sont indiquées à côté des flèches. La modification introduite est indiquée en rouge sur le produit. En vert sont représentés les changements cumulatifs. Les produits formés sont les substrats pour l'étape subséquente de la formation des acides biliaires : l'oxydation de la chaîne latérale.

1.2.4.3 Oxydation des chaînes latérales

Pour permettre le clivage de la chaîne latérale, une hydroxylation a lieu par la stérol 27-hydroxylase (CYP27A1) en 2 étapes (voir figure 7). Les intermédiaires d'acides biliaires oxydés provenant de la stérol 27-hydroxylase sortent des mitochondries et sont ensuite soumis

à un raccourcissement de la chaîne latérale. Les trois atomes de carbone terminaux sont éliminés dans les peroxysomes par une série de réactions semblables à celles impliquées dans l'oxydation des acides gras (37). Dans un premier temps, les acides biliaires CoA ligases (BAL) permettent d'activer le stérol intermédiaire par conjugaison avec la coenzyme A. Deux enzymes ont été identifiées avec cette activité, la coenzyme A synthétase à très longue chaîne et l'acyl-coenzyme A synthétase à chaîne très longue homologue 2. Ces enzymes sont connues également pour leur activation d'acides gras à 18 carbones ou plus (38, 39). Après activation des intermédiaires avec la coenzyme A par les BAL, les isomères C25 (R) doivent être convertis en isomères C25 (S) avant que les étapes suivantes de raccourcissement de la chaîne latérale puissent avoir lieu. Cette réaction est catalysée par la 2-méthylacylcoenzyme A racémase. Les produits stérols de l'enzyme racémase sont ensuite soumis à une déshydrogénation catalysée par l'enzyme peroxysomale contenant une chaîne ramifiée acyl-coenzyme A oxydase pour donner des dérivés 24,25-trans-insaturés. Les produits sont ensuite déshydrogénés par l'enzyme *branched-chain Acyl-CoA* oxydase (ACOX2). La protéine bifonctionnelle D permet la formation de dérivés C24-OXO alors que le lien entre les C24 et C25 est clivé par l'enzyme *peroxisomal thiolase 2*, comme montré à la figure 7 (27, 40).

1.2.4.4 Conjugaison

La dernière étape de la synthèse des acides biliaires consiste en l'addition d'un acide aminé, généralement la glycine ou la taurine, en liaison amide avec le carbone 24. La taurine est l'acide aminé obtenu à partir de deux autres acides aminés, la méthionine et la cystéine. La réaction de l'ajout d'un acide aminé est catalysée par la coenzyme acide biliaire A : acide aminé N-acyltransférase comme le montre la figure 8 (13). Cette enzyme est uniquement exprimée dans les peroxysomes des cellules hépatiques. Cela termine la voie de synthèse des acides biliaires primaires, soient l'acide chénodésoxycholique ainsi que l'acide cholique chez l'Homme, qui sont synthétisés en proportion environ égale (22, 41).

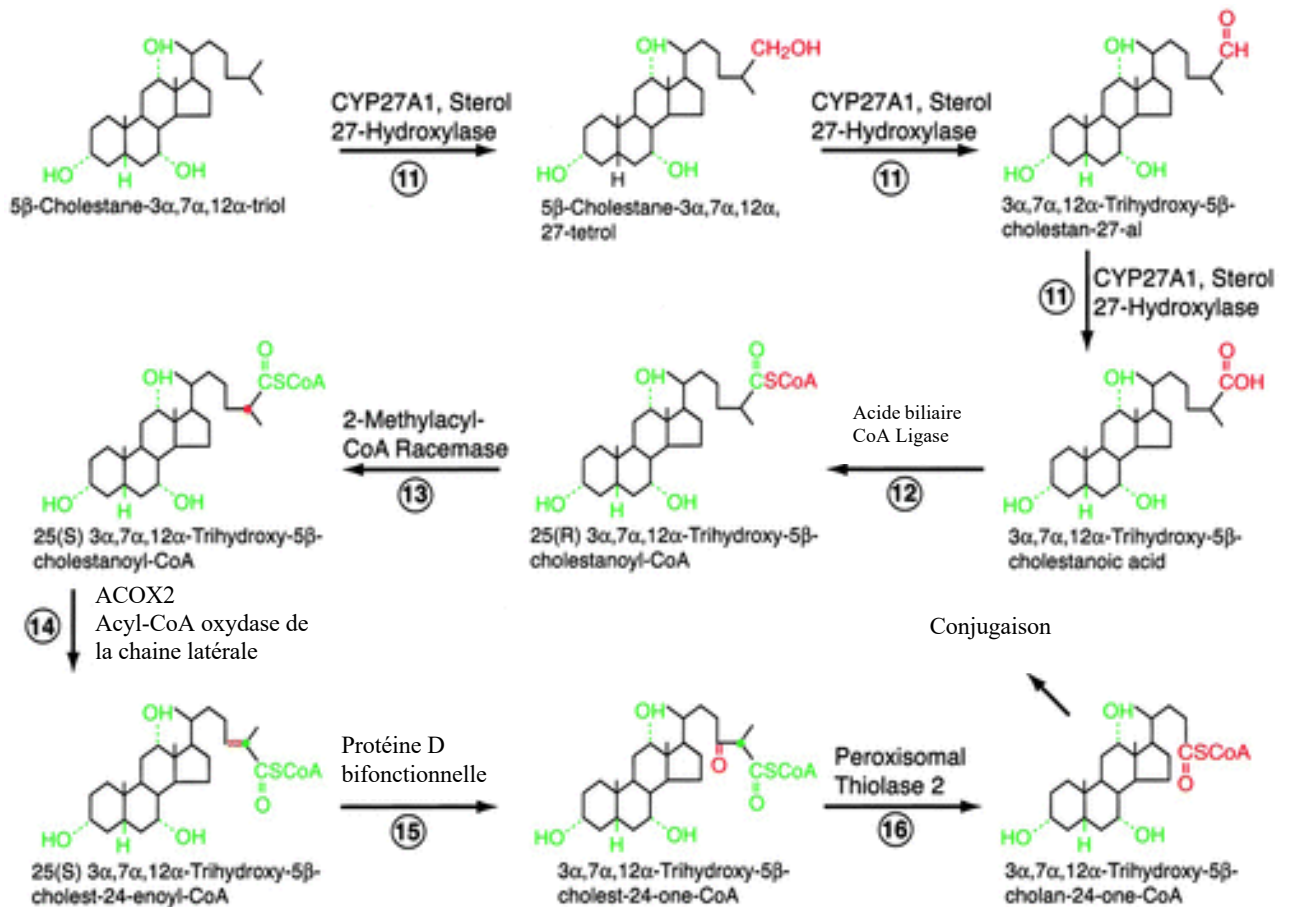


Figure 7. Oxydation de la chaîne latérale

Les enzymes impliquées pour chaque étape sont indiquées à côté des flèches. La modification introduite est indiquée en rouge sur le produit. En vert sont représentés les changements cumulatifs. Le stérol 27-hydroxylase catalyse trois étapes d'oxydation séquentielles dans cette partie de la voie. Les produits formés sont les substrats pour l'étape finale de la formation des acides biliaires : la conjugaison.

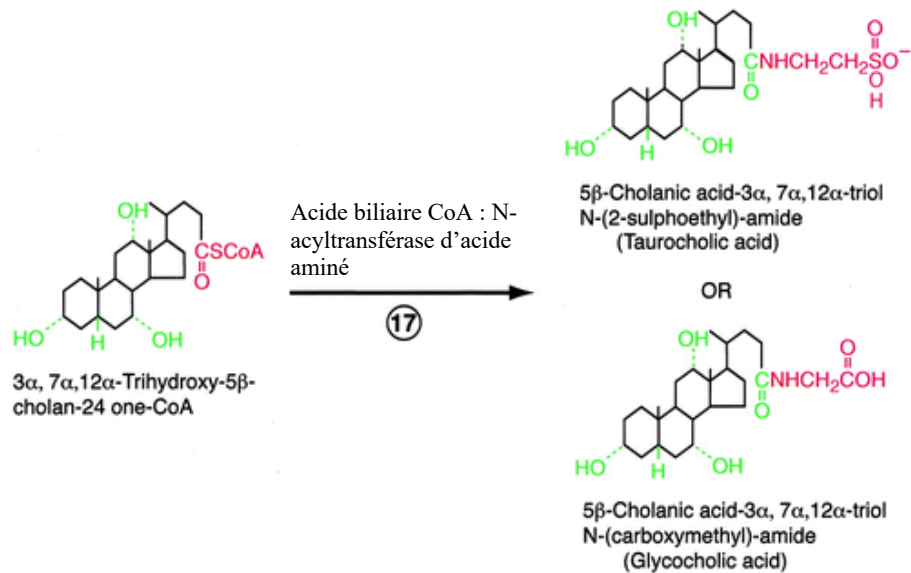


Figure 8. Conjugaison des acides biliaires

L'enzyme impliquée pour cette étape est indiquée au-dessus de la flèche. La modification introduite est indiquée en rouge sur le produit. En vert sont représentés les changements cumulatifs.

Les acides biliaires synthétisés au foie sont presque exclusivement conjugués à des acides aminés. Environ 75% des acides biliaires sont conjugués à la glycine pour 25% qui le sont à la taurine (42). La conjugaison réduit le pKa et permet l'ionisation complète à pH physiologique. Une fois conjugués, les acides biliaires sont donc plus hydrophiles.

1.2.4.5 Synthèse des acides biliaires secondaires et tertiaires

Au niveau du système digestif, les bactéries peuvent modifier les acides biliaires primaires en acides biliaires secondaires. Cela mène à différentes modifications supplémentaires telles la déconjugaison, l'oxydation ou la déshydroxylation en position du carbone 7 (43). La déconjugaison a lieu dans le colon et permet le retrait de l'acide aminé conjugué et est catalysée par l'enzyme hydrolase d'acide biliaire (BSH) (44). Les molécules, une fois déconjuguées, peuvent être transportées par diffusion passive jusqu'au foie. Cette première étape est nécessaire pour la déshydroxylation en position du carbone 7 (45). Les acides biliaires secondaires lithocholique et désoxycholique sont ainsi formés. Cette

transformation est catalysée par l'enzyme 7α -déshydroxylase des bactéries intestinales. Les substrats utilisés sont les acides biliaires primaires. Le CDCA déshydroxylés mène au LCA, alors que le CA déshydroxylé mène au DCA (22, 45). Ces acides biliaires résultants sont moins hydrophobes que les acides biliaires primaires, ce qui facilite leur absorption passive par les parois intestinales.

L'oxydation et l'épimérisation des acides biliaires primaires peuvent être effectuées tant sur les acides biliaires libres que conjugués. Ces réactions sont effectuées par les hydroxystéroïde déshydrogénase (HSD). Lors du processus d'épimérisation, un intermédiaire stable de forme oxo-AB est généré. La formation de l'acide ursodéoxycholique (UDCA) est faite à partir du CDCA par les enzymes 7α - et 7β -HSD, qui sont toutes deux nécessaires pour cette conversion (46). L'UDCA est l'acide biliaire le moins hydrophobe.

D'autres réactions de conjugaison peuvent avoir lieu, telle l'hydroxylation des acides biliaires, ou encore la sulfatation ainsi que la glucoronidation. L'ajout de groupements plus hydrophiles permet de faciliter leur élimination. Ces modifications sont essentielles pour le maintien de l'homéostasie des acides biliaires (47, 48). Le cycle entérohépatique correspond au système très efficace qui assure la conservation et le recyclage des acides biliaires dans le corps et sera abordé de façon approfondie dans la section 1,2,6.

1.2.5 Présence dans les fluides biologiques

Les concentrations et les proportions exactes de chacun des acides biliaires dans les fluides biologiques sont difficiles à déterminer en raison d'un manque de spécificité et de sensibilité des méthodes utilisées, du faible nombre de sujets analysés et de la grande variation interindividuelle. Par contre, il est possible de quantifier la concentration d'acides biliaires totaux. Il est estimé qu'à jeun, les acides biliaires totaux sériques sont habituellement inférieurs à $5 \mu\text{mol/L}$. Suite à un repas, cette concentration peut doubler, surtout lors de l'ingestion d'un repas avec une teneur plus élevée en matières grasses (49, 50). Les

concentrations plasmatiques totales d'acides biliaires à jeun seraient plus élevées chez les hommes que chez les femmes, et pourraient également varier en fonction de l'âge ainsi que de l'origine ethnique. Par contre, d'autres études se penchent également sur les variations en fonction de ces paramètres et arrivent à des conclusions contraires à celles-ci. Il est donc difficile d'avoir une idée précise des effets de ces variables sur la concentration totale d'acides biliaires (9, 23, 51).

Il est estimé que les acides biliaires trouvés au foie sont principalement le CDCA, le CA ainsi que le DCA. Au niveau de la bile, 35% des acides biliaires totaux seraient des acides biliaires primaires, dont la majorité sont conjugués avec la glycine ou la taurine (52). Environ 18% serait le DCA, et une fraction de LCA (52). L'UDCA, formé à partir de CDCA dans l'intestin, est également présent tant dans la bile que dans le foie à raison de 1 à 4% seulement. Dans les fèces, les acides biliaires éliminés sont principalement des acides biliaires libres (non-conjugués). Une partie des acides biliaires secondaires libres s'y retrouvent également, à raison d'environ 50%. Comme pour dans les fèces, l'urine ne contient que très peu d'acides biliaires conjugués (53, 54). Les niveaux retrouvés dans le sérum sont beaucoup plus faibles. Les acides biliaires primaires y seraient les plus importants constituants.

1.2.6 Cycle entérohépatique

Comme mentionné plus tôt, le cycle entérohépatique assure la conservation et le recyclage des acides biliaires dans le corps. Après leur synthèse dans le foie, les acides biliaires sont stockés dans la vésicule biliaire. Ils sont libérés suite à un repas dans les voies biliaires, puis seront absorbés dans l'intestin pour passer dans la circulation sanguine, transportés jusqu'au foie et enfin secrétés encore une fois dans la bile (18). Ce système de transport et recyclage des acides biliaires dans le corps est illustré à la figure 9.

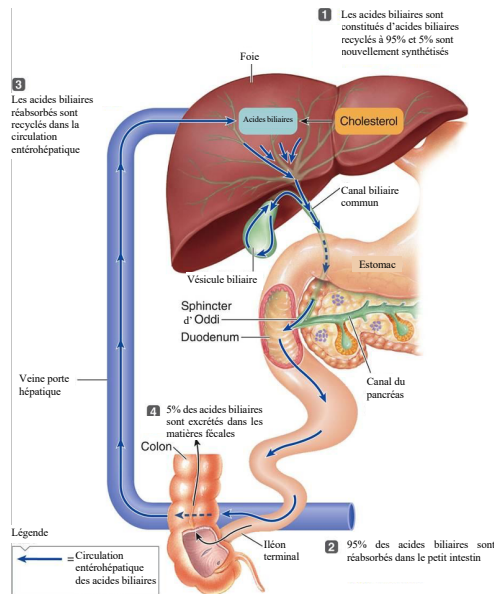


Figure 9. Circulation entérohépatique des acides biliaires

Le cycle entérohépatique correspond donc à la circulation cyclique des acides biliaires à partir de leur lieu de synthèse. En effet, une fonction principale du foie pour la digestion est la sécrétion de la bile contenant les acides biliaires. Comme dit plus haut, les cellules du foie métabolisent premièrement le cholestérol en acides biliaires amphiphatiques qui deviennent plus hydrosolubles lorsque conjugués à la taurine ou à la glycine. Les acides biliaires sont stockés dans la vésicule biliaire et leur utilisation est sous le contrôle de la cholécystokinine (CCK) (56). Suite à un apport nutritionnel, la CCK sécrétée par la muqueuse du duodénum est déversée dans la circulation sanguine et entraîne la contraction et la vidange de la vésicule biliaire. La bile et ses acides biliaires sont alors sécrétés dans le canal biliaire pour rejoindre l'intestin, où ils aident à la digestion (9, 27). Dans l'intestin grêle, la majorité des acides biliaires sont ionisés et se retrouvent sous la forme de leurs sels de sodium (ils sont donc couramment appelés sels biliaires). Cette transformation se fait à cause du pH de ce milieu (57). Le long de l'iléon, les acides biliaires sont ensuite réabsorbés activement dans la circulation hépatique. 95% des acides biliaires se rendant au duodénum sont donc absorbés dans la circulation entérohépatique et pourront être recyclés, alors que les 5% restant sont

excrétés dans les fèces et seront éventuellement remplacés par des acides biliaires nouvellement synthétisés dans le foie à partir du cholestérol, comme vu plus haut (58). Les acides biliaires sont ensuite transportés vers le foie par la veine porte pour être recyclés. En fin de compte, on estime que chaque molécule d'acide biliaire peut être recyclée une vingtaine de fois avant son élimination (58).

1.2.7 Transporteurs des acides biliaires

Les acides biliaires qui ne sont pas conjugués peuvent diffuser passivement dans la circulation entérohépatique alors que les acides biliaires conjugués nécessitent un transport actif ATPase (57). Des transporteurs indépendants de l'ATPase sont aussi présents. Les gènes exprimant les transporteurs de ceux-ci sont souvent régulés par les acides biliaires eux-mêmes. Par ce système, une distribution précise des acides biliaires est contrôlée en fonction des repas et autres facteurs environnementaux. À l'occasion d'un repas, la concentration des acides biliaires passe d'environ 20 à 50 mmol/L dans les canalicules biliaires, et jusqu'à 300 mmol/L dans la vésicule biliaire. La concentration en acides biliaires dans le sang périphérique en période de jeûne est d'environ 3 à 5 $\mu\text{mol/L}$. Après un repas, cette concentration augmente de 2 à 5 fois avec un pic à 90 minutes (58).

Au foie, le polypeptide cotransportant sodium/taurochlorate (NTCP) permet l'absorption active des acides biliaires conjugués dans les hépatocytes (59). Le transport des acides biliaires indépendant de l'ATPase est attribué principalement à des protéines nommées OATP (polypeptide transportant des anions organiques). Cette famille comprend 4 membres connus chez l'humain, OATP-A, OATP-B, OATP-C ainsi que OATP-8. L'OATP-C, également appelé LST-1 (*liver-specific transporter*) est le principal vecteur non-sodium-dépendant des sels biliaires. Il transporte également la bilirubine non conjuguée, les stéroïdes conjugués, les eicosanoïdes, les hormones thyroïdiennes et de nombreux médicaments (60). L'ATPase FIC1, exprimée au niveau du foie, mais également dans l'intestin, le pancréas, la vessie et la prostate est vraisemblablement un transporteur d'aminophospholipides (60, 61). Les acides biliaires ré-absorbés au foie par ces transporteurs seront réutilisés. Ceux-ci ainsi

que ceux nouvellement synthétisés seront sécrétés par la membrane canaliculaire des hépatocytes via la pompe d'exportation de sels biliaires (BSEP), qui est la principale pompe d'exportation ATP-dépendante des acides biliaires. Au niveau de l'exportation, la flippase MDR3 assure l'excrétion de la phosphatidylcholine, une composante importante de la bile, hors du foie.

Au niveau de l'intestin grêle, le transporteur apical d'acide biliaire sodium dépendant (ASBT) est responsable de l'absorption des acides biliaires. Cette réabsorption par les cellules de l'intestin grêle est une étape cruciale du transport des acides biliaires par la circulation entérohépatique. Au niveau de l'iléon, l'absorption dépend de transporteurs spécifiques sodium-dépendants, mais également de la protéine ASBT aussi appelée ISBT au niveau de l'iléon. Des mutations au niveau de cette protéine, ainsi qu'au niveau des autres transporteurs, affectent l'absorption et l'exportation des acides biliaires.

1.3 Cholestase intrahépatique de grossesse (CIG)

Dans les cas de CIG, le transport des acides biliaires dans le cycle entérohépatique est perturbé. Ceci cause un déversement des acides biliaires dans le sang périphérique de la femme enceinte. Une concentration élevée d'acides biliaires totaux est donc détectée dans le sang périphérique (62).

1.3.1 Prévalence

La prévalence de la cholestase intrahépatique de la grossesse est d'environ 0,2% à 2% (51, 52). Cependant, elle varie beaucoup selon l'origine ethnique et la localisation géographique (63). Elle est plus répandue en Amérique du Sud et en Europe du Nord. La CIG est plus fréquente chez les femmes ayant des grossesses multiples (64). Au Québec, on estime le nombre de CIG à environ 900 cas annuellement (64).

1.3.2 Causes

L'étiologie de la CIG est complexe. En effet, son origine est multifactorielle alors que ses causes peuvent être hormonales, génétiques et/ou environnementales. Les causes pourraient être liées à l'effet cholestatique des hormones de reproduction chez les femmes, surtout chez celles génétiquement prédisposées. L'effet cholestatique correspond à la diminution de la sécrétion de bile. Les hypothèses selon lesquelles les hormones de reproduction des femmes auraient un rôle à jouer dans l'étiologie de la CIG sont basées sur l'histoire de la maladie et également sur des études sur l'administration de progestérone par voie orale pour prévenir le travail prématuré (65). En effet, la CIG est présente presque exclusivement au 3^e trimestre de la grossesse, alors que les niveaux d'estrogènes sont les plus hauts (58). Des études sur des rongeurs ont également démontré que l'estrogène pourrait contribuer au développement de la CIG en provoquant une expression diminuée des protéines hépatiques de transport biliaire. De plus, l'estrogène pourrait mener à l'internalisation de la pompe d'exportation du transporteur des acides biliaires, perturbant ainsi le transport des acides biliaires dans la circulation entérohépatique (66).

Les indices de l'impact génétique sur le développement de la CIG incluent la classification familiale de la maladie et des pedigrees dans lesquels le mode de transmission semble suivre un schéma dominant, limité par le sexe. De plus, une influence génétique expliquerait pourquoi la prévalence de la maladie varie autant selon les ethnies. Environ 30 à 50% des femmes atteintes rapportent des antécédents familiaux positifs, et la cholestase gravidique récidive dans 40 à 60% des grossesses suivantes chez une même femme. Plusieurs études ont établi une variation génétique dans les gènes codant pour les protéines de transport biliaire, tel MRP2 (67). Tel que mentionné dans la section 1,2,7, le bon fonctionnement de plusieurs transporteurs d'acides biliaires est nécessaire pour assurer un transport efficace lors de toutes les étapes du cycle entérohépatique. L'insuffisance d'un ou de plusieurs transporteurs nécessaires lors de ce cycle mènera à un déversement anormal des acides biliaires et ces altérations sont impliquées dans plusieurs types de cholestase. Pour la cholestase intrahépatique de la grossesse, la principale mutation identifiée est la mutation du

transporteur MDR3, qui est responsable du transport des phospholipides dans les canalicules biliaires permettant de neutraliser la toxicité de l'effet détergent des acides biliaires. La présence de grandes quantités d'hormones pendant la grossesse pourrait altérer l'expression de ce transporteur (68, 69). Des cas de cholestase gravidique ont été décrits dans des familles de patients atteints de cholestase intrahépatique récurrente bénigne (maladie de l'adolescent ou de l'adulte) et de cholestase intrahépatique familiale progressive 2, laissant suspecter que des mutations des transporteurs FIC1 et BSEP pourraient également représenter une prédisposition pour une cholestase gravidique (70).

Pour ce qui est du facteur de l'environnement, on trouve un lien avec l'apport nutritionnel en sélénium dans l'alimentation (71) ainsi qu'avec une carence en vitamine K (71). En effet, on remarque que cette maladie est parfois plus fréquente dans certains pays en hiver, alors qu'on retrouve moins de sélénium naturel. De plus, lors de cette période, il y a habituellement moins de vitamine D, stéroïde jouant un rôle dans l'homéostasie biliaire. Des taux sériques faibles de vitamine D pourraient expliquer la plus grande fréquence des cas de cholestase gravidique en hiver, de même que des concentrations faibles en sélénium (72, 73).

1.3.3 Risques et complications

La CIG est associée à différents risques, autant au niveau de la mère que du fœtus. L'étiologie des complications fœtales est probablement liée aux effets toxiques des acides biliaires qui se concentrent dans le sang de la mère et mènent à une accumulation dans le compartiment fœtal. Le pronostic maternel est généralement bon alors que l'effet chez la mère est principalement celui d'un prurit intense associé à une qualité de vie qui se dégrade par le manque de sommeil. L'hémorragie post-partum est observée dans certains cas (74).

Pour le fœtus, l'augmentation des acides biliaires sanguins chez la mère a des conséquences graves. Les acides biliaires peuvent facilement traverser la barrière placentaire. Cela mène éventuellement à une accumulation dangereuse d'acides biliaires chez le fœtus

(75). Le fœtus est incapable de les détoxifier en raison de son immaturité métabolique et cela occasionne des problèmes neurologiques. Lors d'une grossesse normale, il existe un gradient transplacentaire qui facilite l'excrétion des acides biliaires du fœtus vers la mère. Dans les cas de CIG, ce gradient est inversé et c'est ce qui entraîne une accumulation d'acides biliaires dans le sérum fœtal (75). En concentration trop élevée, les acides biliaires sont toxiques. En effet, des niveaux intracellulaires élevés sont associés à un dommage oxydatif et à l'apoptose cellulaire dans le foie adulte et fœtal (76). La gravité de la CIG semble donc proportionnelle avec le taux d'acides biliaires sanguins chez la mère, bien que les études randomisées soient insuffisantes pour l'affirmer avec certitude. La mort fœtale in utero survient dans 1 à 2 % des cas (64). À ce jour, elle n'est pas prévisible par un marqueur clairement défini. Les risques pour le fœtus sont très grands lorsqu'une concentration d'acides biliaires totaux de 40 $\mu\text{mol/L}$ ou plus est observée chez la mère, alors qu'à ce stade, les risques de mort fœtale in utero sont multipliés par 2,6 (77). Des études ont également suggéré une association avec le syndrome de détresse respiratoire chez les enfants nés prématurément suite à cette maladie chez la mère (78). Cependant, la littérature a fait l'objet de nombreux débats concernant la nature précise du risque pour le fœtus et l'incidence réelle de ces résultats. Cela s'explique par le fait qu'il n'y ait actuellement pas de consensus sur les critères diagnostiques de la CIG.

1.3.4 Symptômes et diagnostic

Le prurit que les femmes enceintes vivent de façon générale commence au deuxième ou au troisième trimestre et se ressent généralement dans tout le corps, mais principalement au niveau de la paume des mains et la plante des pieds (73, 79). Actuellement, il n'y a pas de lien prouvé entre le moment d'apparition du prurit et la gravité de la CIG ou encore des conséquences périnatales de celle-ci, mais quelques études suggèrent que l'apparition précoce des symptômes pourrait être associée à un risque plus élevé de complications materno-fœtales (80). Il s'agit souvent du seul symptôme associé à une cholestase intrahépatique de la grossesse et il peut être si grave qu'il perturbe le sommeil. Le prurit empire souvent la nuit et s'amplifie progressivement à mesure que la grossesse avance. Ce symptôme peut apparaître avant, en même temps ou après la détection d'une biochimie anormale et une augmentation des acides

biliaires sériques. On pense que le prurit pourrait s'expliquer en partie par l'accumulation de acides biliaires dans la peau (79). Les femmes présentant une cholestase intrahépatique de la grossesse peuvent également présenter des symptômes associés avec d'autres maladies de cholestase, telles une urine foncée et des selles pâles. Certaines femmes peuvent également avoir une jaunisse clinique, mais cela est rare (81).

Outre l'accumulation des acides biliaires totaux dans le sang périphérique qui constitue le marqueur diagnostique le plus sensible et spécifique, d'autres anomalies biochimiques sont parfois observables. Une augmentation de l'activité sérique des transaminases de 2 à 10 fois est souvent observée (82, 83). La normalité de la gamma-glutamyltranspeptidase (GGT) est également une caractéristique de la cholestase gravidique (84). Toutefois, l'augmentation de la GGT est observée dans près de 30 % des cas, notamment en cas de mutation du gène ABCB4 qui est responsable d'anomalies au niveau des transporteurs (83). Les phosphatases alcalines totales, quant à elles, ne sont d'aucune utilité diagnostique puisque leur augmentation est physiologique au cours de la grossesse du fait d'une synthèse placentaire (85). Il existe plusieurs isoenzymes et leur séparation par électrophorèse permet un profilage de ceux-ci, qui pourrait identifier une augmentation des phosphatases alcalines autres que placentaires et donc être une indication de la présence d'une CIG. Des études ont montré une relation significative entre les complications et le niveau de transaminases sériques, en particulier l'alanine aminotransferase (ALT) (86, 87). Une étude évaluant ce lien démontre une corrélation significative entre les niveaux d'ALT et les complications périnatales indésirables alors que les patientes atteintes de la CIG étaient 3,45 fois plus à risque lorsqu'une élévation de l'ALT était observée (88). Les symptômes et les anomalies biochimiques disparaissent rapidement après l'accouchement, mais peuvent se reproduire lors de grossesses ultérieures et lors de l'utilisation d'une contraception hormonale (89, 90).

La CIG est souvent un diagnostic d'exclusion, généralement basé sur la présentation clinique, l'examen physique et les résultats de laboratoire (58, 91). Un diagnostic sera habituellement établi chez la femme atteinte de prurit qui a une concentration d'acides biliaires

totaux dans le sang anormalement élevée, soit généralement supérieure à 10 $\mu\text{mol/L}$ et dont les symptômes disparaissent rapidement après l'accouchement. La cholestase gravidique est considérée sévère lorsque la concentration d'acides biliaires totaux est égale ou supérieure à 40 $\mu\text{mol/L}$, alors que la mortalité fœtale devient un risque majeur (77).

1.3.5 Traitements

Le traitement médical principal de la CIG est l'acide ursodésoxycholique (UDCA) qui diminue le prurit, les anomalies biochimiques maternelles et les risques de prématurité selon plusieurs études (77, 78). Il a été démontré que l'UDCA active les voies anti-inflammatoires des hépatocytes et améliore la fonction hépatique globalement (92). Cet acide biliaire tertiaire mène à une diminution des acides biliaires sériques par un mécanisme inconnu. Cependant, il n'y a pas d'essais contrôlés randomisés suffisamment importants pour établir clairement si l'acide ursodésoxycholique réduit le risque d'effets indésirables périnataux, bien que les données de plusieurs petites études semblent aller dans ce sens (81, 86, 93, 94). Un accouchement provoqué de façon prématurée devient nécessaire lorsque les traitements symptomatiques ou spécifiques (UDCA) ne sont pas efficaces afin d'améliorer la qualité de vie de la mère et surtout réduire les risques pour les fœtus (75).

Le groupe ICP Support (*support for intrahepatic cholestasis of pregnancy*) est une organisation de recherche et de soutien pour les femmes atteintes de la CIG. Leur guide de pratique médicale parut en début de 2020 propose les lignes directrices pour le diagnostic et le traitement de la CIG la plus récente (voir figure 10). On y voit que le traitement est très variable en fonction des symptômes et anomalies biochimiques rencontrés. Le traitement par médicament tel l'UDCA est habituellement limité aux cas les plus problématiques où on rencontre une élévation des acides biliaires totaux. L'accouchement prématuré entre à partir de la semaine 34 est recommandée dans les cas extrêmes où une concentration d'acides biliaires totaux supérieure à 100 $\mu\text{mol/L}$ est observée.

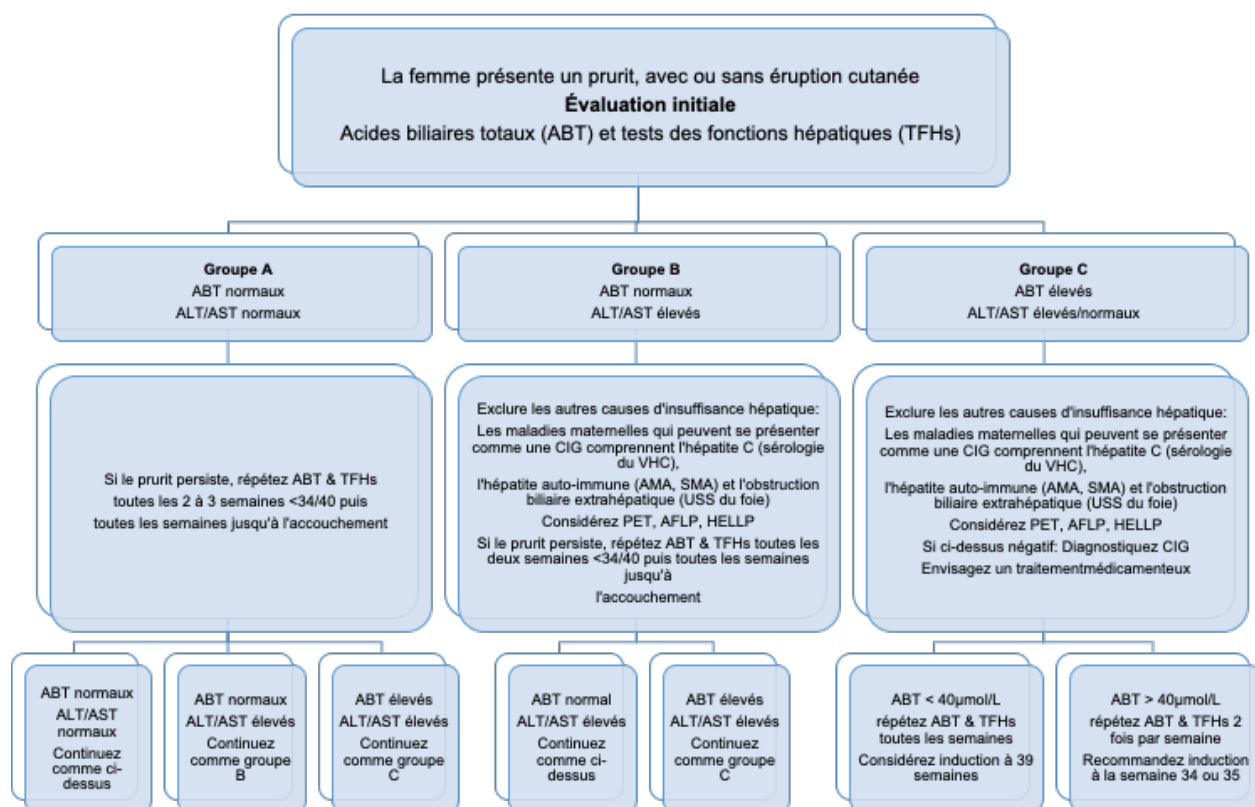


Figure 10. Lignes directrices pour le diagnostic et le traitement de la CIG

1.4 Dosage des acides biliaires

Le dosage des acides biliaires dans le sang est actuellement le moyen le plus sensible et le plus spécifique de détection de la cholestase gravidique en présence de prurit, comparativement à tous les autres tests de la fonction hépatique. Les méthodes de routine pour faire ce dosage sont plus ou moins spécifiques et mesurent les acides biliaires totaux. Le dosage des acides biliaires totaux mesure l'ensemble des acides biliaires sériques primaires, secondaires et tertiaires, qu'ils soient libres ou conjugués. La mesure d'acides biliaires totaux dans le sang se fait habituellement par une méthode enzymatique à l'aide de l'enzyme 3- α hydroxystéroïde déshydrogénase, pour convertir les acides biliaires en 3-cétostéroïdes et en

NADH (96). La plupart des méthodes quantifient la formation de Thio-NADH ou encore de Formazan (Voir figure 11). Ils sont quantifiables par spectrophotométrie suite à l'ajout de bleu nitrotétrazolium et de diaphorase. Il s'agit d'un dosage quantitatif effectué par une méthode enzymatique et mesurée par absorbance à 410 nm ou 540 nm pouvant être automatisée sur des instruments de biochimie générale, tel le AU5800 de Beckman Coulter. Le centre hospitalier de l'Université de Montréal quantifie les acides biliaires totaux sériques par une telle technique. En présence de NAD, l'enzyme 3- α hydroxystéroïde déshydrogénase (3- α HSD) convertit les acides biliaires en 3-céto stéroïdes et NADH. Le NADH formé réagit avec le bleu de nitrotétrazolium (NBT) pour former un colorant formazan en présence d'enzyme diaphorase. La formation de colorant est évaluée en mesurant l'absorbance à 540 nm et est directement proportionnelle à la concentration en acides biliaires dans l'échantillon de sérum.

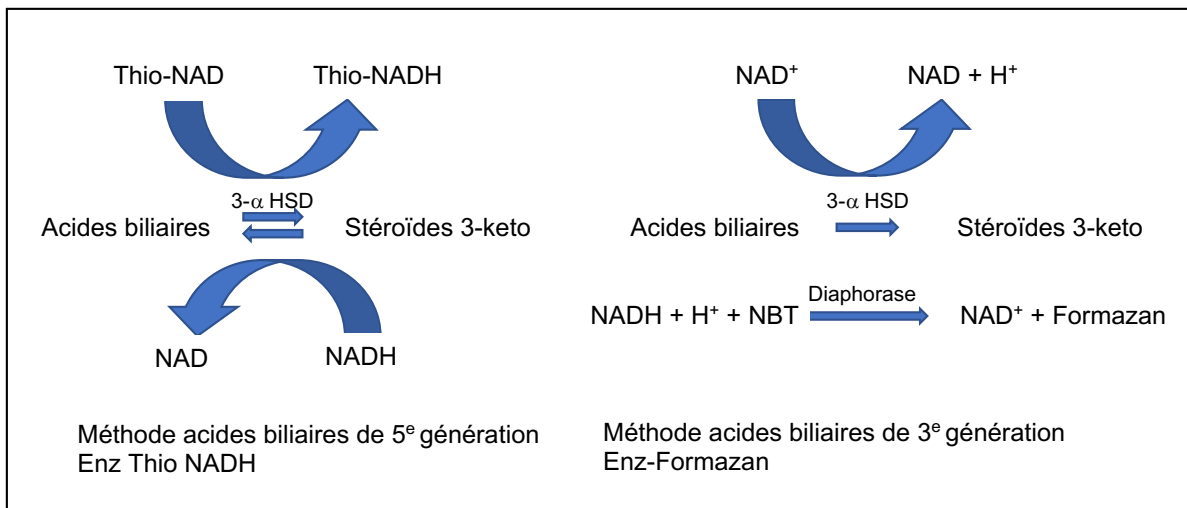


Figure 11. Méthodes enzymatiques couramment utilisées pour la quantification des acides biliaires totaux dans le sérum

Les valeurs de référence pour les acides biliaires dépendent de la technique utilisée pour les doser. La plupart des études utilisent une limite comprise entre 10 et 14 $\mu\text{mol/L}$ pour

un dosage enzymatique des acides biliaires sériques totaux, mais cette limite peut être réduite à 6 à 10 $\mu\text{mol L}$ chez la femme à jeun (21, 58, 81).

1.5 Instrumentation

La biochimie clinique est une branche de la biologie médicale. Elle consiste en l'analyse des molécules contenues dans les fluides corporels. L'interprétation des résultats obtenus suite à ces analyses permet la caractérisation de l'origine physiopathologique d'une maladie, et permet donc de poser, par exemple, un diagnostic et de suivre l'évolution d'une maladie. La chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse en tandem (LC-MS/MS) est une technique sensible, spécifique et rapide. Ce couplage basé sur les capacités de séparation chromatographique des composantes d'un mélange et celles de détection de l'analyseur de masse a permis un progrès spectaculaire quant à l'analyse des mélanges complexes de molécules organiques et biologiques. Son application dans le domaine médical et clinique a conduit à la détection et la quantification d'une large gamme de biomarqueurs.

1.5.1 Chromatographie liquide

Le principe consiste à introduire l'échantillon à analyser via un injecteur. L'échantillon est ensuite transporté par la phase mobile liquide sur la colonne analytique où les molécules en question seront retenues et séparées en fonction de leur affinité avec la phase stationnaire recouvrant la colonne et les phases mobiles la traversant. Les principales composantes d'un système de chromatographie liquide sont les pompes qui permettent la circulation des phases mobiles et la régulation du flux, la colonne qui correspond à la phase stationnaire et qui permet la séparation des composantes du mélange, l'échantillonneur automatique qui permet l'injection automatique des échantillons sur le système et les détecteurs tels que les détecteur ultraviolet, fluorescence ou spectromètre de masse. Un logiciel est également requis pour l'analyse des données (97, 98).

De façon générale, la phase mobile circule à travers la phase stationnaire en entraînant avec elle les différents composants de l'échantillon. Les composés, selon leurs propriétés physicochimiques et leur affinité avec les phases mobile et stationnaire, vont éluer à différents temps de rétention. Cela permet la séparation des constituants d'un mélange complexe. Plus les interactions entre les analytes et la phase stationnaire sont importantes, moins rapidement élueront ceux-ci. Une élution isocratique consiste en l'utilisation des mêmes proportions de phase tout au long de l'analyse. Cette méthode d'élution est souvent utilisée pour la séparation de mélanges plus simples. Par contre, dans plusieurs cas, l'utilisation d'un gradient est nécessaire afin de séparer les analytes d'un mélange plus complexe et pour diminuer le temps d'analyse. Un gradient consiste à faire varier les proportions de solvants aqueux et organique lors de la séparation. En variant de façon graduelle la proportion de solvant organique dans la phase mobile sur une certaine période de temps, on permet un meilleur contrôle sur la séparation et les temps de rétention des analytes. Par contre, il faut alors s'assurer de conditionner la colonne entre chaque analyse afin de retrouver les conditions initiales de séparation. Ceci est essentiel pour obtenir une bonne reproductibilité entre les analyses.

1.5.2 Spectrométrie de masse

Suite à leur séparation, les molécules sont ensuite envoyées vers le spectromètre de masse où elles sont ionisées par le biais d'une source d'ionisation choisie en fonction des molécules à étudier et transformées sous forme gazeuse. La source d'ionisation utilisée dans ce projet est l'ionisation par électro nébulisation (ESI). Une différence de potentiel est appliquée entre l'extrémité du capillaire et un orifice et cette tension permet la séparation des charges à la surface du liquide arrivant dans le détecteur, contenant le solvant et l'analyte. Des ions sont alors formés dans la phase liquide et des gouttelettes sont formées. Ces gouttelettes passent dans un capillaire chauffé ce qui évapore le solvant et réduit la taille des gouttelettes. Lorsque la densité de charge devient trop importante, les gouttelettes explosent et libèrent des microgouttelettes constituées de l'analyte portant une ou plusieurs charges. En fonction d'un potentiel électrique, celles-ci sont retenues ou continuent vers les analyseurs (97, 99).

Le spectromètre de masse quadripolaire en tandem est constitué de deux analyseurs de masse et d'une chambre de collision. Dans le premier quadripôle, des ions parents sont sélectionnés en fonction de leur rapport masse/charge (m/z). Pour être sélectionnés par l'analyseur, les ions arrivent dans un quadripôle constitué de 4 électrodes qui vont chacun avoir un potentiel qui est appliqué entre chaque paire. Ce quadripôle possède une paire d'électrodes globalement chargées positivement et une autre paire d'électrodes globalement chargées négativement. Les paires sont dites globalement chargées car deux voltages sont appliqués, l'un qui est constant et l'autre qui varie. La paire chargée positivement permet de sélectionner les ions de rapports masse/charge (m/z) dans le plan x-z puisqu'ils sont stabilisés par leur grande inertie. La paire chargée négativement permet la sélection d'ions de m/z faibles subissant l'effet du voltage alternatif. Les deux paires mises ensemble permettent une bande de transmission étroite de rapport m/z (voir figure 12). En sortant du premier quadripôle, les ions sélectionnés sont alors fragmentés pour former des ions produits et ces ions résultants sont sélectionnés par le 2^e analyseur par le même principe pour enfin se rendre au détecteur.

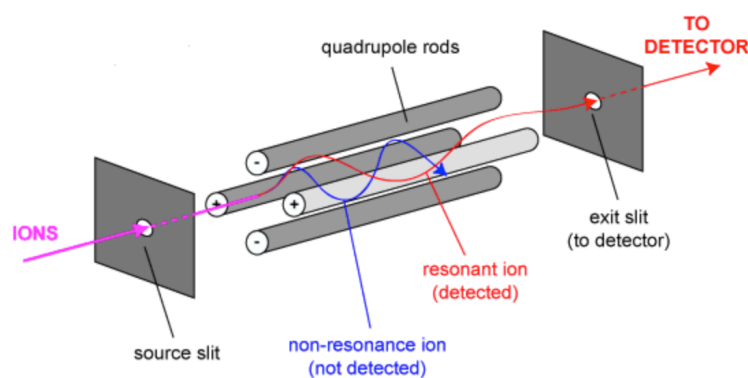


Figure 12. Représentation du fonctionnement de l'analyseur quadripôle

Plusieurs types de balayage sont possibles dont le balayage complet (full scan), qui permet la sélection de plusieurs ions parents ou précurseurs en désactivant la paire d'électrodes globalement négative. Le balayage *single ion monitoring* (SIM) permet l'analyse d'un ion précurseur en particulier. Le balayage *product ion scan* permet l'analyse du spectre d'ions produits à partir d'un ion précurseur sélectionné. Finalement, le mode *multiple reactions monitoring* (MRM) permet le suivi et l'analyse de multiples réactions de fragmentation simultanément. Il est nécessaire de déterminer les paramètres de détection pour chaque analyte en prévision des travaux de recherche.

1.6 Projet de recherche

1.6.1 Problématique et hypothèse de travail

Jusqu'à présent, le paramètre biochimique le plus spécifique à la CIG et permettant son diagnostic est l'augmentation de la concentration d'acides biliaires totaux. Des taux de complication fœtale plus élevés ont été associés à des taux d'acides biliaires sériques supérieurs à 40 $\mu\text{mol/L}$.

Au cours des dernières années, on s'intéresse de plus en plus à l'étude des profils d'acides biliaires dans différentes maladies. Cela permettrait une meilleure compréhension de la maladie et de son traitement. Ce profilage, chez les patientes atteintes de CIG, pourrait permettre l'adoption d'un nouveau critère de diagnostic (96, 101, 102). De plus, par ce profilage, il pourrait être possible de mieux comprendre le mécanisme d'action du traitement à l'UDCA en voyant quels acides biliaires sont affectés par celui-ci. Bien que les méthodes de chromatographie à haute performance couplée à un détecteur de spectrométrie de masse (HPLC-MS) ou encore la chromatographie gazeuse couplée au même détecteur (GC-MS) représentent des méthodes pertinentes pour les mesures d'acides biliaires totaux dans les fluides, leur utilisation en clinique est plutôt limitée en raison de la complexité de l'instrumentation nécessaire à l'analyse.

Nous émettons l'hypothèse que certains profils d'acides biliaires permettraient d'évaluer le risque de complications chez les femmes atteintes de CIG par leur composition en acides biliaires primaires, secondaires et tertiaires. Par la comparaison des profilages, il pourrait être possible de déterminer la ou les espèces responsables de ces complications et ainsi déterminer s'il est possible de distinguer des sous-groupes de patientes plus à risque de complications ou qui répondraient mieux au traitement. De plus, nous pensons que le traitement à l'UDCA, étant lui-même un acide biliaire, pourrait mener à une interférence lors de la quantification des acides biliaires totaux sériques, particulièrement dans les cas les plus problématiques de CIG où de fortes doses de ce composé sont administrées. Cela ferait en sorte que les valeurs de référence pourraient être modifiées en fonction du traitement administré. Finalement, on pense que le jeûne pourrait avoir un effet sur la quantification des acides biliaires sanguins totaux plus important chez les cas les plus sévères de CIG. En effet, il est connu que suite à un repas, cette concentration peut doubler, surtout lors de l'ingestion d'un repas avec une teneur plus élevée en matières grasses (49, 50). Les patientes atteintes de la CIG de façon plus importante étant affectée par un dérèglement du transport des acides biliaires dans le sang, ce phénomène d'augmentation de la concentration des acides biliaires dans le sang suite à un apport nutritif pourrait être plus important qu'on le pense. Si tel est le cas, il serait pertinent de modifier les valeurs de référence en fonction de l'état nutritionnel de la patiente, ou encore d'exiger que le test se déroule à jeun.

1.6.2 Objectifs

Le but est de développer et de valider une méthode de séparation et de quantification des 15 acides biliaires afin de permettre un profilage de ceux-ci chez les femmes enceintes atteintes ou non de CIG. On vise la comparaison des profilages des acides biliaires pour des échantillons faiblement concentrés à des échantillons plus concentrés en acides biliaires totaux afin de déterminer quelles espèces d'acides biliaires sont les principaux responsables de cette augmentation. Le but également est de comparer cette méthode avec la méthode de quantification des acides biliaires totaux par colorimétrie actuellement utilisée.

1.6.3 Impact

La cholestase intrahépatique de la grossesse est une maladie du foie commune de la grossesse. Elle est diagnostiquée chez les femmes présentant un prurit et des taux élevés d'acide biliaire dans le sérum et mène à beaucoup de complications indésirables lors de la grossesse. On s'attend à près de 900 cas de cholestase de grossesse par année au Québec, et c'est pourquoi le perfectionnement du diagnostic et une meilleure connaissance du fonctionnement du traitement de la maladie sont pertinents. La concentration d'acides biliaires dans le sang doit être surveillée tout au long de la grossesse, car il est de plus en plus évident que des taux élevés sont associés à un risque accru d'effets périnataux défavorables, y compris la mortinaissance. En développant un nouveau test permettant le profilage des acides biliaires dans le sang, nous pourrions être en mesure de mieux comprendre la maladie. Un profilage des acides biliaires ainsi que la connaissance des effets du jeûne et du traitement à l'UDCA permettraient aux obstétriciens une meilleure connaissance de la maladie et de l'effet du traitement sur celle-ci. Finalement, cela apportera plus de connaissances au niveau des causes biologiques de la maladie en déterminant quelles sont les principales espèces responsables de l'augmentation de la concentration d'acides biliaires dans le sang.

2 Méthodologie

2.1 Réactifs, solvants et solutions stock

Les solutions de référence des acides biliaires proviennent de Sigma Aldrich (CDCA, CA, TCA, DCA, LCA et UDCA) et de Cayman Chemical (GCDCA, TCDCA, GCA, GDCA, TDCA, GLCA, TLCA, GUDCA et TUDCA). Les standards internes utilisés sont le CDCA-2,2,4,4-d4, CA-2,2,4,4-d4 ainsi que le DCA-2,2,4,4-d4 provenant de Sigma Aldrich. Ces 3 étalons internes sont utilisés pour les 15 molécules alors qu'ils ont des structures analogues et cela garantit ainsi des comportements chimique et analytique similaires pour tous. Tous les solvants organiques et autres produits sont fournis par Sigma Aldrich. Tous les produits utilisés sont de grade HPLC. De l'eau ultra pure a été obtenue par le système de purification d'eau Milli-Q Advantage A10 de Millipore (résistivité : 18,2 M Ω .cm, TOC² : <5 μ g/L). Le sérum utilisé pour les tests de validation est le DDC Mass Spect Gold Serum de Sigma Aldrich.

2.2 Solutions de travail

À partir des solutions de référence, des solutions de travail de 500 μ g/mL ont été préparées pour chacun des 15 acides biliaires de façon individuelle et sont conservées à -28°C. Une solution standard des 15 acides biliaires de référence (8 μ g/mL) et une solution standard de standards internes (1 mg/mL) ont été préparées dans une solution de méthanol 50%. Ces solutions sont conservées à 4°C jusqu'à leur utilisation, alors qu'il a été établi que ces composés sont stables sous ces conditions sur de longues périodes (12). Des tests de stabilité seront réalisés dans les étapes subséquentes du projet.

Le tableau I présente les facteurs permettant la conversion de la concentration des acides biliaires de mg/mL en μ mol/L.

Tableau I. Facteurs de conversion des 15 acides biliaires et 3 standards internes permettant d'exprimer la concentration en $\mu\text{mol/L}$

Acide biliaire	Masse molaire (g/mol)	Concentration pour 1 $\mu\text{g/mL}$ ($\mu\text{mol/L}$)
CDCA	392,57	2,55
G-CDCA	471,60	2,12
T-CDCA	521,70	1,92
CDCA-d ₄	396,60	2,52
CA	408,57	2,45
G-CA	465,60	2,15
T-CA	537,68	1,86
CA-d ₄	412,60	2,42
DCA	392,57	2,55
G-DCA	449,60	2,22
T-DCA	521,70	1,92
DCA-d ₄	396,60	2,52
LCA	376,57	2,66
G-LCA	433,60	2,31
T-LCA	505,70	1,98
UDCA	392,57	2,55
G-UDCA	449,60	2,22
T-UDCA	499,70	2,00

2.3 Échantillons sanguins

Les sérums des patientes ont été obtenus auprès du Centre hospitalier de l'Université de Montréal. Les échantillons de sérum sont dénominalisés et ont été stockés à 4°C pour un maximum de 3 jours avant l'analyse, tel que recommandé pour la quantification d'acides biliaires totaux sériques au CHUM. Des tests de stabilité auront également lieu dans les étapes subséquentes du projet afin de valider la stabilité des acides biliaires sériques lors de leur conservation sous diverses conditions. L'utilisation de ces échantillons pour l'étude a été approuvée par le comité d'éthique de la recherche (CÉR) du CHUM (n° 2020-8510).

2.4 Quantification des acides biliaires par MS/MS

Un système de chromatographie liquide Agilent 1200 series couplé à un détecteur de type quadripôle MS/MS Agilent 6410 est utilisé pour la quantification. L'ionisation est faite par électro nébulisation et le détecteur est utilisé en mode négatif. Plusieurs essais sont effectués et les résultats sont comparés afin de déterminer les paramètres de détection optimaux. Afin de déterminer la méthodologie pour la quantification des acides biliaires sériques par MS/MS, plusieurs résultats intermédiaires ont donc été obtenus.

2.4.1 Optimisation des paramètres de détection par le détecteur de type quadripôle MS/MS Agilent 6410

2.4.1.1 Détermination de la masse des ions précurseurs : Mode SCAN

5 μ L de la solution de référence 1 μ g/mL des 15 acides biliaires individuels ainsi que des 3 standard internes individuels sont injectés dans le système sans colonne et le mode *scan* est utilisé afin de déterminer la masse de l'ion précurseur (m/z) pour chaque espèce. Les conditions de la source ESI sont les suivantes : Température de la source : 350 °C, débit gazeux : 12 L/min, Pression : 60 psi, différence de potentiel : -4 kV. La figure 13 présente un exemple de spectre obtenu (voir section résultats).

2.4.1.2 Optimisation du fragmenteur

Les paramètres de la fragmentation sont optimisés en injectant 5 μL de la solution de référence 1 $\mu\text{g/mL}$ des acides biliaires individuels ainsi que des 3 standards internes individuels dans le système (sans colonne) et le mode *simple ion monitoring* (SIM) est utilisé. La masse du précurseur utilisée est celle trouvée lors la détermination de la masse des ions précurseurs par le mode *scan* pour les 18 acides biliaires. Pour chaque espèce, différents essais sont effectués avec des fragmenteur allant de 100 à 300 V à raison de sauts de 20 V. Les pics obtenus sont comparés et le fragmenteur ayant permis l'obtention du pic le plus abondant est sélectionné. La figure 14 présente un exemple des pics obtenus lorsque le fragmenteur est modifié (voir section résultats).

2.4.1.3 Sélection de l'ion produit

5 μL de la solution de référence 1 $\mu\text{g/mL}$ des 15 acides biliaires individuels ainsi que des 3 standard internes individuels sont injectés dans le système sans colonne et le mode *product ion scan* (PIS) est utilisé en utilisant la masse de l'ion précurseur ainsi que le fragmenteur précédemment déterminés. Le spectre obtenu permet la sélection de l'ion produit le plus abondant suite à la fragmentation. La figure 15 présente un exemple des spectres obtenus (voir section résultats).

2.4.1.4 Optimisation de l'énergie de collision

5 μL de la solution de référence 1 $\mu\text{g/mL}$ des 15 acides biliaires individuels ainsi que des 3 standards internes individuels sont injectés dans le système sans colonne et le mode *multiple ion monitoring* (MRM) est utilisé. Pour chaque espèce, différents essais sont effectués avec des énergies de collision allant de 0 à 100 V à raison de sauts de 5V. Les pics obtenus sont comparés et l'énergie de collision ayant permis l'obtention du pic le plus

abondant est sélectionnée. La figure 16 présente un exemple des pics obtenus lorsque l'énergie de collision est modifiée (voir section résultats).

2.5 Séparation des acides biliaires par chromatographie liquide

Pour les paramètres de la chromatographie liquide, 5 μL de la solution standard des 15 acides biliaires de référence (8 $\mu\text{g/mL}$) et de standards internes (1 mg/mL) sont injectés sur différentes colonnes et les paramètres sont définis à la suite de plusieurs essais testant différentes phases mobiles et gradients. Des résultats intermédiaires sont donc obtenus. Les colonnes de type interactions hydrophobes Kinetex XB-C₁₈ (4,6x100 mm; 2,6 μ), Synergi Hydro-RP (4,6x150 mm; 4 μ), ainsi que Kinetex C₁₈ (4,6x50 mm; 2,6 μ) ont été utilisées. Différents gradients, débits, températures de colonne, et phases mobiles sont également testés. Les figures 17 à 19 présentent des exemples de chromatogrammes obtenus suite au test de plusieurs protocoles de séparation utilisant différentes colonnes, différentes phases mobiles et différents gradients (voir section résultats).

2.6 Calibrateurs et contrôles de qualité

La courbe de calibration est faite par dilution sériée du sérum négatif fortifié avec la solution de référence des 15 acides biliaires à des concentrations de 8, 4, 2, 0.5, 0.125, 0.031 et 0,008 $\mu\text{g/mL}$. 2 contrôles de qualité sont préparés dans du sérum négatif fortifié avec la solution de référence des 15 acides biliaires, le premier à 5 $\mu\text{g/mL}$ et le second à 0,8 $\mu\text{g/mL}$. La courbe de calibration est conservée à 4°C pour un maximum de 1 semaine. Cette courbe de calibration est utilisée pour la quantification des acides biliaires lors d'analyses subséquentes. Les contrôles de qualité sont aliquotés et conservés à -18°C. Une aliquote de chacun des contrôles de qualité est remise à température pièce et injectée lors de chaque analyse subséquente afin de s'assurer de la validité de l'analyse. La stabilité des analytes dans ces conditions est testée dans une étape subséquente du projet.

2.7 Analyse des résultats

La concentration en acides biliaires totaux est calculée en faisant la somme des tous les acides biliaires individuels quantifiés. La proportion relative d'un acide biliaire précis correspond à sa concentration individuelle divisée par la concentration en acides biliaires totaux.

2.8 Préparation des échantillons : Rendement d'extraction des acides biliaires à partir d'échantillons de sérum négatif fortifié

Plusieurs méthodes d'extraction organique sont testées afin de sélectionner celle permettant le plus grand rendement. Le taux de recouvrement des 15 analytes suivant leur extraction de la matrice biologique (sérum) est évalué. 10 quantifications à 2 niveaux de concentration (5 $\mu\text{g/mL}$ et le second à 0,8 $\mu\text{g/mL}$) dans le sérum sont effectuées et comparées à la réponse instrumentale de 10 mesures de l'analyte dans une matrice aqueuse (100% H_2O) à une concentration équivalente suite à l'extraction. En analysant les résultats obtenus par LC-MS/MS, on est en mesure de comparer la concentration obtenue de l'échantillon fortifié avant l'extraction à partir du sérum et la concentration obtenue de l'échantillon fortifié dans une matrice aqueuse après l'extraction. Le rendement de l'extraction peut alors être calculé. Une extraction utilisant 200 μL de méthanol, 400 μL de méthanol et 200 μL d'acétonitrile sont testés. 100 μL de sérum sont mélangés avec 200 μL de méthanol, 200 μL d'acétonitrile ou encore 400 μL de méthanol, ainsi que 10 μL du mélange de standards internes (CDCA-d4, CA-d4 ainsi que DCA-d4). Suite à un vortex, les échantillons sont mélangés mécaniquement pendant 10 min puis centrifugés 5 min à 16 200g. Le surnageant est récupéré puis 10 μL sont injectés dans le LC-MS/MS. Les résultats des protocoles d'extraction sont présentés au tableau IV (voir section résultats).

2.9 Validation du protocole établi

Suite à la comparaison des différents protocoles testés, le protocole optimal pour la détection, la séparation et l'extraction des analytes est déterminé. Celui-ci est utilisé pour toutes les étapes subséquentes du projet. Les rapports masse/charge des précurseurs, les voltages du fragmenteur, les masses des ions produits ainsi que les énergies de collision optimisées pour chacune des 18 espèces sont consolidés dans le tableau II (voir section résultats) et seront utilisés pour la quantification des acides biliaires pour toutes les étapes subséquentes du projet.

La colonne utilisée pour la séparation est Kinetex XB-C₁₈ (4,6x100 mm; 2,6 μ). La colonne est maintenue à une température de 40°C, la chromatographie est opérée en mode gradient avec une phase A aqueuse composée d'acide formique 0,1% et une phase B organique composée de méthanol 100%. Un gradient de 75% à 100% de phase B est appliqué entre 0 et 12,2 min. Un plateau de 100% de phase B est maintenu jusqu'à 15 min, suivi d'un retour à 75% de phase B. Finalement, la phase est maintenue à 75% B pour un lavage de 2 min. La figure 20 présente le chromatogramme obtenu suite à la séparation utilisant les paramètres retenus et décrits plus-haut (voir section résultats).

Le traitement des échantillons de sérum pour l'extraction des acides biliaires est le suivant pour le reste du projet : 100 μ L de sérum sont mélangés avec 200 μ L de méthanol ainsi que 10 μ L du mélange de standards internes (CDCA-d4, CA-d4 ainsi que DCA-d4). Suite à un vortex, les échantillons sont mélangés mécaniquement pendant 10 minutes puis centrifugés 5 minutes à 16 200g. Le surnageant est récupéré puis 10 μ L sont injectés dans le LC-MS/MS. Suite à l'élaboration du protocole optimal pour la détection et la séparation des analytes, la validation de celui-ci confirme sa conformité.

2.9.1 Suppression d'ion

10 échantillons de sérum négatif subissent l'extraction en remplaçant le standard interne par une solution de composition identique : MeOH 50%. 5 échantillons d'eau qui servent de comparateurs subissent également l'extraction. Par la suite, les analytes et les standards internes sont ajoutés afin de fortifier ces échantillons de sérum et d'eau. Les ajouts dosés sont effectués à des concentrations représentatives des analytes et standards internes à 2 niveaux de contrôle de qualité. La suppression d'ions est évaluée en calculant le ratio de la réponse instrumentale des analytes ajoutés dans la matrice biologique extraite par rapport à la réponse instrumentale de la même quantité d'analytes ajouté dans l'eau extraite. Un changement de signal signifie que le résultat de l'analyse est influencé par la matrice.

2.9.2 Limite de détection (LOD)

Les LOD des 15 acides biliaires sont déterminés en faisant une régression linéaire avec des niveaux faiblement concentrés équidistants pour chacun des acides biliaires individuels par dilution en série. La plus faible concentration pouvant être détectée, distinguée de 3 signaux de blanc et quantifiée à la suite des étapes d'extraction correspond à la limite de détection. Les échantillons sont préparés par dilution en série à partir d'une solution de 5 $\mu\text{g/mL}$ jusqu'à une concentration de 0,0005 $\mu\text{g/mL}$. Les concentrations sont ensuite converties par en $\mu\text{mol/L}$ pour chacun des acides biliaires individuels.

2.9.3 Précisions intra et inter-jour

La précision est mesurée en termes de coefficients de variation du paramètre mesuré. L'imprécision analytique intra-essai (%CV) de la méthode de quantification des acides biliaires par LC-MS/MS est déterminée en effectuant des mesures répétées des 2 niveaux de contrôles de qualité (CQH = 5 $\mu\text{g/mL}$ CQB= 0,8 $\mu\text{g/mL}$) effectuées dans une même série analytique la même journée (n=9, duplicata). L'imprécision analytique inter-essai (%CV) de la méthode de quantification par LC-MS/MS est déterminée en effectuant des lectures répétées

de chaque niveau de contrôle de qualité qui sont effectuées à raison d'une mesure par série analytique, sur différentes journées (n=15, duplicata).

2.9.4 Linéarité

La linéarité est déterminée par une régression linéaire faite par dilution en série avec 6 niveaux d'acides biliaires répartis adéquatement dans l'intervalle de mesure anticipé (entre 0,2 et 200 $\mu\text{mol/L}$), dans une matrice identique aux échantillons patients (sérum). Le coefficient de corrélation est obtenu en traçant la droite de régression sur Excel.

2.9.5 Évaluation de la stabilité des échantillons entreposés et congelés/décongelés

La stabilité est déterminée pour chacune des espèces d'acide biliaire. Pour ce faire, des échantillons de CQH et CQB sont conservés à température pièce, à 4°C ainsi qu'à -28°C et sont dosés en triplicata après 24h et 5 jours. Les CQH et CQB sont également dosés après trois cycles de congélation/décongélation, alors que la glace sèche est utilisée pour le gel. Dans tous les cas, on s'intéresse à la réponse relative de l'échantillon gardé selon la condition étudiée, en comparaison avec la réponse obtenue suite au dosage des contrôles de qualités fraîchement préparés. Les contrôles fraîchement préparés sont la référence à 100% de signal.

2.9.6 Corrélation avec la méthode enzymatique traditionnelle

232 spécimens dénominalisés de patients conservés selon des conditions assurant la stabilité des analytes dans le sérum (stockés à 4°C pour un maximum de 3 jours), sont analysés par 2 méthodes sur plusieurs mois : en duplicata par LC-MS/MS ainsi que par une mesure unique du kit de dosage colorimétrique des acides biliaires totaux par GenWay. Une dilution est effectuée pour les échantillons de concentration en acides biliaires totaux dépassant l'intervalle de linéarité de chacun des tests (LC-MS/MS : 200 $\mu\text{mol/L}$, kit de dosage

colorimétrique des acides biliaires totaux par GenWay : $100\mu\text{mol/L}$). Une régression linéaire est ensuite tracée avec le logiciel Analys-It intégré dans excel. Le modèle régression de type Deming pondéré est utilisé.

2.10 Exactitude des 2 méthodes pour chaque acide biliaire individuel

Afin de comparer la sensibilité à détecter un changement d'un seul acide biliaire, les acides biliaires sont d'abord dosés de façon individuelle dans le sérum négatif fortifié. La première tentative fut de fortifier le sérum négatif avec chaque acide biliaire de façon individuelle afin d'obtenir une solution concentrée à $4\mu\text{g/mL}$, puis d'effectuer une dilution 1:1 afin d'obtenir également un échantillon de sérum négatif fortifié à $2\mu\text{g/mL}$. Les concentrations en acides biliaires totaux des 15 échantillons à 2 concentrations sont mesurées par la méthode LC-MS/MS développée, puis par le kit de dosage colorimétrique des acides biliaires totaux par GenWay, en duplicata. On s'intéresse à la concentration en acides biliaires totaux obtenue en fonction de la concentration réelle, pour chacune des 2 méthodes. L'Exactitude du résultat est calculée en soustrayant la concentration d'acides biliaires totaux avant l'ajout de l'acide biliaire individuel à la concentration d'acides biliaires totaux après l'ajout de l'acide biliaire individuel, divisé par la concentration réelle de l'acide biliaire individuel ajouté. L'exactitude est exprimée en pourcentage pour chacune des 2 méthodes

La 2^e tentative fût de fortifier le sérum négatif avec chaque acide biliaire de façon individuelle afin d'obtenir une solution concentrée à $50\mu\text{g/mL}$, puis d'effectuer une dilution 1:1 afin d'obtenir également un échantillon de sérum négatif fortifié à $25\mu\text{g/mL}$. Les concentrations en acides biliaires totaux des 15 échantillons à 2 concentrations sont mesurées par la méthode LC-MS/MS développée, puis par le kit de dosage colorimétrique des acides biliaires totaux par GenWay, en duplicata. L'exactitude des résultats obtenus sont comparés.

Dans un 3^e temps, on fortifie des échantillons de sérum initialement concentrés entre 10 et 15 $\mu\text{mol/L}$ d'acides biliaires totaux avec un acide biliaire individuel de façon à augmenter la concentration totale d'acides biliaires de l'échantillon de 10 $\mu\text{mol/L}$. La concentration en acides biliaires totaux réelle est calculée en fonction de la concentration de l'échantillon de sérum de départ. Les concentrations en acides biliaires totaux des 15 échantillons sont mesurées par la méthode LC-MS/MS développée, puis par le kit de dosage colorimétrique des acides biliaires totaux par GenWay, en duplicata. On s'intéresse à la concentration en acides biliaires totaux obtenue en fonction de la concentration réelle, pour chacune des 2 méthodes. La concentration réelle est rapportée sur 100% et l'exactitude de la quantification est exprimée en pourcentage.

3 Résultats

3.1 Optimisation des paramètres de détection par le détecteur de type quadripôle MS/MS Agilent 6410

Dans le but de déterminer les paramètres optimaux de détection par le détecteur de type quadripôle MS/MS Agilent 6410 pour chaque espèce d'acide biliaire, diverses injections de la solution de référence de chacun des acides biliaires individuels sont faites. Les 4 paramètres à déterminer ou optimiser sont la masse des ions précurseurs, où le mode SCAN est utilisé, l'énergie du fragmenteur, où le mode SIM est utilisé, la sélection de l'ion produit, où le mode PIS est utilisé, ainsi que l'énergie de collision, où le mode MRM est utilisé. Les figures 13 à 16 démontrent un exemple de chacun des résultats obtenus, pour l'acide biliaire GCA. En Y, on retrouve le correspondant à la comparaison entre le signal souhaité au niveau du bruit de fond. Le tableau II démontre les rapports masse/charge des précurseurs, les voltages du fragmenteur, les masse des ions produits ainsi que les énergies de collision optimisés pour chacune des 18 espèces. Ceux-ci seront utilisés pour la quantification des acides biliaires pour toutes les étapes subséquentes du projet.

3.1.1 Détermination de la masse des ions précurseurs (mode SCAN)

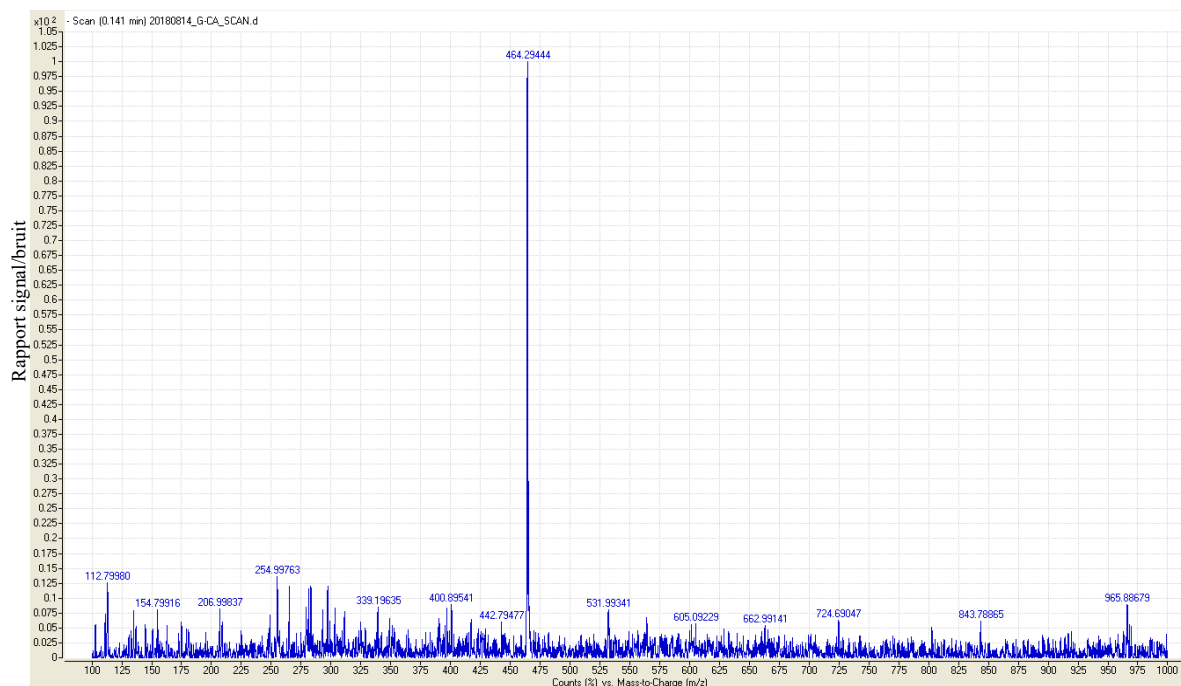


Figure 13. Détermination de l'ion précurseur par le mode SCAN pour le GCA

5 μL de la solution de référence 1 $\mu\text{g/mL}$ de l'acide biliaire GCA individuel sont injectés dans le système sans colonne et le mode SCAN est utilisé en utilisant les conditions de la source ESI : Température de la source : 350 $^{\circ}\text{C}$, débit gazeux : 12 L/min, Pression : 60 psi, différence de potentiel : -4 kV.

3.1.2 Optimisation du fragmenteur (mode SIM)

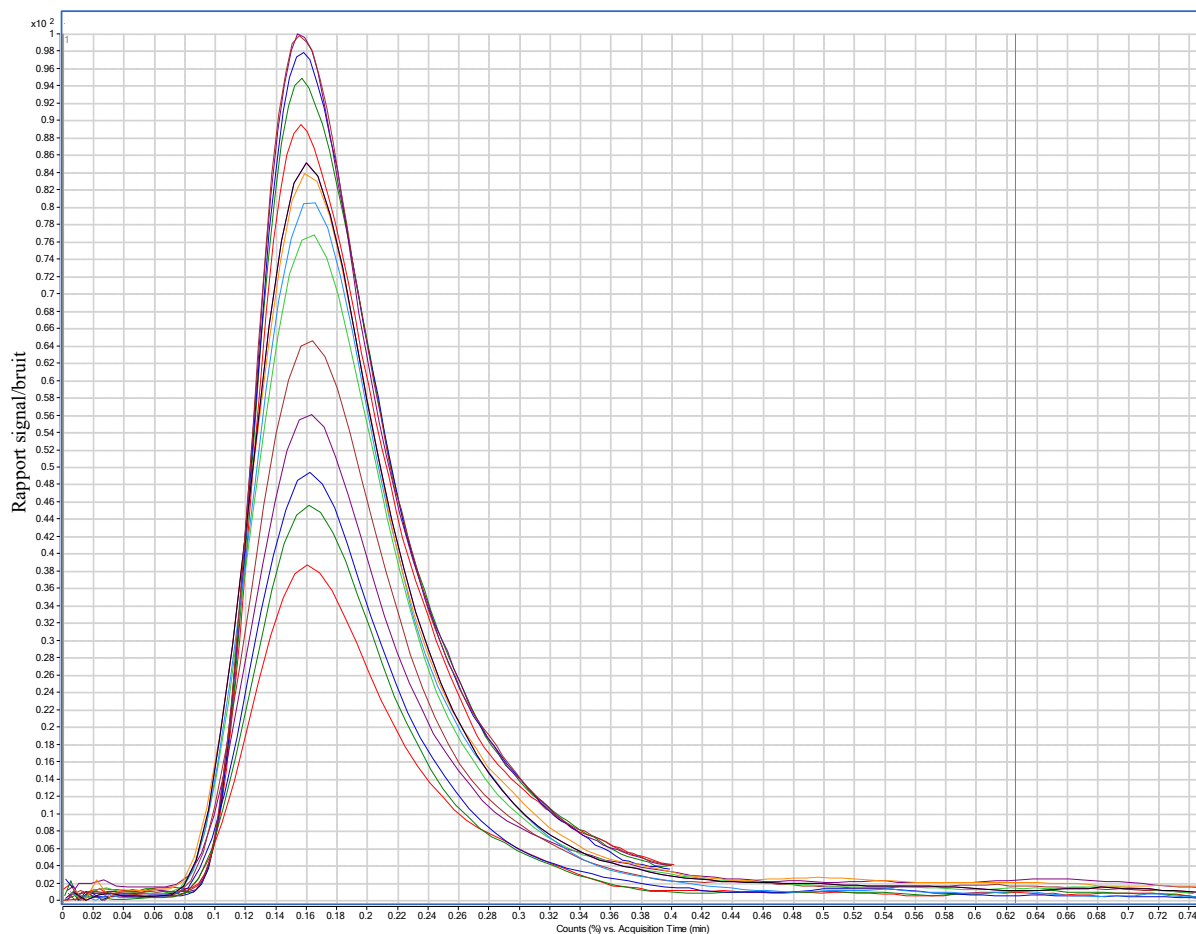


Figure 14. Optimisation du fragmenteur par le mode SIM pour le GCA

5 μL de la solution de référence 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de l'acide biliaire GCA individuel sont injectés dans le système sans colonne et le mode *single ion monitoring* (SIM) est utilisé en utilisant les conditions de la source ESI : Température de la source : 350°C, débit gazeux : 12 L/min, Pression : 60 psi, différence de potentiel : -4k V. La masse de l'ion précurseur établie lors du mode SCAN est utilisée, soit 464,3 pour le GCA. Le fragmenteur est réglé de 100 à 300 V à raison de sauts de 20 V, et de 165 à 195 à raison de sauts de 5 V. Les résultats obtenus sont superposés.

3.1.3 Sélection de l'ion produit (mode PIS)

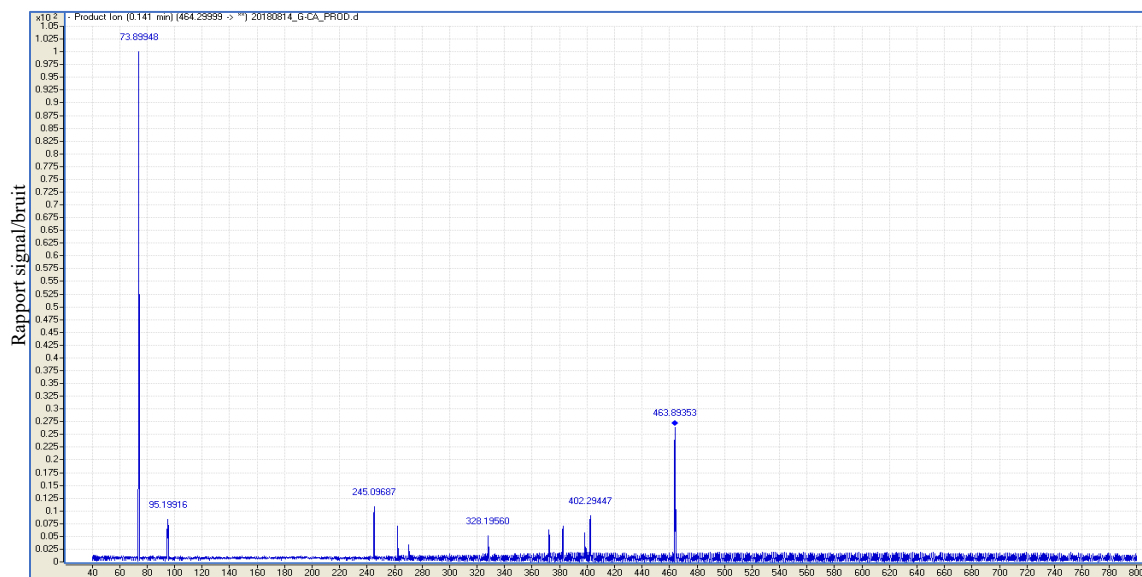


Figure 15. Détermination de l'ion produit par le mode PIS pour le GCA

5 μL de la solution de référence 1 $\mu\text{g/mL}$ de l'acide biliaire GCA individuel sont injectés dans le système sans colonne et le mode *product ion scan* est utilisé en utilisant les conditions de la source ESI : Température de la source : 350°C, débit gazeux : 12 L/min, Pression : 60 psi, différence de potentiel : -4kV. La masse de l'ion précurseur établie lors du mode SCAN est utilisée, soit 464,3 pour le GCA. Le fragmenteur est réglé selon les résultats du mode SIM, soit à 180 V pour le GCA.

3.1.4 Optimisation de l'énergie de collision (mode MRM)

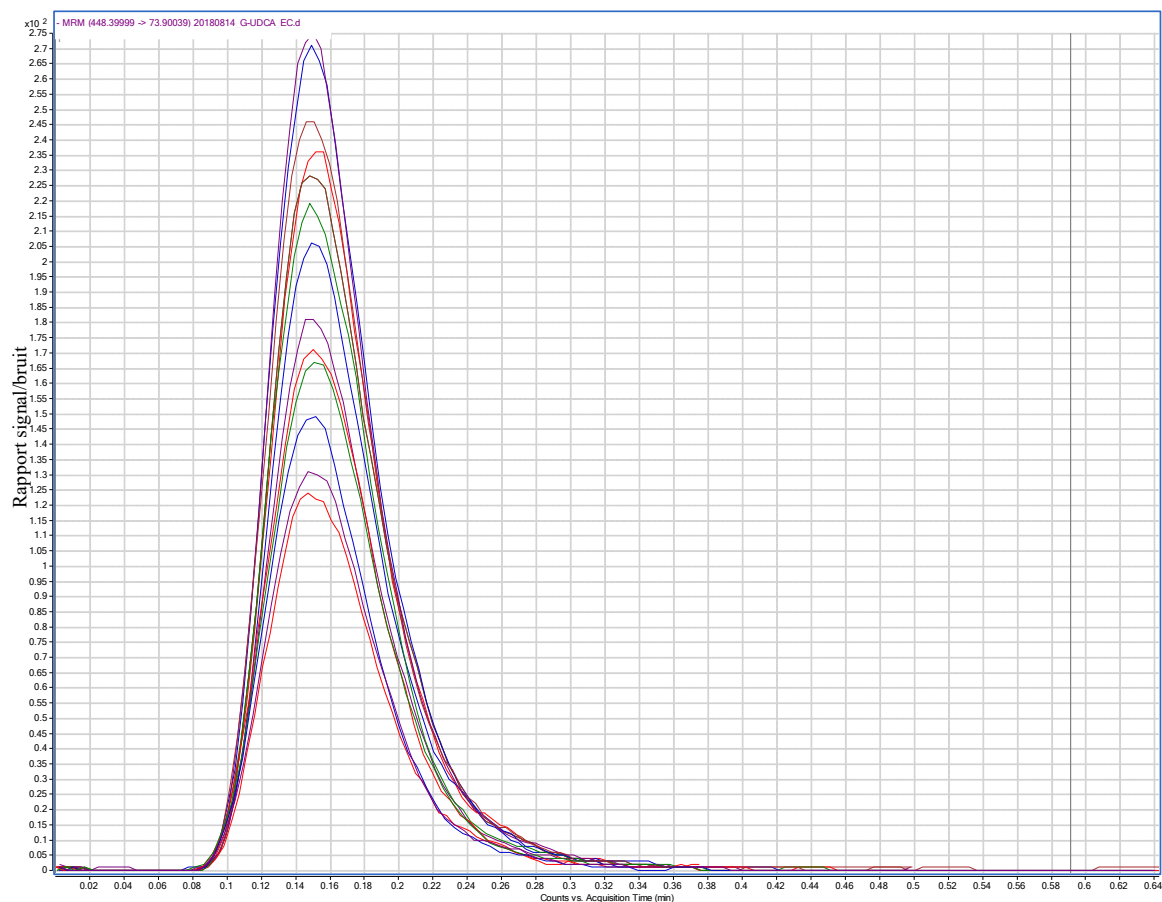


Figure 16. Optimisation de l'énergie de collision par le mode MRM pour le GCA

5 μL de la solution de référence $1\mu\text{g/mL}$ de l'acide biliaire GCA individuel sont injectés dans le système sans colonne et le mode *multiple reactions monitoring* (MRM) est utilisé en utilisant les conditions de la source ESI : Température de la source : 350°C , débit gazeux : 12 L/min, Pression : 60 psi, différence de potentiel : -4 kV. La masse de l'ion précurseur établie lors du mode SCAN est utilisée, soit 464,3 pour le GCA. Le fragmenteur est réglé selon les résultats du mode SIM, soit à 180V pour le GCA. La masse de l'ion produit établie lors du mode PIS est utilisée, soit 73,9 pour le GCA. L'énergie de collision est réglée de 0 à 100 V à raison de sauts de 20 V, et de 20 à 60 à raison de sauts de 5 V. Les résultats obtenus sont superposés.

3.1.5 Consolidation des 4 paramètres optimisés pour chacun des 18 acides biliaires étudiés

Tableau II. Paramètres de détection optimisés pour chaque espèce d'acide biliaire, tels que montrés dans la section méthodologie

Acide biliaire	Ion parent m/z	Ion produit m/z	Fragmenteur (V)	Énergie de collision (V)
CDCA	391,2	391,2	180	10
G-CDCA	448,2	74	200	35
T-CDCA	498,2	79,9	200	105
CA	407,3	407,3	180	10
G-CA	464,3	73,9	180	45
T-CA	514,3	80	180	85
DCA	391,3	391,3	180	10
G-DCA	448,4	74,1	180	50
T-DCA	498,3	80	200	90
LCA	375,2	375,2	220	10
G-LCA	432,3	73,9	180	35
T-LCA	482,3	79,9	220	88
UDCA	391,4	391,2	200	10
G-UDCA	448,4	73,9	180	40
T-UDCA	498,2	80	215	90
CDCA-d4	395,1	395,1	200	5
CA-d4	411,4	411,4	200	5
DCA-d4	395,4	395,4	200	5

3.2 Séparation des acides biliaires par chromatographie liquide

Ensuite, les paramètres de séparation de la chromatographie liquide sont optimisés, ce qui vise une séparation des composants d'un mélange. Plusieurs colonnes, de différentes longueurs et comportant différentes phases stationnaires plus ou moins apolaires, ainsi que différentes phases mobiles et différents gradients sont testés lors de l'injection de la solution standard des 15 acides biliaires. Les figures 17 à 19 présentent différents chromatogrammes obtenus lors de cette étape. Les chromatogrammes obtenus sont présentés en chromatogrammes du courant ionique total (TIC), qui représentent en Y l'intensité additionnée sur toute la gamme des masses détectées à chaque point de l'analyse.

À la figure 17, on compare les résultats obtenus par l'utilisation des colonnes Kinetex C₁₈ (4,6x50 mm; 2,6 μ), Synergi Hydro-RP (4,6x150 mm; 4 μ) et Kinetex XB-C₁₈ (4,6x100 mm; 2,6 μ), qui comportent toutes des phases stationnaires hydrophobes. Ces colonnes permettent donc d'exploiter les propriétés hydrophobes des acides biliaires. En A (Kinetex C₁₈ (4,6x50 mm; 2,6 μ)), on voit que certaines espèces ne sont pas bien séparées. C'est notamment le cas pour le dernier signal (9 min) qui regroupe 3 espèces et le signal au temps 7 min qui regroupe 2 espèces. On distingue 9 signaux sur le spectre, regroupant uniquement 17 espèces d'acides biliaires. En effet, on note l'absence totale d'une espèce (LCA). En B (Synergi Hydro-RP (4,6x150 mm; 4 μ)), on voit 11 signaux, ce qui témoigne déjà d'une meilleure séparation. On voit que les 2 espèces n'ayant pas été tout à fait séparées en A au temps 7 min sont maintenant plus distinctes. On voit également à 12 min l'apparition du pic LCA, qui était manquant en A. Le chromatogramme obtenu en C (Kinetex XB-C₁₈ (4,6x100 mm; 2,6 μ)) démontre également 11 signaux et est semblable avec le chromatogramme B. Cependant, on voit un décalage vers la droite de tous les pics, ce qui signifie une meilleure interaction entre les analytes et la colonne. Cela signifie qu'en modifiant les phases mobiles et les gradients, une séparation mieux contrôlée pourra être effectuée.

À la figure 18, on compare l'efficacité de 2 différentes phases mobiles alors que la colonne et le gradient sont les mêmes. En A, les phases mobiles sont: Phase A: Acide formique 2%, Phase B: Acétonitrile 100%B et en B, les phases mobiles sont : Phase A: Acide formique 2%, Phase B: Méthanol 100%. Sur le chromatogramme A, les signaux sont compris dans entre 2 et 9,5 min environ, alors qu'ils sont compris entre 5 et 13,5 min en B. Cela permet donc une meilleure séparation en général. L'utilisation du méthanol 100% permet donc un contrôle supérieur pour la séparation. En modifiant le gradient, il sera possible de faire une séparation encore plus efficace.

À la figure 19, on compare différents gradients tout en conservant la colonne et les phases mobiles sélectionnées plus tôt. On voit tout de suite que les gradients D et E ne permettent pas une meilleure séparation alors que les pics ne sont pas plus étalés sur l'intervalle de temps. En B, on voit qu'on perd la bonne séparation des espèces au temps 6,5 min. Il est évident que le chromatogramme A présente les meilleurs résultats de séparation alors que les pics s'étalent sur un intervalle beaucoup plus grand, soit entre 3,5 et 15 min environ.

La figure 20 démontre le chromatogramme obtenu suite à l'injection de la solution standard afin la colonne, les phases mobiles et les gradients ayant démontré les meilleurs résultats. Le temps d'analyse total est de 17 minutes.

3.2.1 Sélection de la colonne

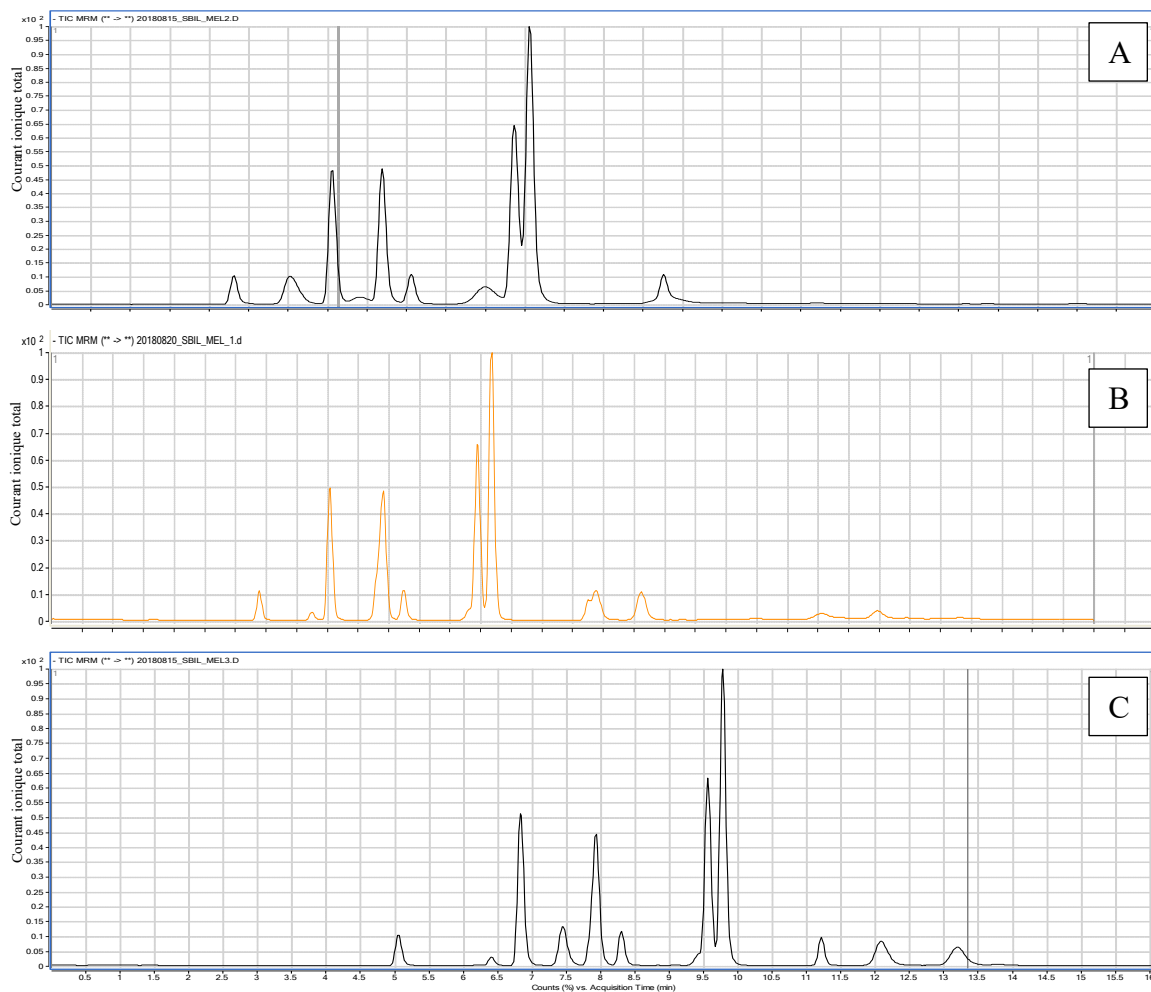


Figure 17. Comparaison des différents chromatogrammes obtenus en fonction des différentes colonnes utilisées

Les phases et gradients sont identiques entre les essais et les conditions utilisées sont les suivantes : Phase A: Acide formique 2%. Phase B: Méthanol 100%. Gradient de 60% à 100% de B sur 10 minutes, puis B maintenu à 100% jusqu'à l'éluion complète des espèces jusqu'à 16 minutes.

A: Kinetex C₁₈ (4,6x50 mm; 2,6 μ).

B: Synergi Hydro-RP (4,6x150 mm; 4 μ).

C : Kinetex XB-C₁₈ (4,6x100 mm; 2,6 μ).

3.2.2 Sélection des phases mobiles

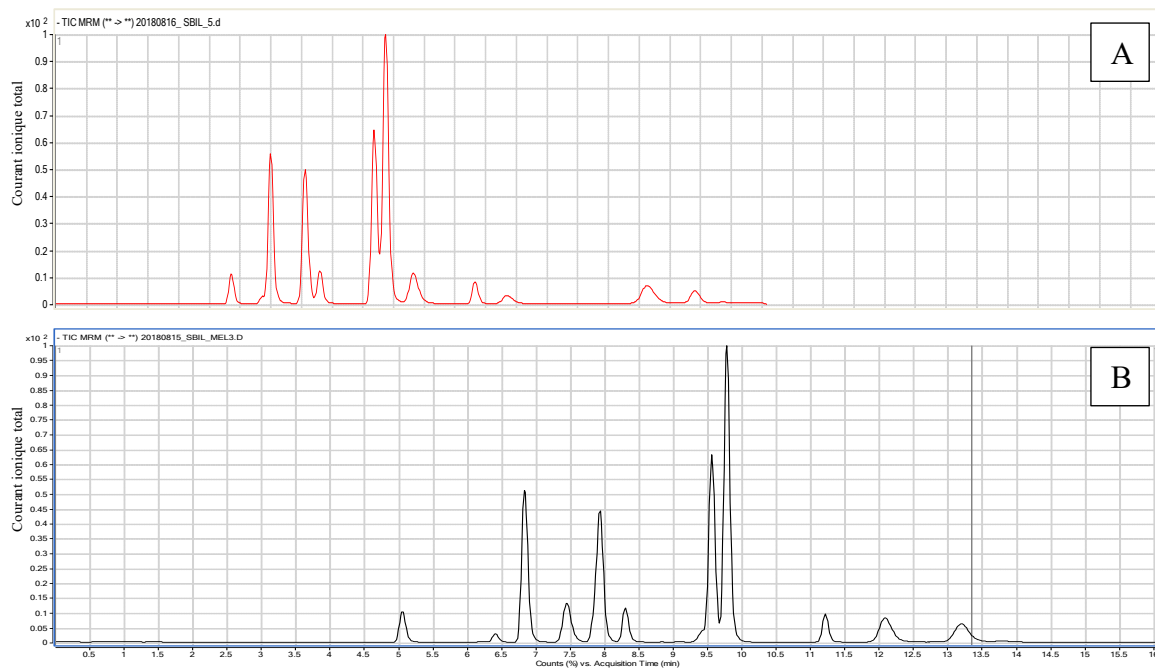


Figure 18. Comparaison des différents chromatogrammes obtenus en fonction des différentes phases mobiles utilisées

La colonne et les gradients utilisés sont identiques entre les essais et les conditions utilisées sont les suivantes : Colonne Kinetex XB-C₁₈ (4,6x100 mm; 2,6 μ). Gradient de 60% à 100% de B sur 10 minutes, puis B maintenu à 100% jusqu'à l'élution complète des espèces jusqu'à 16 minutes.

A: Phase A: Acide formique 2%. Phase B: Acétonitrile 100%

B: Phase A: Acide formique 2%. Phase B: Methanol 100%.

3.2.3 Sélection des gradients

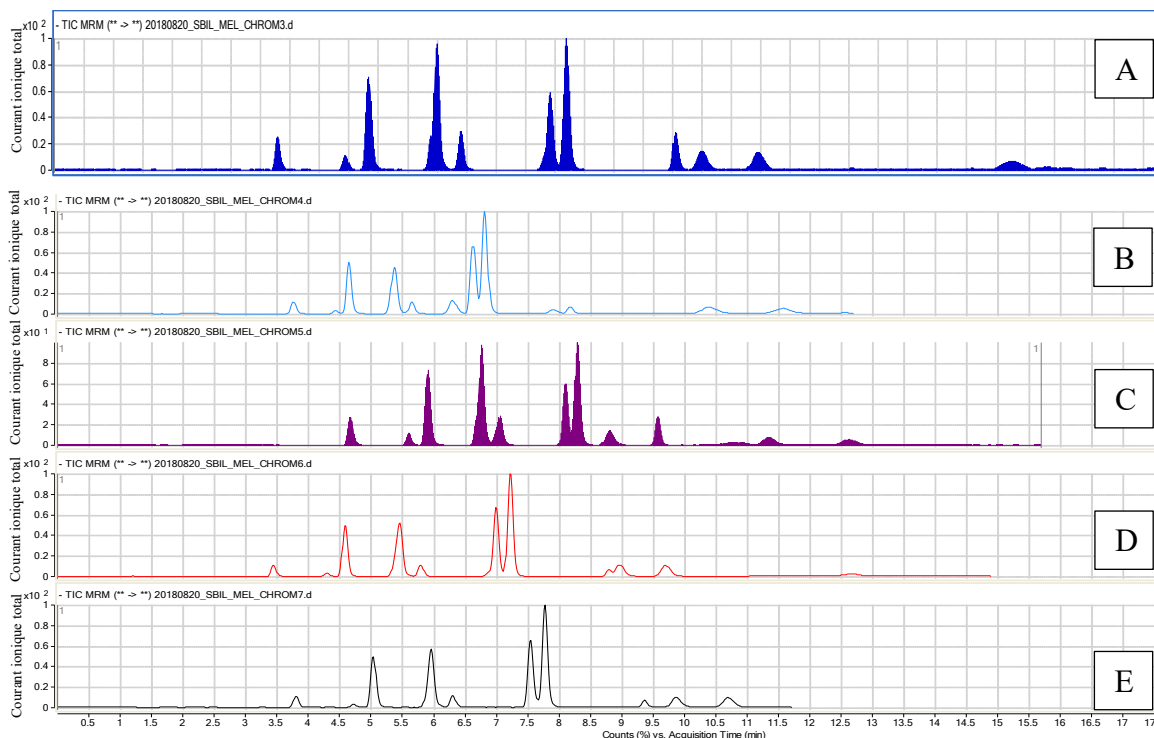


Figure 19. Comparaison des différents chromatogrammes obtenus en fonction des différents gradients testés

La colonne et les phases utilisées sont identiques entre les essais: Colonne Kinetex XB-C₁₈ (4,6x100 mm; 2,6 μ). Phase A: Acide formique 2%. Phase B: Methanol 100%.

A : Un gradient de 75% à 100% de phase B est appliqué entre 0 et 12,2 minutes. Un plateau de 100% de phase B est maintenu jusqu'à 15 minutes, suivi d'un retour à 75% de phase B. La phase est maintenue à 75% B pour un lavage de 2 minutes.

B: Gradient de 85% à 97% de B sur 8 minutes, B maintenu à 97% pour 1,5 minutes, puis B de 97 à 85% sur 1,5 minutes. B maintenu à 85% jusqu'à l'élution complète des espèces jusqu'à 20 minutes.

C : B maintenu à 65% pour 4 minutes, puis augmente jusqu'à 75% en 1 minute. B augmente graduellement à 90% en 7 minutes. B maintenu à 100% pendant 5 minutes.

D : Gradient de 0 à 100% de B sur 10 minutes.

E: Gradient de 0% à 50% de B sur 5 minutes, 50% à 70% sur 3 minutes, 70% à 100% sur 8 minutes, puis B maintenu à 100% jusqu'à l'élution complète des espèces jusqu'à 20 minutes.

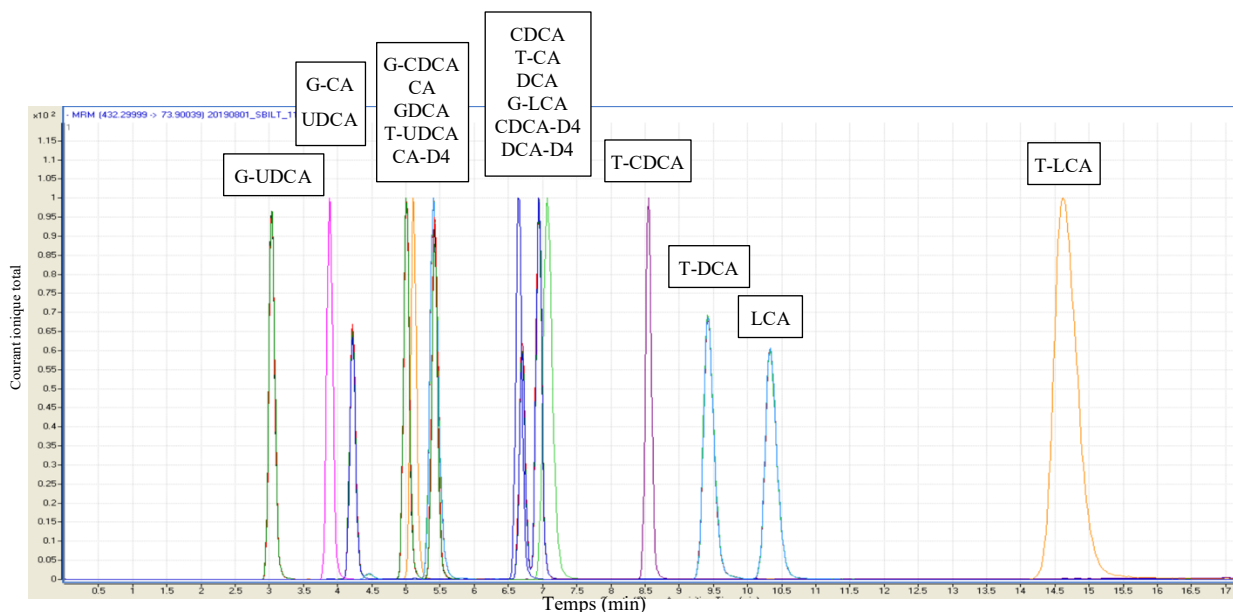


Figure 20. Chromatogramme obtenu lors de l'injection de la solution standard contenant les 15 acides biliaries et les 3 standards internes en utilisant les paramètres de séparation optimisés

La colonne utilisée est la Kinetex XB-C₁₈ (4,6x100 mm; 2,6 μ). La colonne est maintenue à une température de 40°C, la chromatographie est opérée en mode gradient avec une phase A aqueuse composée Acide formique 0,1% et une phase B organique composée de méthanol 100%. Un mode gradient est utilisé. Un gradient de 75% à 100% de phase B est appliqué entre 0 et 12,2 minutes. Un plateau de 100% de phase B est maintenu jusqu'à 15 minutes, suivi d'un retour à 75% de phase B. Finalement, la phase est maintenue à 75% B pour un lavage de 2 minutes. Les résultats sont présentés sous forme d'abondance relative. Les pics correspondent chacun à un acide biliaire et les temps de rétention de ceux-ci sont présentés au tableau III.

Tableau III.

Temps de rétention des acides biliaires lors de la séparation sur colonne Kinetex XB-C₁₈ (4,6x100 mm; 2,6 μ), avec les paramètres optimisés

Acide biliaire	Temps de rétention (minutes)
CDCA	7,31
G-CDCA	5,49
T-CDCA	8,58
CA	5,44
G-CA	4,17
T-CA	6,86
DCA	7,57
G-DCA	5,95
T-DCA	9,11
LCA	10,20
G-LCA	6,30
T-LCA	14,58
UDCA	4,51
G-UDCA	3,12
T-UDCA	5,38
CA-D ₄	5,55
CDCA-D ₄	6,29
DCA-D ₄	6,55

3.3 Rendement d'extraction

Le rendement d'extraction des acides biliaires dans le sérum est calculé en analysant des solutions en concentration connue de chacun des acides biliaires dans du sérum et en comparant les résultats obtenus par rapport à un échantillon fortifié à la suite de l'extraction d'un échantillon blanc. 3 protocoles d'extraction sont comparés. Le tableau IV montre un bon rendement pour chacun des 15 acides biliaires alors que celui se trouve en moyenne à 88,7% pour l'extraction avec 200 μ L de méthanol. On y voit que le rendement d'extraction est beaucoup plus constant et élevé lors de l'utilisation de 200 μ L de méthanol. En comparaison, l'utilisation de 400 μ L de méthanol donne un rendement d'extraction moyen de 75% et l'utilisation de 200 μ L d'acétonitrile donne un rendement d'extraction moyen de 71%.

Tableau IV. Rendement d'extraction de chacun des acides biliaires

10 quantifications à 2 niveaux de concentration (5 µg/mL et le second à 0,8 µg/mL) dans le sérum sont effectuées et comparées à la réponse instrumentale de 10 mesures de l'analyte dans une matrice aqueuse (100% H₂O) à une concentration équivalente suite à l'extraction. 100 µL de sérum sont mélangés avec 200 µL de méthanol, 200 µL d'acétonitrile ou encore 400 µL de méthanol, ainsi que 10 µL du mélange de standards internes (CDCA-d₄, CA-d₄ ainsi que DCA-d₄). Suite à un vortex, les échantillons sont mélangés mécaniquement pendant 10 min puis centrifugés 5 min à 16 200 g. Le surnageant est récupéré puis 10 µL sont injectés dans le LC-MS/MS. Les écarts-types sont mentionnés.

	MeOH 200 µL	MeOH 400 µL	ACN 400 µL
Acide biliaire	%	%	%
CDCA	82,9	53,5	85,2
G-CDCA	80,2	82,1	56,7
T-CDCA	88,0	69,1	40,5
CA	100,2	99,4	100,6
G-CA	93,6	73,4	75,4
T-CA	97,3	94,0	96,5
DCA	86,0	47,8	52,4
G-DCA	91,6	47,8	52,4
T-DCA	76,6	79,0	40,8
LCA	86,5	84,8	76,2
G-LCA	87,9	69,3	76,4
T-LCA	88,3	90,5	79,8
UDCA	85,2	65,7	68,0
G-UDCA	92,6	75,0	71,7
T-UDCA	93,4	98,6	94,6
Moyenne	88,7 ± 6,3	75,3 ± 16,9	71,1 ± 19,2

3.4 Limite de détection (LOD)

Les LOD des 15 acides biliaires sont déterminés en faisant une régression linéaire avec des niveaux de calibration faiblement concentrés équidistants. Cela permet de déterminer la concentration minimale sérique pouvant être détectée qui, lorsque traitée à toutes les étapes de la méthode complète (extraction organique, séparation par chromatographie sur LC et quantification par MS/MS) produit un signal détectable fiable et différent de celui émis par le blanc, pouvant être quantifié. Les résultats sont consolidés dans le tableau V. Les limites s'étalent entre 0,004 et 0,071 $\mu\text{mol/L}$.

Tableau V. Limites de détection des acides biliaires

Les échantillons sont préparés par dilution en série à partir d'une solution de 5 µg/mL jusqu'à une concentration de 0,0005 µg/mL. Les concentrations sont ensuite converties par en µmol/mL.

Acide biliaire	LOD (µmol/L)
CDCA	0,068
G-CDCA	0,057
T-CDCA	0,013
CA	0,016
G-CA	0,014
T-CA	0,050
DCA	0,017
G-DCA	0,015
T-DCA	0,013
LCA	0,071
G-LCA	0,004
T-LCA	0,013
UDCA	0,017
G-UDCA	0,015
T-UDCA	0,013

3.5 Imprécisions intra et inter essais

L'imprécision analytique intra essai (%CV) de la méthode de quantification est déterminée en effectuant des lectures répétées des 2 niveaux de contrôles de qualité la même journée. L'imprécision analytique inter-essai (%CV) de la méthode de quantification est déterminée en effectuant une lecture de chaque niveau de de contrôle de qualité sur 15 différents jours. L'imprécision intra-analyse obtenue et l'imprécision inter-analyse pour chacun des acides biliaries sont conciliés dans le tableau VI. On obtient un CV intra essai variant entre 2,0% à 3,2% selon les espèces d'acides biliaries, pour une moyenne de 2,8%, ce qui est très faible et donc très fiable. Pour ce qui est du CV inter-essai, on se situe entre 4,3% à 13,5%, pour une moyenne de 8,1%.

Tableau VI. Imprécision intra et inter essais

9 lectures répétées sont faites en duplicata pour les 2 niveaux de contrôle de qualités ($5 \mu\text{g/mL}$ et le second à $0,8 \mu\text{g/mL}$) pour le CV intra-essai. 15 lectures sont faites en duplicata sur 15 différents jours pour les 2 niveaux de contrôle de qualités ($5 \mu\text{g/mL}$ et le second à $0,8 \mu\text{g/mL}$) pour le CV inter-essai.

Acide biliaire	CV intra %	CV inter %
CDCA	3,2	13,5
G-CDCA	3,1	12,5
T-CDCA	3,2	12,5
CA	2,9	4,3
G-CA	3,2	9,1
T-CA	3,1	4,4
DCA	2,0	4,8
G-DCA	2,5	6,9
T-DCA	2,6	4,9
LCA	2,5	10,1
G-LCA	3,2	9,9
T-LCA	2,5	4,5
UDCA	2,5	9,0
G-UDCA	2,6	6,1
T-UDCA	2,2	8,4
Moyenne	2,8	8,1

3.6 Suppression d'ions

L'évaluation de la suppression d'ions sur la réponse du détecteur MS/MS a été effectuée en ajoutant une concentration connue de acides biliaires dans un pool de sérum négatif, dans de l'eau ainsi que dans le méthanol. La surface du pic correspondant à chacun des acides biliaires dans le sérum a été comparée à celle des acides biliaires dans l'eau et dans le méthanol. Le tableau VII présentent les résultats obtenus. On note une suppression d'ions variant entre 1,9% et 13,6%. 10 espèces ont démontré une suppression d'ion supérieure à 10%.

Tableau VII.

Suppression d'ions de chacun des acides biliaires

10 échantillons de sérum négatif subissent l'extraction en remplaçant le standard interne par une solution de composition identique : MeOH 50%. 5 échantillons d'eau qui servent de comparateurs subissent également l'extraction. Par la suite, les analytes et les standards internes sont ajoutés afin de fortifier ces échantillons de sérum et d'eau. Les ajouts dosés sont effectués à des concentrations représentatives des analytes et standards internes à 2 niveaux de contrôle de qualité ($5 \mu\text{g/mL}$ et le second à $0,8 \mu\text{g/mL}$). Le dosage par LC-MS/MS sont effectués en duplicata.

Acide biliaire	(%)
CDCA	8,7
G-CDCA	12,9
T-CDCA	10,9
CA	8,0
G-CA	12,4
T-CA	11,6
DCA	1,9
G-DCA	4,9
T-DCA	5,3
LCA	7,6
G-LCA	13,6
T-LCA	12,5
UDCA	2,7
G-UDCA	10,1
T-UDCA	4,6
Moyenne	8,4

3.7 Linéarité

La linéarité est déterminée en faisant la quantification d'une régression linéaire faite par dilution en série avec des niveaux très concentrés répartis adéquatement dans l'intervalle de mesure (entre 0,2 et 200 $\mu\text{mol/L}$ environ), dans une matrice identique aux échantillons patients (sérum). Les coefficients de corrélation sont obtenus en traçant la courbe de corrélation sur Excel et sont présentés à la figure 21. Les coefficients de corrélation R^2 sont tous supérieurs à 0,993.

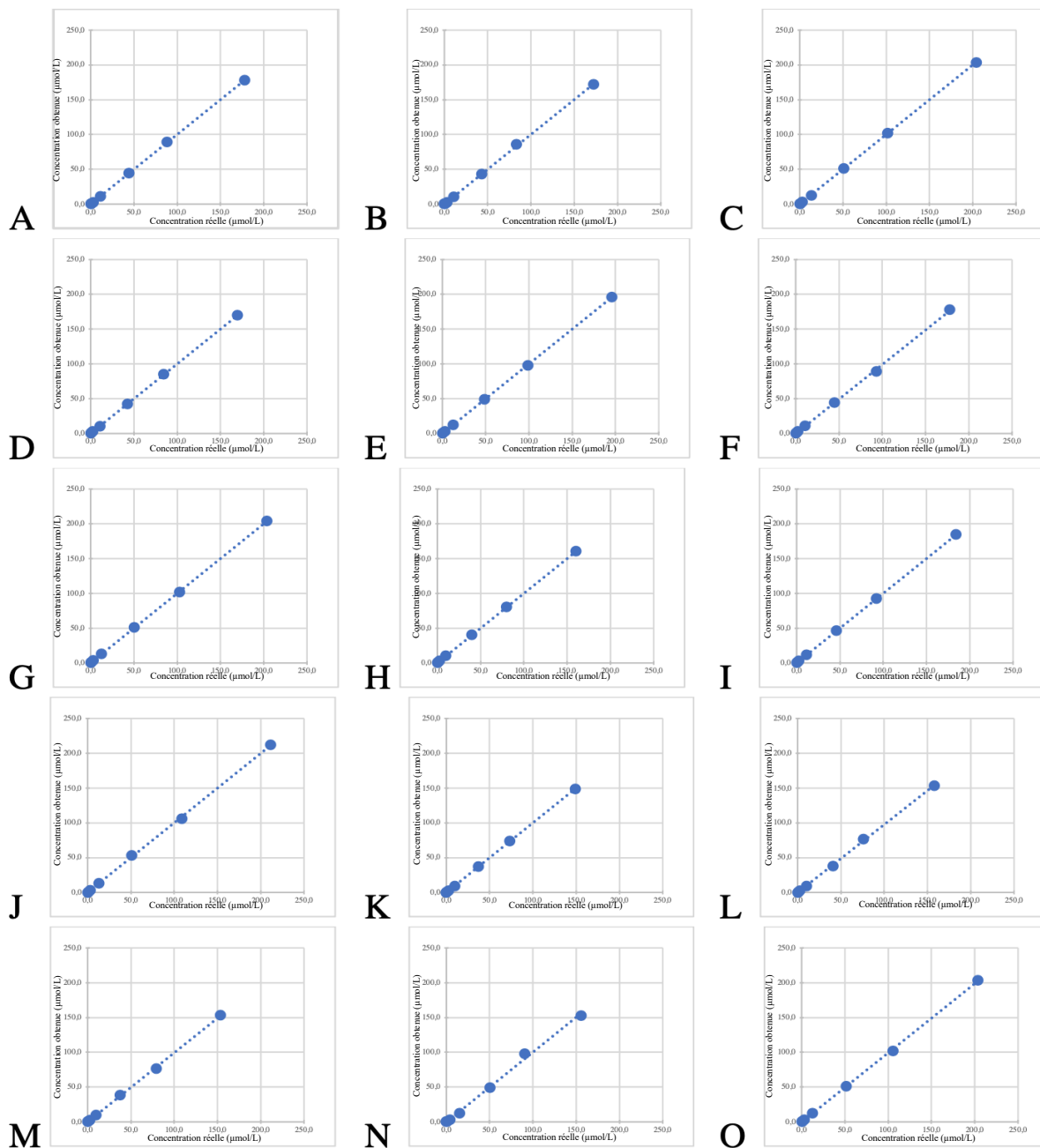


Figure 21. Linéarité de la concentration calculée en fonction de la concentration réelle ($\mu\text{mol/L}$) pour chacune des espèces d'acides biliaires pour des concentrations s'étendant entre 0,2 et 200 $\mu\text{mol/L}$ environ

A: G-UDCA ($R^2=1$); B: G-CA ($R^2=0,9996$); C: UDCA ($R^2=1$); D: G-CDCA ($R^2=1$)

E: CA ($R^2=1$); F: G-DCA ($R^2=0,9995$); G: CDCA ($R^2=1$); H: T-UDCA ($R^2=1$)

I: G-LCA ($R^2=1$); J: LCA ($R^2=0,9996$); K: T-CA ($R^2=0,9999$); L: T-CDCA ($R^2=0,9995$)

M: T-DCA ($R^2=0,9997$); N: T-LCA ($R^2=,993$); O: DCA ($R^2=0,9997$)

3.8 Stabilité des analytes

La stabilité est déterminée pour chacune des espèces d'acide biliaire. Pour ce faire, des échantillons de CQH et CQB sont conservés sous différentes conditions et sont dosés après certaines périodes de temps. La figure 22 montre les résultats des tests de stabilité des 15 acides biliaires lorsque dosés après 3 cycles de gel et de dégel. On voit que les analytes sont stables après 3 cycles de gel/dégel à l'exception de DCA, G-DCA et T-DCA, pour lesquels le signal diminue d'environ 22 à 30%. Pour les autres acides biliaires, la variation du signal est inférieure au coefficient de variation de la méthode. Les figures 23 à 25 montrent les résultats des tests de stabilité des 15 acides biliaires lorsque conservés à température pièce, à 4°C et à -28°C pendant 24 heures et 5 jours. Pour la stabilité à température pièce, on voit que dans le cas des hauts contrôles de qualité, le signal est assez stable, alors que le changement de signal n'est supérieur au coefficient de variation inter-essai dans aucun cas. Pour la stabilité à 4°, on voit que pour les contrôles de qualité élevés ainsi que bas, le signal reste stable après 24h comparativement aux échantillons fraîchement préparés. Cependant, après 5 jours, on note une altération du signal, encore une fois chez les espèces DCA, G-DCA ainsi que T-DCA, tant en concentration élevée que faible, comparativement aux résultats obtenus pour la conservation à température pièce. À -28°C, Au même titre que lors du gel et dégel, les seules espèces pour lesquelles le signal diminue considérablement sont le DCA, G-DCA ainsi que T-DCA. Cependant, on note cette diminution tant à faible qu'à plus grande concentration.

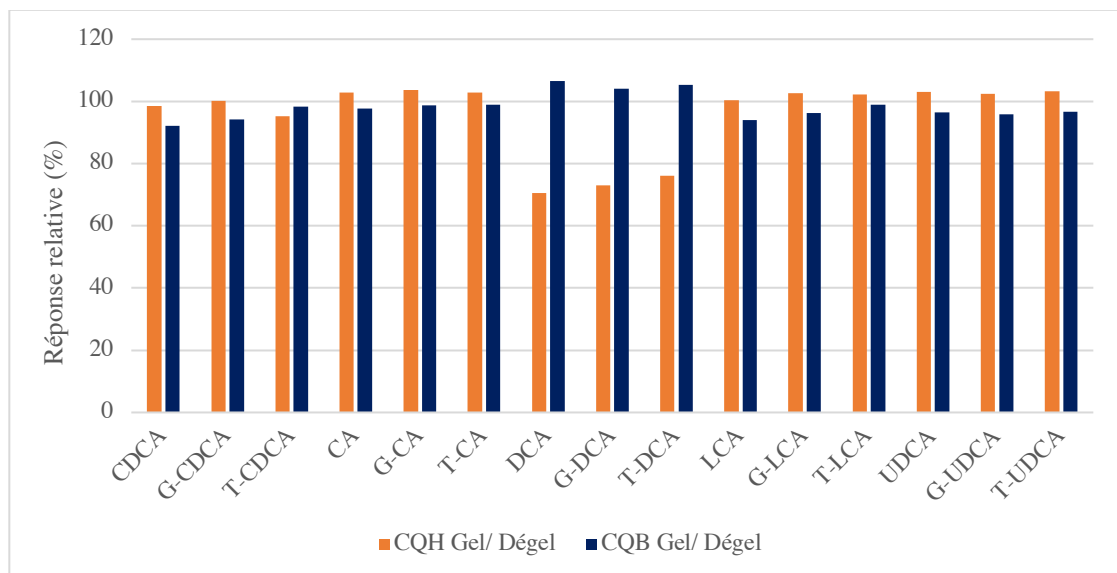


Figure 22. Stabilité des acides biliaires dans le sérum après 3 cycles de gel/ dégel

Des aliquots de 1,5 mL des 2 contrôles de qualité sont préparés dans des tubes eppendorf et subissent trois cycles de 5 min de gel sur glace sèche suivies de 12 min de dégel à température pièce. Suite au gel/dégel des aliquots, les échantillons subissent l'extraction organique et sont quantifiés en utilisant les paramètres de chromatographie et de MS préalablement établis (n=1). Des contrôles de qualités sont fraîchement préparés et quantifiés. Les résultats de quantification des contrôles de qualité frais sont normalisés à une exactitude de 100% et servent de comparatifs. La stabilité est exprimée en pourcentages, les résultats des contrôles de qualité hauts sont montrés en bleu et ceux des contrôles de qualité bas sont montrés en orange.

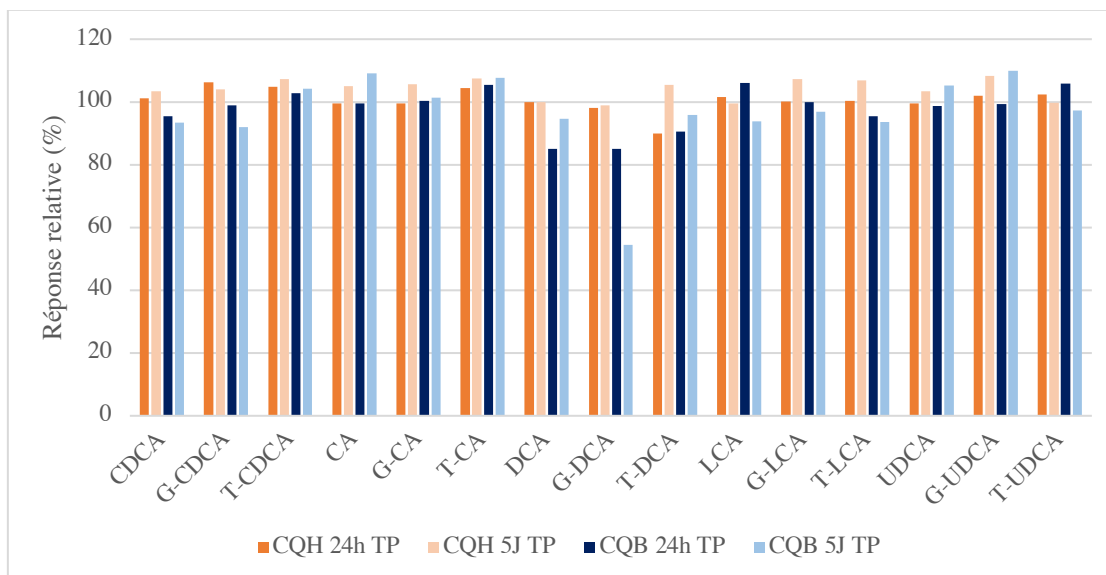


Figure 23. Stabilité des acides biliaires dans le sérum conservé à température pièce

Des aliquots de 1,5 mL des 2 contrôles de qualité sont préparés dans des tubes eppendorf et sont conservés à température pièce (TP) pendant 24h et 5 jours (5J). Ils subissent ensuite l'extraction organique et sont quantifiés en utilisant les paramètres de chromatographie et de MS préalablement établis (n=1). Des contrôles de qualités sont fraîchement préparés et quantifiés. Les résultats de quantification des contrôles de qualité frais sont normalisés à une exactitude de 100% et servent de comparatifs. La stabilité est exprimée en pourcentages, les résultats des contrôles de qualité hauts sont montrés orange (foncé : 24 h, pâle : 5 jours) et ceux des contrôles de qualité bas sont montrés en bleu (foncé : 24 h, pâle : 5 jours).

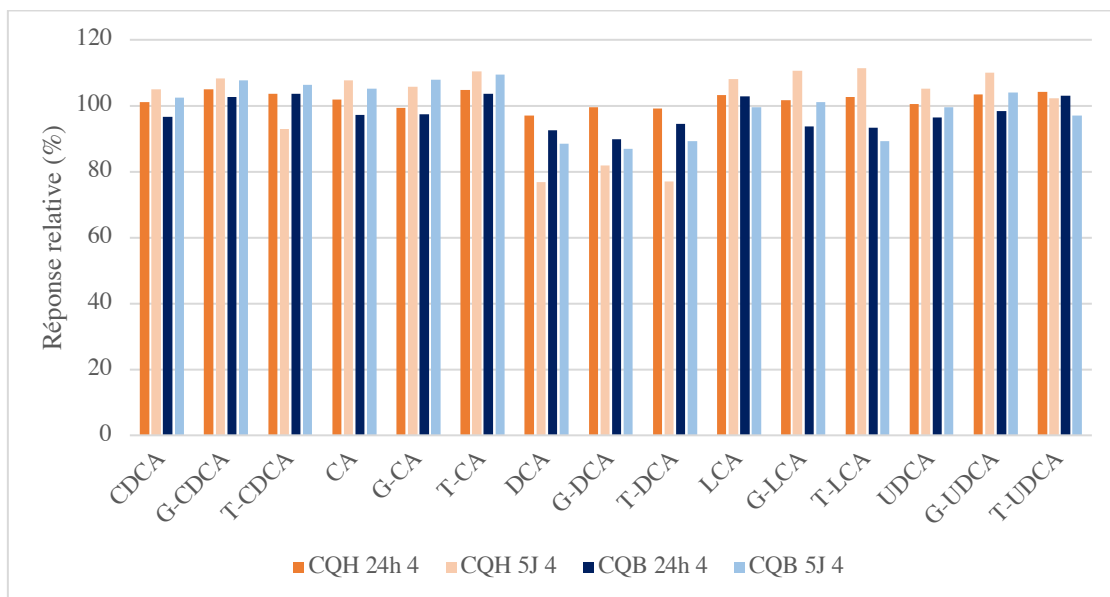


Figure 24. Stabilité des acides biliaries dans le sérum conservé à 4°C

Des aliquots de 1,5 mL des 2 contrôles de qualité sont préparés dans des tubes eppendorf et sont conservés à 4°C pendant 24h et 5 jours. Ils subissent ensuite l'extraction organique et sont quantifiés en utilisant les paramètres de chromatographie et de MS préalablement établis (n=1). Des contrôles de qualités sont fraîchement préparés et quantifiés. Les résultats de quantification des contrôles de qualité frais sont normalisés à une exactitude de 100% et servent de comparatifs. La stabilité est exprimée en pourcentages, les résultats des contrôles de qualité hauts sont montrés orange (foncé : 24 h, pâle : 5 jours) et ceux des contrôles de qualité bas sont montrés en bleu (foncé : 24 h, pâle : 5 jours).

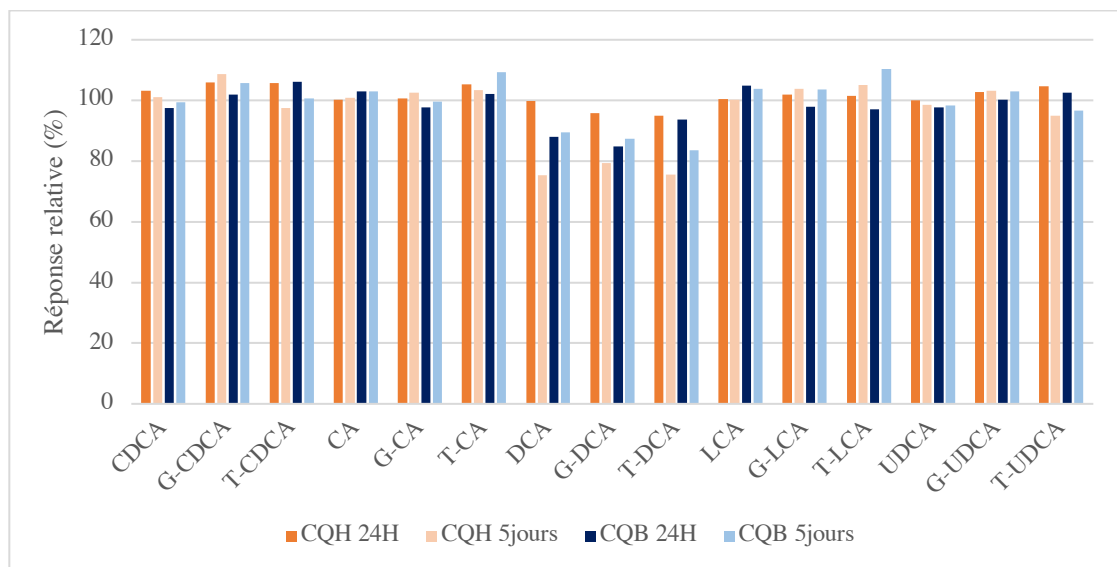


Figure 25. Stabilité des acides biliaires dans le sérum conservé à -28°C

Des aliquots de 1,5 mL des 2 contrôles de qualité sont préparés dans des tubes eppendorf et sont conservés à -28°C pendant 24h et 5 jours. Ils subissent ensuite l'extraction organique et sont quantifiés en utilisant les paramètres de chromatographie et de MS préalablement établis (n=1). Des contrôles de qualités sont fraîchement préparés et quantifiés. Les résultats de quantification des contrôles de qualité frais sont normalisés à une exactitude de 100% et servent de comparatifs. La stabilité est exprimée en pourcentages, les résultats des contrôles de qualité hauts sont montrés orange (foncé : 24 h, pâle : 5 jours) et ceux des contrôles de qualité bas sont montrés en bleu (foncé : 24 h, pâle : 5 jours).

3.9 Corrélation avec le kit colorimétrique de dosage des acides biliaires totaux par GenWay

La méthode LC-MS/MS développée a été comparée avec la méthode enzymatique en effectuant le dosage de 232 échantillons, dans un intervalle de 1 à 360 $\mu\text{mol/L}$, en duplicata. La figure 26 montre la corrélation obtenue entre les 2 méthodes. Lorsqu'on regarde cette figure, on remarque une bonne corrélation entre les 2 méthodes. Les figures 27 et 28 montrent également la corrélation entre les 2 méthodes mais pour les échantillons de concentration inférieure à 100 $\mu\text{mol/L}$ d'acides biliaires totaux (figure 27) ou uniquement pour les échantillons de concentration supérieure à 100 $\mu\text{mol/L}$ d'acides biliaires totaux (figure 28). On remarque que le coefficient de corrélation dans le cas des échantillons entre 1 et 100 $\mu\text{mol/L}$ est de 0,910, alors que le coefficient de corrélation pour les échantillons de concentration supérieure à 100 $\mu\text{mol/L}$ est de 0,836. La corrélation pour des échantillons de plus faible concentration est donc meilleure que pour les échantillons fortement concentrés.

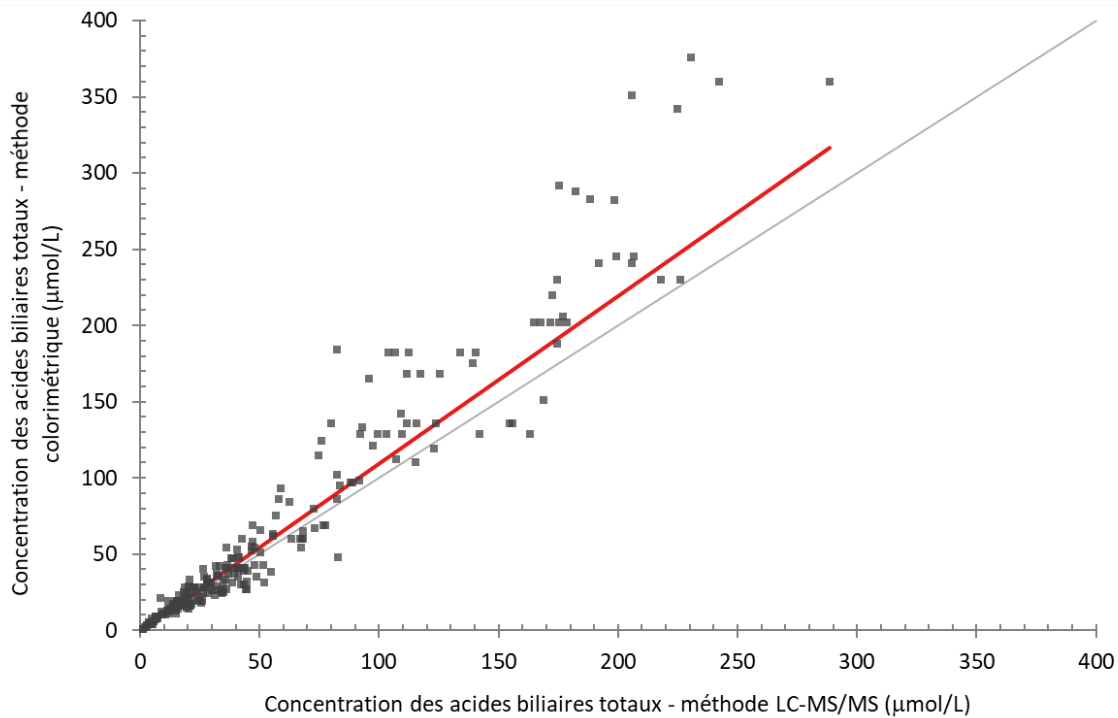


Figure 26. Corrélation entre la méthode LC-MS/MS développée et le kit colorimétrique des acides biliaires totaux par GenWay

232 spécimens dénominalisés de patientes suivant une grossesse normale ou atteintes de cholestase intra-hépatique de grossesse représentant la plage analytique du test (1 à 360 µmol/L), dont 25 sous le seuil normal de concentration en acides biliaires totaux sériques (<10 µmol/L) conservés selon des conditions assurant la stabilité des analytes dans le sérum sont dosés en duplicata. Une dilution est effectuée pour les échantillons de concentration en acides biliaires totaux dépassant l'intervalle de linéarité de chacun des tests (LC-MS/MS : 200 µmol/L, kit de dosage colorimétrique des acides biliaires totaux par GenWay : 100µmol/L). L'équation de la courbe de tendance est : $y = 1,098x - 0,3087$ avec un coefficient de corrélation de 0,964.

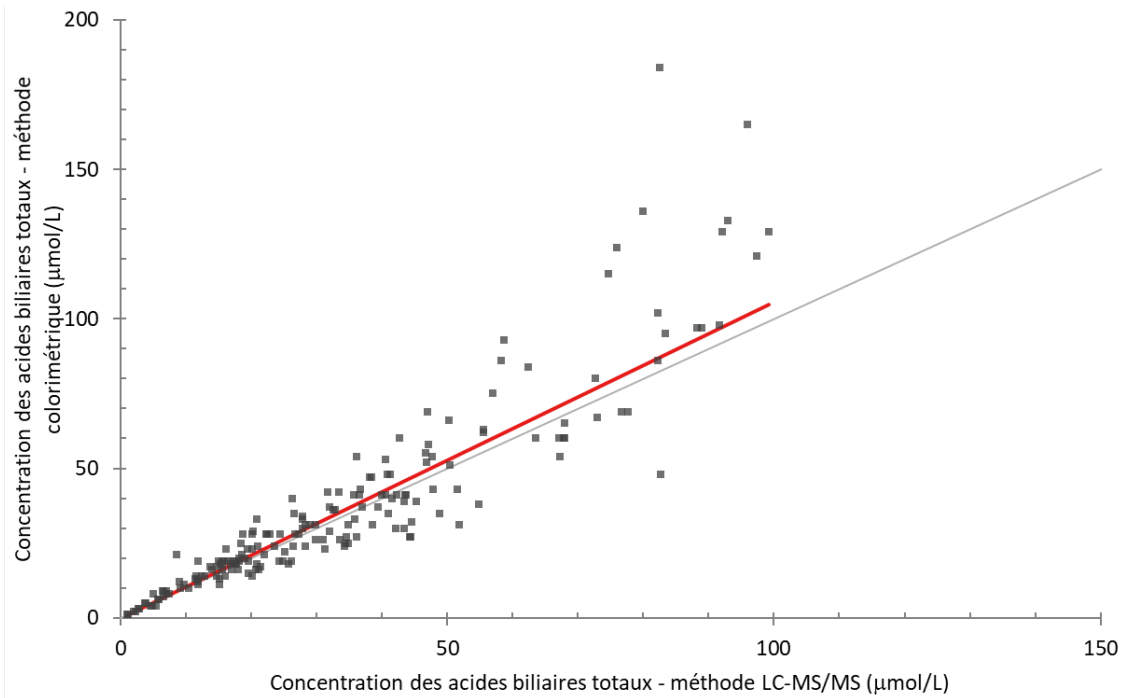


Figure 27. Corrélation entre la méthode LC-MS/MS développée et le kit colorimétrique des acides biliaries totaux par GenWay pour des échantillons de concentrations d'acides biliaries totaux inférieure à 100 $\mu\text{mol/L}$

185 spécimens dénominalisés de patientes suivant une grossesse normale ou atteintes de cholestase intrahépatique de grossesse représentant toute la plage analytique de 1 à 100 $\mu\text{mol/L}$, conservés selon des conditions assurant la stabilité des analytes dans le sérum, sont dosés en duplicata. L'équation de la courbe de tendance est $y = 1,057x - 0,162$ avec un coefficient de corrélation de 0,910.

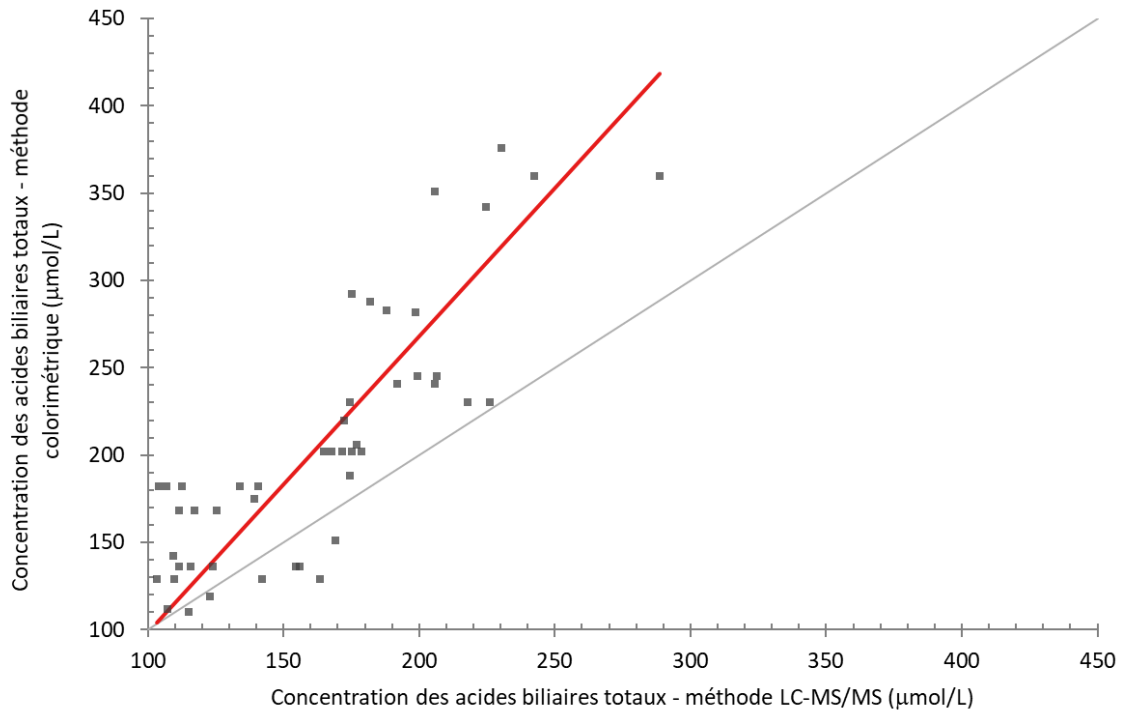


Figure 28. Corrélation entre la méthode la méthode LC-MS/MS développée et le kit colorimétrique des acides biliaires totaux par GenWay pour des échantillons de concentrations d'acides biliaires totaux supérieure à 100 µmol/L

47 spécimens dénominalisés de patientes suivant une grossesse normale ou atteintes de cholestase intrahépatique de grossesse représentant la plage analytique de 100 à 360 µmol/L, conservés selon des conditions assurant la stabilité des analytes dans le sérum, sont dosés en duplicata. L'équation de la courbe de tendance est $y = 1,695x - 70,58$ avec un coefficient de corrélation de 0,836.

3.10 Profilage des acides biliaries sériques

L'étape suivant du projet est de comparer les profilages des acides biliaries des 232 échantillons analysés en fonction de la concentration des acides biliaries totaux. Pour ce faire, le profilage est tracé pour les échantillons de concentration en acides biliaries totaux inférieure à 10 $\mu\text{mol/L}$ et celui-ci est comparé avec le profilage pour les échantillons de concentration en acides biliaries totaux supérieure à 10 $\mu\text{mol/L}$. La figure 29 permet de noter que les profilages sont différents en fonction de la concentration en acides biliaries totaux.

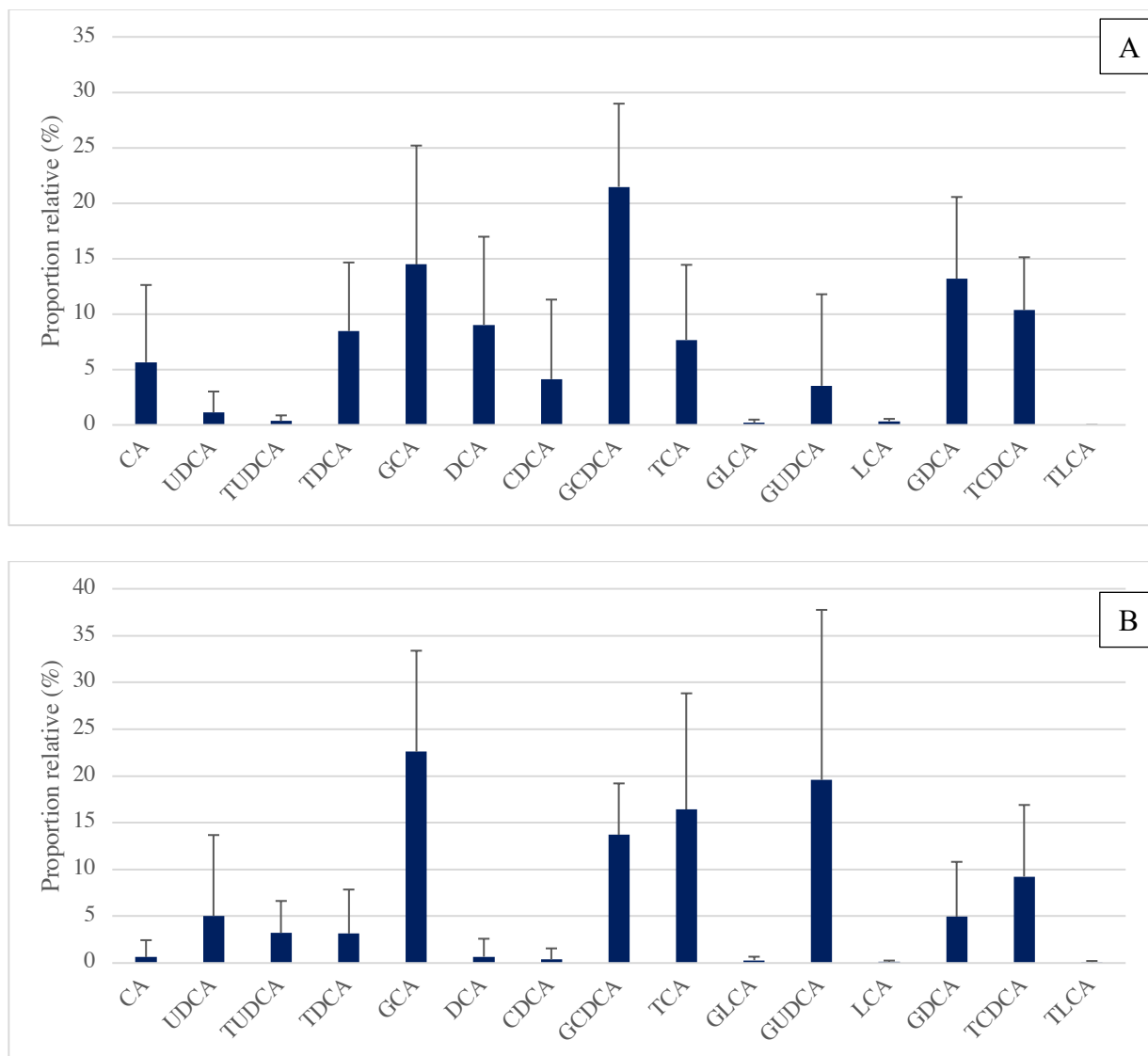


Figure 29. Profilage des acides biliaries en fonction de la concentration en acides biliaries totaux

232 spécimens dénominalisés de patientes suivant une grossesse normale ou atteintes de cholestase intrahépatique de grossesse représentant la plage analytique du test (1 à 360 µmol/L), conservés selon des conditions assurant la stabilité des analytes dans le sérum sont dosés en duplicata. Le profilage des concentrations relatives en acides biliaries sont tracés et la moyenne de chacun est calculée pour les 2 sous-groupe créés : A : concentration Acides biliaries totaux < 10 µmol/L; B : Concentration acides biliaries totaux > 10 µmol/L. Les barres d'erreurs correspondent à l'écart type standard observé.

3.11 Sensibilité à chaque acide biliaire individuel

Afin de comparer la capacité de chacun des tests à détecter une variation de concentration d'un acide biliaire précis, du sérum négatif est fortifié à des concentrations de 4 et 2 mg/mL pour chaque espèce d'acide biliaire individuel. L'exactitude est ensuite comparée en comparant la concentration mesurée en fonction de la concentration réelle en acides biliaires. Le tableau VIII présente les résultats obtenus pour chacune des 2 méthodes étudiées.

Tableau VIII.

Sensibilité à chaque acide biliaire individuel fortifié à des concentrations de 4 et 2 $\mu\text{g/mL}$ pour la méthode la méthode LC-MS/MS développée et le kit colorimétrique des acides biliaires totaux par GenWay

Acide biliaire	Fortification de 4 $\mu\text{g/mL}$		Fortification de 2 $\mu\text{g/mL}$	
	Exactitude méthode enzymatique (%)	Exactitude méthode LC-MS/MS (%)	Exactitude méthode enzymatique (%)	Exactitude méthode LC-MS/MS (%)
CDCA	58,9	131,2	58,9	130,0
G-CDCA	82,5	106,1	70,7	122,5
T-CDCA	78,3	118,3	78,3	122,8
CA	91,9	113,0	81,7	119,3
G-CA	93,1	105,7	93,1	114,9
T-CA	94,1	122,5	107,5	131,0
DCA	127,6	124,4	137,4	139,3
G-DCA	157,4	122,5	157,4	131,7
T-DCA	117,4	110,6	104,3	120,9
LCA	37,7	109,7	37,7	118,8
G-LCA	43,4	122,6	43,4	145,6
T-LCA	37,5	127,8	50,0	159,1
UDCA	49,1	105,1	39,3	110,4
G-UDCA	45,0	109,9	45,0	119,9
T-UDCA	50,0	129,9	50,0	145,3
Moyenne	77,6	117,3	77,0	128,8

Afin de comparer la capacité de chacun des tests à détecter une variation de concentration d'un acide biliaire précis présent en concentration plus grande, du sérum négatif est fortifié à des concentrations de 50 et 25 $\mu\text{g/mL}$ pour chaque espèce d'acide biliaire individuel. L'exactitude est ensuite comparée en comparant la concentration mesurée en fonction de la concentration réelle en acides biliaires. Le tableau IX présente les résultats obtenus pour chacune des 2 méthodes étudiées.

Tableau IX.

Sensibilité à chaque acide biliaire individuel fortifié à des concentrations de 50 et 25 $\mu\text{g/mL}$ pour la méthode la méthode LC-MS/MS développée et le kit colorimétrique des acides biliaires totaux par GenWay

Acide biliaire	Fortification de 50 $\mu\text{g/mL}$		Fortification de 25 $\mu\text{g/mL}$	
	Exactitude	Exactitude	Exactitude	Exactitude
	méthode	méthode	méthode	méthode
	enzymatique	LC-MS/MS	enzymatique	LC-MS/MS
	(%)	(%)	(%)	(%)
CDCA	58,1	83,2	58,1	84,8
G-CDCA	80,2	53,9	84,9	68,6
T-CDCA	80,3	60,7	83,5	74,2
CA	84,2	65,9	93,2	79,6
G-CA	88,5	40,1	96,8	54,8
T-CA	91,4	48,9	94,6	61,5
DCA	102,9	71,0	109,9	63,5
G-DCA	129,5	57,2	147,5	72,8
T-DCA	113,7	61,7	123,1	76,4
LCA	43,7	34,2	43,7	47,8
G-LCA	44,2	44,3	45,1	61,5
T-LCA	44,5	40,7	44,5	55,2
UDCA	51,0	30,9	51,8	45,2
G-UDCA	54,9	41,9	57,6	57,2
T-UDCA	56,0	45,1	56,0	58,6
Moyenne	74,9	52,0	79,4	64,2

Afin de comparer la capacité de chacun des tests à détecter une variation de concentration d'un acide biliaire précis présent en concentration plus grande lorsque fortifié à un échantillon de sérum de concentration en acides biliaires totaux connue, des échantillons de concentration totale en acides biliaires sont fortifié avec chacun des acides biliaires de façon individuelle. L'exactitude est ensuite comparée en comparant la concentration mesurée en fonction de la concentration réelle en acides biliaires. Le tableau X présente les résultats obtenus pour chacune des 2 méthodes étudiées.

Tableau X. Sensibilité à chaque acide biliaire individuel pour la méthode la méthode LC-MS/MS développée et le kit colorimétrique des acides biliaires totaux par GenWay lors de l'ajout de ceux-ci à des échantillons de sérums de concentration en acides biliaires totaux connue

Acide biliaire	Exactitude méthode	Exactitude méthode
	enzymatique (%)	LC-MS/MS (%)
CDCA	83,6	90,7
G-CDCA	101,3	90,4
T-CDCA	95,3	44,7
CA	104,4	121,1
G-CA	106,0	131,3
T-CA	113,2	73,5
DCA	106,6	100,3
G-DCA	122,8	168,9
T-DCA	110,6	76,5
LCA	71,0	85,9
G-LCA	71,1	104,8
T-LCA	75,7	49,9
UDCA	71,7	78,8
G-UDCA	71,5	116,2
T-UDCA	75,3	60,4
Moyenne	92,0	92,9

4 Discussion

Le but général du projet était de développer et de valider une méthode de séparation et quantification des 15 espèces d'acides biliaires principaux par LC-MS/MS afin de pouvoir faire un profilage de ceux-ci. De plus, le but était de comparer la méthode développée avec la méthode de quantification des acides biliaires totaux par colorimétrie, ainsi que de comparer les profilages d'acides biliaires pour 2 groupes d'échantillons, soient des échantillons de 10 $\mu\text{mol/L}$ et moins et des échantillons de plus de 10 $\mu\text{mol/L}$. Ce seuil est choisi car, comme mentionné dans l'introduction, il s'agit de la valeur de référence normale.

Un système de chromatographie liquide (LC) Agilent 1200 series couplé à un détecteur de type quadripôle MS/MS Agilent 6410 est utilisé pour la quantification. Le LC-MS/MS est une technique d'analyse qui combine la séparation physique par chromatographie liquide, ainsi que l'analyse des masses par le spectromètre de masse. Ce système est privilégié car les appareils sont utilisés pour d'autres tests cliniques au CHUM, et l'instrumentation et la méthodologie de ces appareils sont donc déjà connus par les professionnels sur place. De plus, c'est idéal pour la séparation des composés d'intérêt puisqu'il permet d'exploiter la caractéristique hydrophobe des chaînes carbonées présentes sur les acides biliaires, en utilisant une colonne de chromatographie à interaction hydrophobes. Le détecteur MS est très sensible et spécifique. L'ionisation est faite par électro nébulisation et le détecteur est utilisé en mode négatif.

4.1 Optimisation des paramètres de détection

À la suite de diverses injections de la solution de référence de chacun des acides biliaires individuels sur le MS sans l'utilisation d'une colonne, les paramètres de fragmentation et de détection sont optimisés. Les paramètres optimaux sont ceux permettant d'obtenir la meilleure résolution et intensité de pic caractéristique des acides biliaires d'intérêt. Le mode *product ion scan* est utilisé afin de choisir le fragment spécifique occasionné par le

passage dans la cellule de collision. En effet, ce fragment de masse connue est occasionné à partir d'une masse précurseur et est propre à chaque composé, correspondant généralement à la masse moléculaire du composé soustrait d'un, car il y a eu retrait d'un proton lors de l'ionisation. Les figures 13 à 16 démontrent les résultats obtenus lors de cette phase. Les paramètres permettant l'obtention du pic le plus distinct et haut sont retenus pour l'énergie de collision et le fragmenteur. Le tableau II démontre les résultats obtenus pour cette étape de la recherche. Nos résultats sont cohérents et comparables avec ceux trouvés dans la littérature (101). Puisque les fragments occasionnés sont propres à chaque composé, obtenir des résultats différents de ceux démontrés dans la littérature aurait été impossible, sauf dans le cas où l'appareillage utilisé est mal calibré. Certains composés étant des isomères, il arrive que les caractéristiques optimisées obtenues soient similaires. Ce faisant, il est difficile de distinguer ceux-ci, comme c'est le cas des isomères : CDCA, UDCA et DCA; G-CDCA, G-UDCA et G-DCA; ainsi que T-CDCA, T-UDCA et T-DCA, qui sont des molécules isobariques occasionnant des fragments de masse identique. Cependant, les isomères ayant des polarités différentes, il sera possible de les différencier par la prochaine étape du projet, la séparation des acides biliaires. En effet, des composés ayant des polarités différentes seront distinguables par le temps de rétention lors du passage sur la colonne.

4.2 Optimisation des paramètres de séparation par chromatographie liquide

Ensuite, les paramètres de séparation de la chromatographie liquide sont optimisés, en visant une séparation des composants d'un mélange, en particulier les molécules isobariques qui ne seraient pas différenciables uniquement par le détecteur MS. Cette étape a pour but de séparer les acides biliaires avant leur entrée sur la colonne, permettant de simplifier la détection et assurer des mesures plus précises. En effet, il serait plus difficile pour le détecteur de quantifier les 15 espèces en même temps, surtout pour les isomères ayant des paramètres de détection semblables. En les séparant, on décomplexifie le mélange lors de son entrée dans le détecteur. Les paramètres sont testés avec la solution de travail composée des 15 acides biliaires. Le principe général de la chromatographie liquide est que la solution contenant les

molécules d'intérêt est injectée et va traverser une colonne. Les analytes seront entraînés par une phase mobile liquide qui va traverser la colonne. La colonne, quant à elle, comporte une phase stationnaire solide. Les acides biliaires étant amphipatiques, tant une colonne à phase stationnaire polaire ou apolaire peut être utilisées (102-104). Par contre, par leur structure différente, il est préférable d'exploiter les propriétés hydrophobes car celles-ci diffèrent plus d'espèce en espèces, ce qui facilite la séparation. Les différentes espèces d'acides biliaires auront donc une affinité plus ou moins prononcée avec la colonne, ce qui va ralentir leur progression sur la colonne. Plusieurs colonnes, de différentes longueurs et comportant différentes phases stationnaires de polarités différentes ont été testées. On vise l'obtention d'un spectre démontrant une bonne séparation des 15 espèces d'acides biliaires, ainsi qu'un temps d'analyse raisonnable et des pics assez bien répartis sur l'intervalle de temps d'analyse.

À la figure 17, on compare différentes colonnes tout en gardant les phases mobiles ainsi que les gradients constants afin de voir laquelle permet d'obtenir une meilleure séparation. Les colonnes Kinetex C₁₈ (4,6x50 mm; 2,6 μ), Synergi Hydro-RP (4,6x150 mm; 4 μ) et Kinetex XB-C₁₈ (4,6x100 mm; 2,6 μ) sont utilisées avec des phases mobiles d'acide formique 2% et méthanol 100%. La composition de phase mobile augmente de façon constante entre 60% et 100% de méthanol sur une période de 16 min pour être certain que toutes les espèces sont éluées. En A (Kinetex C₁₈ (4,6x50 mm; 2,6 μ)), on voit que certaines espèces ne sont pas bien séparées. C'est notamment le cas pour le dernier pic (9 min) qui regroupe 3 espèces. On voit également que 2 espèces au temps 7 min ne sont pas tout à fait séparées. On distingue 9 signaux sur le spectre, regroupant uniquement 17 espèces d'acides biliaires. En effet, lors d'une analyse approfondie des résultats, on note l'absence totale d'une espèce (LCA). Cela signifie que celle-ci a trop d'affinité pour la colonne et la phase mobile ne permet pas son élution. En B (Synergi Hydro-RP (4,6x150 mm; 4 μ)), on voit 11 signaux, ce qui témoigne déjà d'une meilleure séparation. On voit que les 2 espèces n'ayant pas été tout à fait séparées en A au temps 7 min sont maintenant plus distinctes. On voit également à 12 min l'apparition du pic LCA, qui était manquant en A. Suite à ces observations, on conclut que la 2^e colonne testée permet une meilleure séparation. Le chromatogramme obtenu en C (Kinetex XB-C₁₈ (4,6x100 mm; 2,6 μ)) démontre également 11 signaux et est semblable avec

le chromatogramme B. Cependant, on voit un décalage vers la droite de tous les pics, ce qui signifie une meilleure interaction entre les analytes et la colonne. Cela signifie qu'en modifiant les phases mobiles et les gradients, une séparation mieux contrôlée pourra être effectuée. La colonne Kinetex XB-C₁₈ (4,6x100 mm; 2,6 μ) sera donc celle qui permettra la meilleure séparation et sera celle utilisée pour les étapes subséquentes d'optimisation de la méthode de séparation par chromatographie liquide.

À la figure 18, on compare l'efficacité de 2 différentes phases mobiles alors que la colonne et le gradient sont les mêmes. En A, les phases mobiles sont: Phase A: Acide formique 2%, Phase B: Acétonitrile 100%B et en B, les phases mobiles sont : Phase A: Acide formique 2%, Phase B: Méthanol 100%. La colonne Kinetex XB-C₁₈ (4,6x100 mm; 2,6 μ) est utilisée et encore une fois, la composition de phase mobile augmente de façon constante entre 60% et 100% de méthanol sur une période de 16 min pour être certain que toutes les espèces sont éluées. Bien que 11 signaux soient présents sur les 2 chromatogrammes, on voit que les pics sur chromatogramme A sont moins étalés que ceux sur le chromatogramme B. En effet, sur le chromatogramme A, ils sont compris dans entre 2 et 9,5 min environ, alors qu'ils sont compris entre 5 et 13,5 min en B. Cela permet donc une meilleure séparation en général. De plus, le premier pic élue après 5 min plutôt que 2 en B, ce qui signifie que les acides biliaires ont une plus grande affinité pour la colonne au début de l'élution mais, lorsque la proportion de méthanol augmente, ils sont élués. On en conclut que les acides biliaires ont une affinité supérieure à l'acétonitrile par rapport au méthanol. L'utilisation du méthanol 100% permet donc un contrôle supérieur pour la séparation. En modifiant le gradient, il sera possible de faire une séparation encore plus efficace.

À la figure 19, on compare différents gradients tout en conservant la colonne et les phases mobiles sélectionnées plus tôt. Les chromatogrammes A à E sont des exemples de spectres obtenus lors de l'essai de différents gradients, afin d'optimiser la séparation, le temps d'analyse et la dispersion des pics sur l'intervalle. Le temps d'analyse doit être suffisamment court afin de permettre une analyse rapide qui permet plusieurs analyses dans une journée sans

compromettre la disponibilité de l'appareil pour d'autres tests, mais suffisamment long afin d'assurer une bonne séparation des analytes. On voit tout de suite que les gradients D et E ne permettent pas une meilleure séparation alors que les pics ne sont pas plus étalés sur l'intervalle de temps. En B, on voit qu'on perd la bonne séparation des espèces au temps 6,5 min. Ce gradient n'est donc pas adéquat non plus. Parmi ces essais, il est évident que le chromatogramme A présente les meilleurs résultats de séparation alors que les pics s'étalent sur un intervalle beaucoup plus grand, soit entre 3,5 et 15 min environ. Ce gradient également bon car il permet une bonne séparation des molécules isobariques ne pouvant être distinguées par le détecteur MS.

La figure 20 démontre le chromatogramme obtenu suite à l'injection de la solution standard afin la colonne, les phases mobiles et les gradients ayant démontré les meilleurs résultats. On y voit que le temps d'analyse requis est de 17 min incluant le lavage, ce qui est très raisonnable compte tenu du fait que cette méthode n'est utilisée que pour les patientes enceintes présentant des symptômes de cholestases de grossesse. On attend donc un nombre d'analyse relativement peu élevé par jour. De plus, réduire le temps d'analyse ne permettait pas une bonne séparation des 15 espèces d'acides biliaires utilisés, c'était donc inévitable d'allonger le temps pour un total de 17 min incluant le lavage. On voit que les 15 espèces sont bien séparées et réparties sur l'intervalle d'analyse. On voit aux alentours de la min 6 et 7 que plusieurs acides biliaires éluent sensiblement en même temps et sont difficilement séparables. Ceci est dû à leur faible différence structurale, ce qui fait en sorte qu'ils ont des temps de rétention similaires puisqu'ils ont des polarités très similaires. Par contre, il est possible de les distinguer par leurs différentes masses. Le tableau III montre les temps de rétention pour les 15 acides biliaires étudiés ainsi que les 3 étalons internes.

Évidemment, cette méthode est beaucoup plus avantageuse que les méthodes enzymatiques et colorimétriques généralement utilisées actuellement. Bien que ces méthodes puissent être automatisées et que les lectures soient faites en moins d'une min (103, 105, 106),

elles ne permettent pas un profilage des acides biliaires libres et conjugués comme le permet la méthode LC-MS/MS.

Ces résultats sont similaires et comparables à ceux actuellement présents dans la littérature. En effet, la majorité des protocoles développés utilisent des colonnes C₁₈. Le temps d'analyse est légèrement supérieur en comparaison avec d'autres méthodes qui permettent l'identification de moins d'espèces d'acides biliaires. Cependant, pour des études étudiant environ les mêmes espèces, le temps est similaire ou inférieur (96, 104). Les phases mobiles et gradients utilisées dans ces articles sont en général plus complexes (utilisation de 4 phases mobiles au lieu de 2, par exemple). Finalement, le détecteur MS permet une identification beaucoup plus spécifique et sensible que d'autres détecteurs utilisés dans la littérature, un détecteur UV par exemple (75, 96, 101, 102).

4.3 Optimisation de la méthode d'extraction

Il fallait par la suite établir la méthode d'extraction des acides biliaires à partir de sérum. Il est difficile de séparer et quantifier les acides biliaires par LC-MS/MS directement à partir de l'échantillon de sérum car la composition de celui-ci est très complexe. Plusieurs méthodes d'extraction sélectionnées à partir de la littérature ont été testées et modifiées afin d'en comparer les rendements. Les méthodes sont assez semblables, alors que l'ajout de solvants organiques (ex. acétonitrile et méthanol) permet la précipitation des protéines. Puis, une centrifugation a lieu afin de séparer le surnageant des protéines et autres débris cellulaires. Idéalement, l'extraction doit être rapide et simple. Il était nécessaire de pouvoir faire la méthode d'extraction dans des eppendorf de 1,5 mL afin de faciliter la manipulation et la centrifugation de nombreux échantillons, encore une fois pour rendre la méthode le plus simple possible à effectuer par les technologues qui pourraient éventuellement être chargés de le faire si ce test devient un test clinique de routine. Le tableau IV démontre les rendements obtenus par 3 méthodes testées. On y voit que le rendement d'extraction est beaucoup plus constant et élevé lors de l'utilisation de 200 µL de méthanol. Un rendement d'extraction

moyen de 88,7% est obtenu par cette méthode, ce qui est très satisfaisant. Étonnamment, faire l'extraction avec une plus grande quantité de méthanol ne permet pas une meilleure extraction. Cependant, cela pourrait s'expliquer par le fait que l'échantillon soit alors trop dilué, ce qui rend sa quantification par le détecteur plus variable.

La méthode d'extraction organique utilisée est beaucoup plus simple et rapide que d'autres méthodes trouvées dans la littérature. Certaines méthodes nécessitent une plus grande quantité de sérum (75, 104), ce qui n'est pas toujours possible. D'autres étaient complexes et nécessitent l'évaporation du surnageant (50), ce qui nécessite plus de matériel et de temps. Une autre méthode nécessitait de l'équipement coûteux telles des cartouches d'extraction de phase inverse et un sonicateur (96, 101). La méthode développée est donc avantageuse sur plusieurs aspects.

4.4 Validation de la méthode

4.4.1 Limites de détection

La première étape de la validation d'une méthode expérimentale est de déterminer la limite de détection (LOD) de la méthode. Les LOD des 15 acides biliaries sont déterminées en faisant une régression linéaire avec des niveaux faiblement concentrés équidistants pour chacun des acides biliaries individuels. La plus faible concentration pouvant être détectée et distinguée du blanc correspond à la limite de détection. Les résultats obtenus pour les tests de limites de détection sont montrés au tableau V. Les limites s'étalent entre 0,004 et 0,071 $\mu\text{mol/L}$. La concentration physiologique des acides biliaries totaux dans le sérum se situe habituellement environ entre 1 et 5 $\mu\text{mol/L}$. Les limites de détection sont beaucoup plus faibles que les concentrations attendues, donc elles sont très acceptables.

4.4.2 Coefficients de variation intra et inter essai

Ensuite, on évalue le coefficient de variation (CV) intra essai et inter-essai. Le CV intra essai permet le calcul de la variation du signal obtenu pour un même échantillon quantifié plusieurs fois. Le CV inter-essai permet le calcul de la variation du signal obtenu pour l'analyse d'échantillons de même concentration mais extraits et quantifiés des jours différents. Une méthode ayant un coefficient de variation inférieur à 20% est jugée acceptable pour ce projet. L'imprécision analytique intra essai (%CV) de la méthode de quantification est déterminée en effectuant 9 lectures des 2 niveaux de contrôles de qualité la même journée. L'imprécision analytique inter-essai (%CV) de la méthode de quantification est déterminée en effectuant une lecture de chaque niveau de de contrôle de qualité sur 15 jours différents. Le tableau VI présente les résultats obtenus pour cette étape. On obtient un CV intra essai variant entre 2,0% à 3,2% selon les espèces d'acides biliaries, pour une moyenne de 2,8%, ce qui est très faible et donc très fiable. Pour ce qui est du CV inter-essai, on se situe entre 4,3% à 13,5%, pour une moyenne de 8,1%. Les résultats sont donc très satisfaisants.

En comparaison avec la méthode enzymatique colorimétrique, la variation intra essai est similaire mais la variation inter essai est légèrement plus élevée. La variation est en dessous de 5% tant pour l'intra essai que pour l'inter-essai pour cette méthode (96), mais il est à noter que cette variation est sur la mesure totale des acides biliaries et non sur les espèces individuels. Cependant, les variations intra et inter essai obtenus par la méthode développée sont similaires à ceux obtenus par d'autres méthodes de quantification d'acide biliaries individuels (101, 104).

4.4.3 Suppression d'ions

L'évaluation de la suppression d'ions sur la réponse du détecteur MS/MS a été évaluée en ajoutant une concentration connue de acides biliaries dans un pool de sérum, dans de l'eau ainsi que dans le méthanol post extraction. La suppression d'ions fait référence à une réponse ou un signal réduit occasionné par les interférences de la matrice des échantillons (107). Celle-

ci est souvent remarquée lors de l'utilisation de matrices complexes, tels les fluides biologiques n'ayant pas bien été préparés pour l'analyse, ce qui occasionne un problème lors de l'ionisation des analytes et ainsi diminue la sensibilité (108). Dans les fluides biologiques, certaines protéines ou encore différents lipides pourraient mener à un tel problème. C'est pourquoi une méthode d'extraction efficace est nécessaire, permettant ainsi de diminuer la complexité du mélange étudié. Un changement de signal signifie donc que le résultat de l'analyse est influencé par la matrice. Le tableau VII démontre les résultats obtenus pour cette partie. On note une suppression d'ions variant entre 1,9% et 13,6%. 10 espèces ont démontré une suppression d'ion supérieure à 10%. Une suppression d'ions trop importante a pour effet de grandement atténuer la précision, l'exactitude et la limite de détection, entre autres. Cependant, ayant démontré que les précisions intra et inter essai sont satisfaisantes, de même que la limite de quantification de chaque acide biliaire, on conclut que cette suppression d'ions n'est pas strictement un problème en soi.

4.4.4 Linéarité

L'évaluation de linéarité permet de s'assurer de l'intervalle de concentrations pour laquelle la concentration calculée par la méthode de quantification correspond à la concentration réelle d'un échantillon. La linéarité est déterminée en faisant la quantification d'une régression linéaire faite par dilution en série avec des niveaux très concentrés répartis dans l'intervalle de mesure (entre 0,2 et 200 $\mu\text{mol/L}$), dans une matrice identique aux échantillons patients (sérum). Notre courbe de calibration se situe entre 8 $\mu\text{g/mL}$ (environ 15 $\mu\text{mol/L}$) et 0,008 $\mu\text{g/mL}$ (environ 0,015 $\mu\text{mol/L}$). Cet intervalle est choisi alors que les concentrations physiologiques des acides biliaires sont rarement en dehors. Cependant, dans le cadre du projet de recherche, des échantillons sont très concentrés alors qu'on s'intéresse au dosage d'acides biliaires chez les patientes atteintes de cholestase intrahépatique de la grossesse. La linéarité permet donc de vérifier la validité de l'extrapolation de la courbe de calibration pour le dosage de ces échantillons plus concentrés. La figure 21 démontre droites de corrélation de la concentration calculée en fonction de la concentration réelle pour chacun des acides biliaires. La concentration calculée en fonction de la concentration réelle est bien

linéaire. Le coefficient de corrélation est un indicateur qui permet de juger la qualité de la régression tracée. Il atteste donc de l'adéquation entre le modèle et les données observées. On s'intéresse à la concentration calculée en fonction de la concentration réelle des échantillons. On note que pour l'intervalle 200-0,02 $\mu\text{mol/L}$, tous les coefficients obtenus, pour les 15 espèces d'acide biliaire, sont très près ou égaux à 1. Cela signifie l'équation de la corrélation est bien représentative des données. On peut donc conclure qu'il est fiable d'extrapoler à partir de la courbe de calibration afin de quantifier des échantillons plus fortement concentrés, jusqu'à une concentration de 200 $\mu\text{mol/mL}$ en utilisant ce modèle mathématique.

4.4.5 Stabilité des analytes dans le sérum

Une autre composante importante de la validation de la méthode est la stabilité des échantillons et des contrôles de qualité. En milieu hospitalier, il est important de savoir dans quelles conditions les analytes sont stables pour les tester. Si un analyte n'est pas stable sous certaines conditions, les analyses peuvent varier et donner des résultats erronés. De plus, des contrôles de qualité de concentrations connues sont utilisés et testés afin de s'assurer que les résultats sont représentatifs, il faut donc s'assurer que ceux-ci soient également stables dans les conditions de conservation.

Tout d'abord, la stabilité de l'échantillon de sérum après 3 cycles de gel et dégel est testée. La figure 22 montre les résultats obtenus. En A, on compare le signal obtenu après le dosage du niveau haut de contrôle de qualité. On voit que les analytes sont stables après 3 cycles de gel/dégel à l'exception de DCA, G-DCA et T-DCA, pour lesquels le signal diminue d'environ 22 à 30%. Pour les autres acides biliaires, la variation du signal est inférieure au coefficient de variation de la méthode. Pour ce qui est du niveau bas de contrôle de qualité, il n'y a aucune variation du signal pour aucune des espèces d'acides biliaires. On peut donc conclure que les acides biliaires sont stables suite à 3 cycles de gel/dégel à l'exception des 3 mentionnés ci-dessus, lorsque présents en concentration plus élevée. Cependant, sachant que ces espèces d'acides biliaires sont habituellement présents en faible concentration dans le sérum, il est possible de penser que cette altération n'entraînera qu'un changement négligeable

lors du dosage d'acides biliaires totaux. Par contre, il est préférable de ne pas effectuer plusieurs cycles de gel et dégel aux échantillons de sérum afin de s'assurer de l'exactitude de la quantification. La stabilité suite au gel unique (-28°C) est testée ultérieurement.

Dans le même ordre d'idée, la stabilité des analytes à température pièce est analysée. Les résultats sont montrés à la figure 23. Les échantillons sont dosés après avoir été conservés à température pièce pendant 24h et 5 jours. Cette fois-ci, on voit que dans le cas des hauts contrôles de qualité, le signal est assez stable, alors que le changement de signal n'est supérieur au coefficient de variation inter-essai dans aucun cas. Par contre, pour les contrôles de qualité faiblement concentrés, on note une grande perte de signal pour le G-DCA, alors qu'une diminution de 15% est observée après 24h, et de 55% après 5 jours. On peut donc conclure qu'à température pièce, les analytes sont stables à l'exception du G-DCA lorsque présent en faible concentration. Comme dans le cas précédent, les analyses pourraient en être peu affectées. Cependant, il est préférable de ne pas conserver les échantillons à température pièce afin de s'assurer de la validité de la quantification.

La condition testée ensuite est la conservation à 4°C. Les échantillons conservés à température pièce sont quantifiés après 24h et après 5 jours. Les résultats obtenus sont montrés à la figure 24. On voit que pour les contrôles de qualité élevés ainsi que bas, le signal reste stable après 24h comparativement aux échantillons fraîchement préparés. Cependant, après 5 jours, on note une altération du signal, encore une fois chez les espèces DCA, G-DCA ainsi que T-DCA, tant en concentration élevée que faible, comparativement aux résultats obtenus pour la conservation à température pièce. Ceci n'est pas surprenant alors qu'il a déjà été mentionné dans la littérature que les acides biliaires dans le sérum sont stables lorsque conservés à 4°C, dans la mesure où ils sont dosés dans un délai de 5 jours (109).

Finalement, la dernière condition de conservation testée est à -28°C. Comme pour la conservation à température pièce et à 4°C, les deux niveaux de contrôle de qualité sont entreposés pendant 24h et 5 jours respectivement. Les résultats obtenus sont présentés à la

figure 24. Au même titre que lors du gel et dégel, les seules espèces pour lesquelles le signal diminue considérablement sont le DCA, G-DCA ainsi que T-DCA. Cependant, on note cette diminution tant à faible qu'à plus grande concentration. Cette observation est contraire aux données trouvées dans la littérature. Souvent, il est mentionné que les acides biliaires dans le sérum sont stables sur de très longues périodes de temps (jusqu'à plusieurs mois) lorsque conservés -28°C (110, 111). Dans notre cas, il s'agissait de solutions de travail d'acides biliaires dans du sérum négatif, contenant une fraction des lipides et protéines qu'on retrouve habituellement dans les fluides biologiques en situation normale. Cela peut expliquer qu'ils soient moins stables. Dans des échantillons de sérum de patients, les autres composants du sérum (protéines, lipides, etc) peuvent aider à la conservation. Seuls, il semble qu'ils soient moins stables, comme le montre nos résultats.

La meilleure façon de conserver les échantillons avant le dosage est donc à 4°C pour une faible période de temps, ce qui est souvent le cas pour les dosages effectués dans le sang ou dans le sérum. Pour des périodes prolongées, la congélation est acceptable.

4.4.6 Corrélation avec la méthode enzymatique traditionnelle

Le dernier volet de la validation de la méthode correspond à comparer la méthode développée avec une autre méthode déjà existante. Les acides biliaires totaux sont actuellement dosés au CHUM par une méthode enzymatique par colorimétrie. La figure 26 présente les résultats obtenus alors qu'on rapporte sur un graphique les résultats obtenus par la méthode enzymatique en fonction des résultats obtenus par la méthode LC-MS/MS développée. 232 échantillons sont alors comparés, dans un intervalle de 1 à $360\ \mu\text{mol/L}$. Pour ce faire, le total des acides biliaires est calculé en additionnant la concentration des 15 acides biliaires individuels quantifiés par LC-MS/MS. Lorsqu'on regarde cette figure, on remarque une bonne corrélation entre les 2 méthodes. Le coefficient de corrélation est de 0,964. Compte tenu du fait que la variation intra-essai de la méthode LC-MS/MS est d'environ 8%, et que la méthode enzymatique traditionnelle a également une marge d'erreur de 4,1%, cette corrélation est très bonne.

Les figures 27 et 28 représentent les mêmes données mais séparées en 2 groupes distincts, soient les échantillons entre 1 et 100 $\mu\text{mol/L}$ et les échantillons de concentration supérieure à 100 $\mu\text{mol/L}$. Le but était de déterminer si la corrélation était supérieure pour l'un des 2 groupes. On remarque que le coefficient de corrélation dans le cas des échantillons entre 1 et 100 $\mu\text{mol/L}$ est de 0,910, alors que le coefficient de corrélation pour les échantillons de concentration supérieure à 100 $\mu\text{mol/L}$ est de 0,836. La corrélation pour des échantillons de plus faible concentration est donc meilleure que pour les échantillons fortement concentrés. Cela peut être dû au fait que le test enzymatique n'est pas tout à fait adapté pour des concentrations si élevées. En effet, la linéarité de la mesure du test a été validée pour ce test et était bonne pour les échantillons concentrés entre 0 et 100 $\mu\text{mol/L}$. Par contre, au-delà de ce seuil, une dilution doit être faite, comme effectué pour cette section du projet (105). Cela pourrait indiquer un biais dans le test de quantification utilisant la méthode enzymatique traditionnelle. Il serait intéressant de vérifier si cela pourrait avoir un impact cliniquement significatif sur les résultats, mais il est encore incertain qu'une concentration en acides biliaires sériques élevée est proportionnelle à un taux de complications quelconque.

4.5 Sensibilité à chaque acide biliaire individuel

La partie suivante du projet de recherche s'intéressait à comparer l'efficacité des 2 méthodes à distinguer chaque espèce d'acide biliaire. L'hypothèse était que la méthode LC-MS/MS développée serait plus sensible à la détection d'une augmentation d'un acide biliaire individuel pour les 15 espèces. L'hypothèse était également que la méthode enzymatique serait sensible à la détection d'une augmentation de certains acides biliaires individuels, mais pas pour les 15 espèces.

Afin de comparer la sensibilité à détecter un changement d'un seul acide biliaire, les acides biliaires sont d'abord dosés de façon individuelle dans le sérum négatif fortifié. Le sérum négatif est fortifié à 4 $\mu\text{g/mL}$ et 2 $\mu\text{g/mL}$ de chacun des acides biliaires de façon

individuelle. La concentration en acides biliaires des 30 échantillons est mesurée par les 2 méthodes, soient par la méthode LC-MS/MS développée, puis par le kit de dosage enzymatique par colorimétrie des acides biliaires totaux par GenWay, en duplicata. On s'intéresse à l'exactitude du résultat obtenu. L'exactitude est calculée en soustrayant la concentration d'acides biliaires totaux avant l'ajout de l'acide biliaire individuel de la concentration d'acides biliaires totaux après l'ajout de l'acide biliaire individuel, divisée par la concentration réelle de l'acide biliaire individuel ajouté. L'exactitude est exprimée en pourcentage pour chacune des 2 méthodes. Le tableau VIII présente les résultats obtenus.

Contre toute attente, les résultats obtenus sont très loin de ce que l'hypothèse établie prédisait. On voit que tant pour la méthode LC-MS/MS que la méthode de colorimétrie, l'exactitude est très faible et très variable. En effet, pour les 15 acides biliaires, l'exactitude varie entre 37% et 157% pour la méthode enzymatique et entre 105% et 131% pour la méthode LC-MS/MS pour une concentration de 4 $\mu\text{g/mL}$. Pour les échantillons à une concentration de 2 $\mu\text{g/mL}$, l'exactitude varie entre 37% et 157% pour la méthode enzymatique et entre 110% et 145% pour la méthode LC-MS/MS. Bien que l'exactitude moyenne soit meilleure pour la méthode LC-MS/MS, on ne peut rien conclure à partir de ces résultats car peu représentatifs et trop variables. On peut toutefois noter que l'exactitude, pour une même méthode et un même acide biliaire, reste semblable pour les 2 concentrations. Ceci-dit, ce ne sont pas les méthodes de quantification qui semblent problématiques mais bien la stabilité de l'analyte dans le sérum à si faible concentration lorsque présent individuellement.

L'analyse a été refaite pour des concentrations plus élevées, soient 50 $\mu\text{g/mL}$ et 25 $\mu\text{g/mL}$. Bien que moins prononcé, le même problème survient. Le tableau IX présente les résultats obtenus. L'exactitude varie entre 43% et 129% pour la méthode enzymatique et entre 30% et 83% pour la méthode LC-MS/MS pour une concentration de 50 $\mu\text{g/mL}$. Pour les échantillons à une concentration de 25 $\mu\text{g/mL}$, l'exactitude varie entre 43% et 147% pour la méthode enzymatique et entre 45% et 85% pour la méthode LC-MS/MS. Encore une fois, l'exactitude, pour une même méthode et un même acide biliaire, reste semblable pour les 2

concentrations. Ce ne sont pas les méthodes de quantification qui semblent problématiques mais bien la stabilité de l'analyse dans le sérum à si faible concentration lorsque présent individuellement.

La stabilité des échantillons dans le sérum a été testée pour chacun des acides biliaires individuels lorsque présent dans l'échantillon avec les autres espèces d'acides biliaires. La stabilité des sels biliaires n'a pas été testée dans les échantillons comportant uniquement 1 seul acide biliaire. On pense donc, à la lueur de ces résultats, que les acides biliaires sont stables dans les conditions décrites plus haut uniquement lorsque présent dans un mélange composé de plusieurs espèces d'acides biliaires. Lorsque seul, il est difficile de les conserver et quantifier ainsi que de s'assurer de leur stabilité car ils semblent avoir des caractéristiques différentes.

Toujours dans l'optique de comparer la sensibilité à la variation d'un seul acide biliaire, des échantillons de sérum à concentration connue en acides biliaires sont fortifié avec une seule espèce d'acide biliaire. Des échantillons de sérum ayant une concentration en acides biliaires totaux entre 9 et 15 $\mu\text{mol/L}$ sont sélectionné et fortifié de quelques $\mu\text{mol/L}$ de chacun des acides biliaires de façon individuelle. On s'intéresse encore une fois à la concentration en acides biliaires totaux obtenue en fonction de la concentration réelle, pour chacune des 2 méthodes. Les résultats obtenus sont présentés au tableau X.

On voit que, en moyenne, l'exactitude moyenne est très bonne dans les 2 cas, soit de 92%. Cependant, si on compare l'exactitude pour chacun des acides biliaires, on voit que celle ci est très variables entre les différents acides biliaires pour la méthode enzymatique, allant de 59 à 168%. Cependant, pour la méthode LC-MS/MS, celle-ci varie entre 70 et 122%, ce qui est plus petit. L'ajout d'acide biliaire individuel dans un échantillon de sérum de concentration connue en acides biliaires ne semble pas réglé le problème rencontré précédemment, alors que toutes les étapes de validation ont confirmé la validité des 2 tests.

On s'attendait, dans cette partie, à confirmer que la méthode LC-MSMS est plus efficace et sensible pour la détection de certains acides biliaries de façon individuelle. Cependant, cela n'a pas été prouvé.

4.6 Profilage des acides biliaries

À la suite de la quantification par LC-MS/MS des 232 échantillons, il est possible de faire le profilage des acides biliaries individuels en exprimant la concentration relative de ceux-ci. La proportion relative d'un acide biliaire précis correspond à sa concentration individuelle divisée par la concentration en acides biliaries totaux, et est exprimée en pourcentage. Comme mentionné dans l'introduction, les acides biliaries sont présents dans le sang périphérique en concentration d'environ 3 à 5 $\mu\text{mol/L}$ en situation normale, alors qu'une anomalie hépatique est soupçonnée lorsque le seuil de 10 $\mu\text{mol/L}$ est atteint. C'est également habituellement à ce moment que des symptômes et effets indésirables sont remarqués, bien que ça ne soit pas toujours le cas. Il est donc intéressant de comparer les profilages d'acides biliaries pour les échantillons sanguins de 10 $\mu\text{mol/L}$ ou moins par rapport aux profilages d'acides biliaries pour des échantillons supérieurs à 10 $\mu\text{mol/L}$. Cela permet de mettre en évidence les acides biliaries responsables de la hausse de concentration sanguine. En sachant quels acides biliaries ont une concentration accrue, il serait possible d'avoir une meilleure idée de la cause du déversement dans le sang de ceux-ci. De plus, il serait également possible d'avoir une meilleure idée de la raison des différents symptômes en sachant quels acides biliaries en sont responsables.

L'hypothèse est que certains profils d'acides biliaries permettraient d'évaluer le risque de complications chez les femmes atteintes de CIG par leur composition en acides biliaries. Par la comparaison des profilages, il est donc possible d'avoir une meilleure idée de la ou des espèces responsables de ces complications et ainsi pouvoir déterminer s'il est possible de

distinguer des sous-groupes de patientes plus à risque de complications ou qui répondraient mieux au traitement.

La figure 29 présente cette comparaison de profilage. Tout de suite, on remarque que tant dans les échantillons de concentration d'acides biliaires totaux inférieure et supérieure à 10 $\mu\text{mol/L}$, les espèces LCA, G-LCA et T-LCA sont présents en concentrations relatives très faibles dans le sang périphérique. Les espèces CA, UDCA, TUDCA, TDCA, DCA et CDCA sont présents en moins de 10%, tant dans les échantillons faiblement ou fortement concentrés. Dans tous ces cas, leur concentration relative dans la composition des acides biliaires totaux diminue. On peut donc conclure que la concentration sanguine de ces espèces reste sensiblement inchangée. La concentration de ces acides biliaires individuels restant la même mais dans un total d'acides biliaires totaux beaucoup augmenté, cela explique la diminution de la concentration relative. Ils ne sont pas les acides biliaires responsables de l'augmentation de la concentration totale dans le sang.

Dans les échantillons de concentration de 10 $\mu\text{mol/L}$ et moins, les 4 espèces les plus présentes sont le GCA, GCDCA, GDCA ainsi que TCDCA, avec des proportions moyennes de 14%, 21%, 13% et 10% respectivement. Il s'agit des 4 espèces constituant chacune plus de 10% des acides biliaires totaux. Dans les échantillons ayant une concentration en acides biliaires de plus de 10 $\mu\text{mol/L}$, leur proportion devient respectivement de 23%, 14%, 5% ainsi que 9%. On remarque que le GCA est dans ce cas l'espèce présente en plus grande partie avec une augmentation de 9 points de pourcentage, alors qu'il s'agissait du GCDCA pour les échantillons faiblement concentrés. La proportion de celui-ci diminue de 7 points de pourcentage, mais reste présent en grande proportion avec 14%. Pour ce qui est du GDCA, sa proportion diminue de 8 points de pourcentage et le TCDCA reste similaire avec une diminution de 1 point de pourcentage seulement. Ces 2 espèces ne sont donc pas les premières responsables de l'augmentation de concentration globale dans les échantillons ayant une concentration d'acides biliaires totaux supérieure à 10 $\mu\text{mol/L}$. Pour les échantillons concentrés, on remarque une grande augmentation des espèces TCA, qui double en proportion,

ainsi que GUDCA qui quadruple en proportion, avec un total de 20%. Cet acide biliaire passe donc au 2^e rang pour le plus présent.

Pour les échantillons très concentrés en acides biliaires, les 3 espèces présentes en plus grande proportion, et qui connaissent une grande augmentation en proportion par rapports aux échantillons peu concentrés, sont donc GCA, TCA, ainsi que GUDCA. Ce sont donc ces espèces qui sont majoritairement responsables de l'augmentation de la concentration en acides biliaires dans le sang.

Ces résultats sont assez similaires avec ce qui est présent dans la littérature. Une étude datant de 1998 avait démontré que chez les femmes atteintes de CIG, les espèces présentes en plus grande proportion dans le sérum sont les acides choliques (76). Cependant, cette proportion représentait l'acide cholique total, sans distinguer si l'acide cholique était présent sous forme libre ou conjugué. Nous avons tout de même observé une conclusion similaire alors que 2 des 3 espèces prédominantes sont l'acide cholique, soient GCA et TCA. L'augmentation de ces 2 espèces dans les cas de CIG a également été observée dans une autre étude (75). Cependant, cette étude démontrait également une augmentation de GCDCA, ce qui n'est pas démontré ici. Ceci peut s'expliquer par le fait que l'étude en question étudiait des spécimens de concentration médiane en acides biliaires totaux de 21,30 $\mu\text{mol/L}$ en moyenne, ce qui est très inférieur à la plage analytique étudiée dans ce projet.

Les échantillons reçus étant dénominalisés, il est à ce stade impossible de savoir si un traitement a été administré avant la prise de l'échantillon sanguin. Il est également impossible de diviser les profils en fonction des symptômes rencontrés et de la gravité de ceux-ci. Il est impossible à partir de ces résultats de déterminer si l'hypothèse selon laquelle certains profils d'acides biliaires permettraient d'évaluer le risque de complications chez les femmes atteintes de CIG par leur composition en acides biliaires est confirmée ou infirmée, puisqu'il est impossible de diviser les échantillons en sous-groupe en fonction des différents critères. Il est évident que cette classification en fonction de différents critères (administration d'un

traitement, présence ou non de symptômes, etc) est la prochaine étape à réaliser pour ce projet. Ce faisant, il sera possible d'avoir une meilleure compréhension du mécanisme du traitement à l'UDCA sur la baisse de la concentration totale d'acide biliaire dans le sang en ciblant les différences dans les profilages. De plus, si différents profilages significativement différents correspondent à certaines intensités de symptômes ou des risques accrus de conséquences périnatales indésirables, il serait possible de rapidement cibler les grossesses plus à risque.

Nous pensions également que le traitement à l'UDCA, étant lui-même un acide biliaire, pourrait mener à une interférence lors de la quantification des acides biliaries totaux sériques, particulièrement dans les cas les plus problématiques de CIG où de fortes doses de ce composé sont administrées. En regardant le profilage, on voit que tant les échantillons faiblement ou fortement concentrés, l'UDCA est présent est très petite proportion (1% et 5% respectivement), de même que le TUDCA (0% et 3% respectivement). Cependant, il est très possible que le traitement à l'UDCA soit la cause de l'augmentation du GUDCA dans le sérum. Il faudrait, afin de le savoir, comparer les profilages d'acides biliaries en fonction du traitement administré.

5 Conclusion et perspectives

En conclusion, la méthode de quantification des acides biliaires sanguins par chromatographie liquide couplée à un spectromètre de masse en tandem a été développée et validée. Les surnageants obtenus par précipitation de protéines par le méthanol dans le sérum ont été injectés dans un LC-MS/MS. La séparation est effectuée sur la colonne de type interactions hydrophobes : Kinetex XB-C₁₈ (4,6x100 mm; 2,6 μ) en mode gradient. Les transitions ioniques ont été déterminées pour les 15 acides biliaires au préalable et l'acide cholique deutéré, l'acide chénodésoxycholique deutéré ainsi que l'acide désoxycholique deutéré ont été utilisés comme standards internes. Le temps d'analyse est de 17 minutes.

Quinze acides biliaires, y compris les acides biliaires conjugués et libres, ont été séparés et quantifiés par LC-MS/MS. Les coefficients de corrélation des courbes standards pour tous les acides biliaires étaient supérieurs à 0,9966. L'imprécision intra-analyse obtenue est de 2,8% pour des échantillons à 5 et 0,8 μ g/mL et l'imprécision inter-analyse est de 8,1% pour les mêmes concentrations. Une suppression d'ion de 8,2% a été observée. Une bonne corrélation a été obtenue entre la méthode LC-MS/MS et une méthode enzymatique ($r=0,964$).

Trois acides biliaires ont été identifiés comme principaux responsables de l'augmentation de la concentration d'acides biliaires totaux dans le sérum dans les échantillons concentrés ($>10 \mu$ mol/L), soient GCA, TCA, ainsi que GUDCA.

Cette méthode permettra d'atteindre le but subséquent du projet de recherche, soit la comparaison des profils de acides biliaires lors du traitement à l'UDCA. Cela nous permettra de savoir si l'augmentation du GUDCA dans le sérum est dû à ce traitement, ainsi que de savoir quels autres acides biliaires diminuent lors de l'administration du traitement. Cela pourrait permettre aussi d'avoir une meilleure idée du mécanisme d'action de ce composé.

Les échantillons étudiés dans le cadre de ce projet de recherche étant dénominalisés, il était impossible de savoir si un traitement avait été administré avant la prise de l'échantillon sanguin. Il serait intéressant de comparer les profils d'acides biliaires des échantillons en fonction du traitement administré, alors que l'UDCA est souvent utilisé pour soulager les symptômes reliés à la CIG. En effet, l'augmentation de G-UDCA observé dans la section « profilage des acides biliaires » pourrait être directement lié avec la prise de UDCA.

Ne sachant pas la cause de l'augmentation des acides biliaires dans le sang chez les patientes atteintes de la cholestase intrahépatique de grossesse, la piste des voies de synthèse et de contrôle des 3 acides biliaires identifiés augmentés est envisageable, ainsi que le dérèglement des transporteurs de ceux-ci.

Il serait également intéressant de séparer en sous-groupe les échantillons fortement concentrés étudiés en fonction d'autres facteurs, par exemple : le trimestre d'apparition des symptômes, les symptômes présents et la gravité de ceux-ci, ainsi que les conséquences périnatales indésirables rencontrées. Si différents profilages significativement différents correspondent à certaines intensités de symptômes ou des risques accrus de conséquences périnatales indésirables, il serait possible de rapidement cibler les grossesses plus à risque. Cela serait maintenant possible grâce au développement de la présente méthode. Pour ce faire, un suivi de plusieurs grossesses devra être effectué afin de pouvoir comparer les profilages en fonction des critères mentionnés plus tôt.

On pourrait également s'intéresser à l'effet du jeûne sur les profils d'acides biliaires. On pense que le jeûne a un effet sur la quantification des acides biliaires sanguins totaux plus important chez les cas les plus sévères de CIG. Cela ferait en sorte que les valeurs de référence pourraient être modifiées également en fonction de l'état de jeûne du patient.

Finalement, il serait possible d'évaluer le profilage des acides biliaires sériques en fonction de l'âge gestationnel des patientes, ce qui pourrait influencer encore une fois les valeurs de référence.

BIBLIOGRAPHIE

1. Abdel-Misih SR, Bloomston M. Liver anatomy. *Surg Clin North Am.* 2010;90(4):643-53.
2. Société canadienne du cancer. Le foie : 2020 ; . Disponible: <https://www.cancer.ca/fr-ca/cancer-information/cancer-type/liver/liver-cancer/the-liver/?region=qc>
3. Fondation canadienne du foie. À propos du foie : 2017 ; . Disponible: <https://www.liver.ca/fr/your-liver/>
4. American cancer society. What Is Liver Cancer? : 2020 ; . Disponible: <https://www.cancer.org/cancer/liver-cancer/about/what-is-liver-cancer.html>
5. Trefts E, Gannon M, Wasserman DH. The liver. *Curr Biol.* 2017;27(21):R1147-r51.
6. Fondation Canadienne du foie
7. Morris, S., Bilodeau, M., Cooper, C., Mackie, D., Depew, W., Villeneuve, J.-P., Bain, V., and Tarba, R. (2013). Liver disease in Canada : a crisis in the making : an assessment of liver disease in Canada (Markham, Ontario : Canadian Liver Foundation).
8. Farzaei MH, Zobeiri M, Parvizi F, El-Senduny FF, Marmouzi I, Coy-Barrera E, et al. Curcumin in Liver Diseases: A Systematic Review of the Cellular Mechanisms of Oxidative Stress and Clinical Perspective. *Nutrients.* 2018;10(7).
9. Luo L, Aubrecht J, Li D, Warner RL, Johnson KJ, Kenny J, et al. Assessment of serum bile acid profiles as biomarkers of liver injury and liver disease in humans. *PLoS One.* 2018;13(3):e0193824.
10. Tajiri K, Shimizu Y. Liver physiology and liver diseases in the elderly. *World J Gastroenterol.* 2013;19(46):8459-67.
11. Voet D, Voet JG. *Biochemistry.* 4th^e éd. Hoboken, NJ: John Wiley and Sons; 2011.
12. Raddatz D, Ramadori G. Carbohydrate metabolism and the liver: actual aspects from physiology and disease. *Z Gastroenterol.* 2007;45(1):51-62.
13. Nguyen P, Leray V, Diez M, Serisier S, Le Bloc'h J, Siliart B, et al. Liver lipid metabolism. *J Anim Physiol Anim Nutr (Berl).* 2008;92(3):272-83.

14. Tessari P. Protein metabolism in liver cirrhosis: from albumin to muscle myofibrils. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care*. 2003;6(1):79-85.
15. Soria LR, Nitzahn M, De Angelis A, Khoja S, Attanasio S, Annunziata P, et al. Hepatic glutamine synthetase augmentation enhances ammonia detoxification. *J Inher Metab Dis*. 2019;42(6):1128-35.
16. Hamoud AR, Weaver L, Stec DE, Hinds TD, Jr. Bilirubin in the Liver-Gut Signaling Axis. *Trends Endocrinol Metab*. 2018;29(3):140-50.
17. Sticova E, Jirsa M. New insights in bilirubin metabolism and their clinical implications. *World J Gastroenterol*. 2013;19(38):6398-407.
18. Chiang JY. Bile acid metabolism and signaling. *Comprehensive Physiology*. 2013;3(3):1191-212.
19. Boyer JL. Bile formation and secretion. *Comprehensive Physiology*. 2013;3(3):1035-78.
20. Chiang JY. Regulation of bile acid synthesis: pathways, nuclear receptors, and mechanisms. *J Hepatol*. 2004;40(3):539-51.
21. Hofmann AF, Hagey LR. Bile acids: chemistry, pathochemistry, biology, pathobiology, and therapeutics. *Cell Mol Life Sci*. 2008;65(16):2461-83.
22. Monte MJ, Marin JJ, Antelo A, Vazquez-Tato J. Bile acids: chemistry, physiology, and pathophysiology. *World J Gastroenterol*. 2009;15(7):804-16.
23. McGlone ER, Bloom SR. Bile acids and the metabolic syndrome. *Ann Clin Biochem*. 2019;56(3):326-37.
24. Lombardo D. Bile salt-dependent lipase: its pathophysiological implications. *Biochim Biophys Acta*. 2001;1533(1):1-28.
25. Charach G, Grosskopf I, Rabinovich A, Shochat M, Weintraub M, Rabinovich P. The association of bile acid excretion and atherosclerotic coronary artery disease. *Therap Adv Gastroenterol*. 2011;4(2):95-101.
26. Alnouti Y. Bile Acid Sulfation: A Pathway of Bile Acid Elimination and Detoxification. *Toxicol Sci*. 2009;108(2):225-46.
27. Russell DW. The enzymes, regulation, and genetics of bile acid synthesis. *Annu Rev Biochem*. 2003;72:137-74.
28. Meaney S. Epigenetic regulation of cholesterol homeostasis. *Front Genet*. 2014;5:311.

29. Alphonse PAS, Jones PJH. Revisiting Human Cholesterol Synthesis and Absorption: The Reciprocity Paradigm and its Key Regulators. *Lipids*. 2016;51(5):519-36.
30. Chen L, Ma MY, Sun M, Jiang LY, Zhao XT, Fang XX, et al. Endogenous sterol intermediates of the mevalonate pathway regulate HMGCR degradation and SREBP-2 processing. *J Lipid Res*. 2019;60(10):1765-75.
31. Karr S. Epidemiology and management of hyperlipidemia. *Am J Manag Care*. 2017;23(9 Suppl):S139-s48.
32. Burkard I, von Eckardstein A, Waeber G, Vollenweider P, Rentsch KM. Lipoprotein distribution and biological variation of 24S- and 27-hydroxycholesterol in healthy volunteers. *Atherosclerosis*. 2007;194(1):71-8.
33. Norlin M, Wikvall K. Enzymes in the conversion of cholesterol into bile acids. *Curr Mol Med*. 2007;7(2):199-218.
34. Hofmann AF, Hagey LR. Bile Acids: Chemistry, Pathochemistry, Biology, Pathobiology, and Therapeutics. *Cellular and Molecular Life Sciences*. 2008;65(16):2461-83.
35. Shonsey EM, Wheeler J, Johnson M, He D, Falany CN, Falany J, et al. Synthesis of bile acid coenzyme a thioesters in the amino acid conjugation of bile acids. *Methods Enzymol*. 2005;400:360-73.
36. Russell DW. The Enzymes, Regulation, and Genetics of Bile Acid Synthesis. *Annu Rev Biochem*. 2003;72(1):137-74.
37. and JKR, Hashimoto T. PEROXISOMAL β -OXIDATION AND PEROXISOME PROLIFERATOR-ACTIVATED RECEPTOR α : An Adaptive Metabolic System. *Annu Rev Nutr*. 2001;21(1):193-230.
38. Steinberg SJ, Wang SJ, McGuinness MC, Watkins PA. Human liver-specific very-long-chain acyl-coenzyme A synthetase: cDNA cloning and characterization of a second enzymatically active protein. *Mol Genet Metab*. 1999;68(1):32-42.
39. Mihalik SJ, Steinberg SJ, Pei Z, Park J, Kim DG, Heinzer AK, et al. Participation of two members of the very long-chain acyl-CoA synthetase family in bile acid synthesis and recycling. *J Biol Chem*. 2002;277(27):24771-9.
40. Ohba T, Holt JA, Billheimer JT, Strauss JF, 3rd. Human sterol carrier protein x/sterol carrier protein 2 gene has two promoters. *Biochemistry*. 1995;34(33):10660-8.

41. Li T, Chiang JY. Regulation of bile acid and cholesterol metabolism by PPARs. *PPAR Res.* 2009;2009:501739.
42. Di Ciaula A, Garruti G, Lunardi Baccetto R, Molina-Molina E, Bonfrate L, Wang DQ, et al. Bile Acid Physiology. *Ann Hepatol.* 2017;16(Suppl. 1: s3-105.):s4-s14.
43. Martinez-Augustin O, Sanchez de Medina F. Intestinal bile acid physiology and pathophysiology. *World J Gastroenterol.* 2008;14(37):5630-40.
44. Jia W, Xie G, Jia W. Bile acid-microbiota crosstalk in gastrointestinal inflammation and carcinogenesis. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol.* 2018;15(2):111-28.
45. Ridlon JM, Harris SC, Bhowmik S, Kang DJ, Hylemon PB. Consequences of bile salt biotransformations by intestinal bacteria. *Gut Microbes.* 2016;7(1):22-39.
46. Ridlon JM, Kang DJ, Hylemon PB. Bile salt biotransformations by human intestinal bacteria. *J Lipid Res.* 2006;47(2):241-59.
47. Alnouti Y. Bile Acid sulfation: a pathway of bile acid elimination and detoxification. *Toxicol Sci.* 2009;108(2):225-46.
48. Barbier O, Trottier J, Kaeding J, Caron P, Verreault M. Lipid-activated transcription factors control bile acid glucuronidation. *Mol Cell Biochem.* 2009;326(1-2):3-8.
49. Sonne DP, van Nierop FS, Kulik W, Soeters MR, Vilsboll T, Knop FK. Postprandial Plasma Concentrations of Individual Bile Acids and FGF-19 in Patients With Type 2 Diabetes. *J Clin Endocrinol Metab.* 2016;101(8):3002-9.
50. Glicksman C, Pournaras DJ, Wright M, Roberts R, Mahon D, Welbourn R, et al. Postprandial plasma bile acid responses in normal weight and obese subjects. *Ann Clin Biochem.* 2010;47(Pt 5):482-4.
51. Frommherz L, Bub A, Hummel E, Rist MJ, Roth A, Watzl B, et al. Age-Related Changes of Plasma Bile Acid Concentrations in Healthy Adults--Results from the Cross-Sectional KarMeN Study. *PLoS One.* 2016;11(4):e0153959.
52. Vilca Melendez H, Rela M, Setchell KD, Murphy GM, Heaton ND. Bile acids analysis: a tool to assess graft function in human liver transplantation. *Transpl Int.* 2004;17(6):286-92.
53. Meng LJ, Sjovall J. Method for combined analysis of profiles of conjugated progesterone metabolites and bile acids in serum and urine of pregnant women. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl.* 1997;688(1):11-26.

54. Meng LJ, Reyes H, Palma J, Hernandez I, Ribalta J, Sjovall J. Profiles of bile acids and progesterone metabolites in the urine and serum of women with intrahepatic cholestasis of pregnancy. *J Hepatol.* 1997;27(2):346-57.
55. *Nutrition Therapy and Pathophysiology + Medical Nutrition Therapy: a Case-study Approach*, 5th Ed: Brooks/Cole Pub Co; 2016.
56. Roberts MS, Magnusson BM, Burczynski FJ, Weiss M. Enterohepatic circulation: physiological, pharmacokinetic and clinical implications. *Clin Pharmacokinet.* 2002;41(10):751-90.
57. Zwicker BL, Agellon LB. Transport and biological activities of bile acids. *Int J Biochem Cell Biol.* 2013;45(7):1389-98.
58. Walker IA, Nelson-Piercy C, Williamson C. Role of bile acid measurement in pregnancy. *Ann Clin Biochem.* 2002;39(Pt 2):105-13.
59. Stieger B. The role of the sodium-taurocholate cotransporting polypeptide (NTCP) and of the bile salt export pump (BSEP) in physiology and pathophysiology of bile formation. *Handb Exp Pharmacol.* 2011(201):205-59.
60. Meier PJ, Eckhardt U, Schroeder A, Hagenbuch B, Stieger B. Substrate specificity of sinusoidal bile acid and organic anion uptake systems in rat and human liver. *Hepatology.* 1997;26(6):1667-77.
61. Bull LN, van Eijk MJ, Pawlikowska L, DeYoung JA, Juijn JA, Liao M, et al. A gene encoding a P-type ATPase mutated in two forms of hereditary cholestasis. *Nat Genet.* 1998;18(3):219-24.
62. Dixon PH, van Mil SW, Chambers J, Strautnieks S, Thompson RJ, Lammert F, et al. Contribution of variant alleles of ABCB11 to susceptibility to intrahepatic cholestasis of pregnancy. *Gut.* 2009;58(4):537-44.
63. Ch'ng CL, Morgan M, Hainsworth I, Kingham JG. Prospective study of liver dysfunction in pregnancy in Southwest Wales. *Gut.* 2002;51(6):876-80.
64. Pusl T, Beuers U. Intrahepatic cholestasis of pregnancy. *Orphanet J Rare Dis.* 2007;2:26.
65. Abu-Hayyeh S, Ovadia C, Lieu T, Jensen DD, Chambers J, Dixon PH, et al. Prognostic and mechanistic potential of progesterone sulfates in intrahepatic cholestasis of pregnancy and pruritus gravidarum. *Hepatology.* 2016;63(4):1287-98.

66. Reyes H, Simon FR. Intrahepatic cholestasis of pregnancy: an estrogen-related disease. *Semin Liver Dis.* 1993;13(3):289-301.
67. Liu L, Zhang L, Zhang L, Yang F, Zhu X, Lu Z, et al. Hepatic Tmem30a Deficiency Causes Intrahepatic Cholestasis by Impairing Expression and Localization of Bile Salt Transporters. *Am J Pathol.* 2017;187(12):2775-87.
68. Jacquemin E, Cresteil D, Manouvrier S, Boute O, Hadchouel M. Heterozygous non-sense mutation of the MDR3 gene in familial intrahepatic cholestasis of pregnancy. *Lancet.* 1999;353(9148):210-1.
69. Dixon PH, Weerasekera N, Linton KJ, Donaldson O, Chambers J, Egginton E, et al. Heterozygous MDR3 missense mutation associated with intrahepatic cholestasis of pregnancy: evidence for a defect in protein trafficking. *Hum Mol Genet.* 2000;9(8):1209-17.
70. Jacquemin E. Role of multidrug resistance 3 deficiency in pediatric and adult liver disease: one gene for three diseases. *Semin Liver Dis.* 2001;21(4):551-62.
71. Reyes H, Baez ME, Gonzalez MC, Hernandez I, Palma J, Ribalta J, et al. Selenium, zinc and copper plasma levels in intrahepatic cholestasis of pregnancy, in normal pregnancies and in healthy individuals, in Chile. *J Hepatol.* 2000;32(4):542-9.
72. Berg B, Helm G, Petersohn L, Tryding N. Cholestasis of pregnancy. Clinical and laboratory studies. *Acta Obstet Gynecol Scand.* 1986;65(2):107-13.
73. Wikstrom Shemer E, Marschall HU. Decreased 1,25-dihydroxy vitamin D levels in women with intrahepatic cholestasis of pregnancy. *Acta Obstet Gynecol Scand.* 2010;89(11):1420-3.
74. Bacq Y, Sapey T, Brechot MC, Pierre F, Fignon A, Dubois F. Intrahepatic cholestasis of pregnancy: a French prospective study. *Hepatology.* 1997;26(2):358-64.
75. Geenes V, Lovgren-Sandblom A, Benthin L, Lawrance D, Chambers J, Gurung V, et al. The reversed feto-maternal bile acid gradient in intrahepatic cholestasis of pregnancy is corrected by ursodeoxycholic acid. *PLoS One.* 2014;9(1):e83828.
76. Egan N, Bartels A, Khashan AS, Broadhurst DI, Joyce C, O'Mullane J, et al. Reference standard for serum bile acids in pregnancy. *BJOG.* 2012;119(4):493-8.

77. Glantz A, Marschall HU, Mattsson LA. Intrahepatic cholestasis of pregnancy: Relationships between bile acid levels and fetal complication rates. *Hepatology*. 2004;40(2):467-74.
78. EASL Clinical Practice Guidelines: management of cholestatic liver diseases. *J Hepatol*. 2009;51(2):237-67.
79. Pata O, Vardareli E, Ozcan A, Serteser M, Unsal I, Saruc M, et al. Intrahepatic cholestasis of pregnancy: correlation of preterm delivery with bile acids. *The Turkish journal of gastroenterology : the official journal of Turkish Society of Gastroenterology*. 2011;22(6):602-5.
80. Kondrackiene J, Beuers U, Zalinkevicius R, Tauschel HD, Gintautas V, Kupcinskas L. Predictors of premature delivery in patients with intrahepatic cholestasis of pregnancy. *World J Gastroenterol*. 2007;13(46):6226-30.
81. Williamson C, Geenes V. Intrahepatic cholestasis of pregnancy. *Obstet Gynecol*. 2014;124(1):120-33.
82. Kondrackiene J, Kupcinskas L. Intrahepatic cholestasis of pregnancy-current achievements and unsolved problems. *World J Gastroenterol*. 2008;14(38):5781-8.
83. Bacq Y, Sentilhes L. Intrahepatic cholestasis of pregnancy: Diagnosis and management. *Clin Liver Dis (Hoboken)*. 2014;4(3):58-61.
84. Milkiewicz P, Gallagher R, Chambers J, Eggington E, Weaver J, Elias E. Obstetric cholestasis with elevated gamma glutamyl transpeptidase: incidence, presentation and treatment. *J Gastroenterol Hepatol*. 2003;18(11):1283-6.
85. Jain R, Suri V, Chopra S, Chawla YK, Kohli KK. Obstetric cholestasis: outcome with active management. *J Obstet Gynaecol Res*. 2013;39(5):953-9.
86. Geenes V, Chappell LC, Seed PT, Steer PJ, Knight M, Williamson C. Association of severe intrahepatic cholestasis of pregnancy with adverse pregnancy outcomes: a prospective population-based case-control study. *Hepatology*. 2014;59(4):1482-91.
87. Laatikainen T, Ikonen E. Fetal prognosis in obstetric hepatitis. *Ann Chir Gynaecol Fenn*. 1975;64(3):155-64.
88. Ekiz A, Kaya B, Avci ME, Polat I, Dikmen S, Yildirim G. Alanine aminotransferase as a predictor of adverse perinatal outcomes in women with intrahepatic cholestasis of pregnancy. *Pak J Med Sci*. 2016;32(2):418-22.

89. Williamson C, Hems LM, Goulis DG, Walker I, Chambers J, Donaldson O, et al. Clinical outcome in a series of cases of obstetric cholestasis identified via a patient support group. *BJOG*. 2004;111(7):676-81.
90. Huang WM, Gowda M, Donnelly JG. Bile acid ratio in diagnosis of intrahepatic cholestasis of pregnancy. *Am J Perinatol*. 2009;26(4):291-4.
91. Pascual MJ, Serrano MA, El-Mir MY, Macias RI, Jimenez F, Marin JJ. Relationship between asymptomatic hypercholanaemia of pregnancy and progesterone metabolism. *Clin Sci (Lond)*. 2002;102(5):587-93.
92. Chiang JYL. Bile acid metabolism and signaling in liver disease and therapy. *Liver Res*. 2017;1(1):3-9.
93. Estiu MC, Monte MJ, Rivas L, Moiron M, Gomez-Rodriguez L, Rodriguez-Bravo T, et al. Effect of ursodeoxycholic acid treatment on the altered progesterone and bile acid homeostasis in the mother-placenta-foetus trio during cholestasis of pregnancy. *Br J Clin Pharmacol*. 2015;79(2):316-29.
94. Gabzdyl EM, Schlaeger JM. Intrahepatic cholestasis of pregnancy: a critical clinical review. *J Perinat Neonatal Nurs*. 2015;29(1):41-50.
95. ICP Support. Guideline for managing icp : 2020 ; . Disponible: <https://www.icpsupport.org/protocol.shtml>
96. Ducroq DH, Morton MS, Shadi N, Fraser HL, Strevens C, Morris J, et al. Analysis of serum bile acids by isotope dilution-mass spectrometry to assess the performance of routine total bile acid methods. *Ann Clin Biochem*. 2010;47(Pt 6):535-40.
97. Misra G. Data processing handbook for complex biological data sources 2019.
98. Seger C. Usage and limitations of liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) in clinical routine laboratories. *Wien Med Wochenschr*. 2012;162(21-22):499-504.
99. Pitt JJ. Principles and applications of liquid chromatography-mass spectrometry in clinical biochemistry. *Clin Biochem Rev*. 2009;30(1):19-34.
100. Paul Gates UoB. Gas Chromatography Mass Spectrometry (GC/MS) : 2019 ; . Disponible: <https://www.bristol.ac.uk/chemistry/facilities/nerc-lsmsf/techniques/gcms/>
101. Ye L, Liu S, Wang M, Shao Y, Ding M. High-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry for the analysis of bile acid profiles in serum of women with

- intrahepatic cholestasis of pregnancy. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci.* 2007;860(1):10-7.
102. Castano G, Lucangioli S, Sookoian S, Mesquida M, Lemberg A, Di Scala M, et al. Bile acid profiles by capillary electrophoresis in intrahepatic cholestasis of pregnancy. *Clin Sci (Lond).* 2006;110(4):459-65.
 103. Azer SA, Klaassen CD, Stacey NH. Biochemical assay of serum bile acids: methods and applications. *Br J Biomed Sci.* 1997;54(2):118-32.
 104. Burkard I, von Eckardstein A, Rentsch KM. Differentiated quantification of human bile acids in serum by high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci.* 2005;826(1-2):147-59.
 105. Bailey D, Rokhforooz F, Hoffman B. Analytical evaluation of two enzymatic methods for the measurement of total bile acid in intrahepatic cholestasis of pregnancy. *Clin Biochem.* 2012;45:1099.
 106. Rani K, Garg P, Pundir CS. Discrete analysis of bile acid in serum and bile with 3 alpha-hydroxysteroid dehydrogenase and diaphorase immobilized onto alkylamine glass beads. *Indian J Biochem Biophys.* 2006;43(2):98-104.
 107. Furey A, Moriarty M, Bane V, Kinsella B, Lehane M. Ion suppression; a critical review on causes, evaluation, prevention and applications. *Talanta.* 2013;115:104-22.
 108. Chin C, Zhang ZP, Karnes HT. A study of matrix effects on an LC/MS/MS assay for olanzapine and desmethyl olanzapine. *J Pharm Biomed Anal.* 2004;35(5):1149-67.
 109. Danese E, Salvagno GL, Negrini D, Brocco G, Montagnana M, Lippi G. Analytical evaluation of three enzymatic assays for measuring total bile acids in plasma using a fully-automated clinical chemistry platform. *PLoS One.* 2017;12(6):e0179200.
 110. West HJ. Evaluation of total serum bile acid concentrations for the diagnosis of hepatobiliary disease in cattle. *Res Vet Sci.* 1991;51(2):133-40.
 111. Manna LB, Ovadia C, Lovgren-Sandblom A, Chambers J, Begum S, Seed P, et al. Enzymatic quantification of total serum bile acids as a monitoring strategy for women with intrahepatic cholestasis of pregnancy receiving ursodeoxycholic acid treatment: a cohort study. *BJOG.* 2019;126(13):1633-40.

