

Apport de la spectrométrie de masse dans le dosage des stéroïdes

D. Dufour-Rainfray^{1,2,3}, V. Moal⁴, L. Cloix^{2,5}, E. Mathieu⁴, AS. Gauchez⁶, J. Brossaud⁷, JB. Corcuff⁷, F. Fraissinet⁸, C. Collet¹, F. Boux de Casson⁴, P. Reynier⁴, D. Guilloteau^{1,2,3}, P Emond^{1,2,3},
Groupe de Biologie Spécialisée de la SFMN

¹ Laboratoire de médecine nucléaire, CHRU de Tours.

² Université François Rabelais de Tours.

³ INSERM, U930, Imagerie et cerveau, Tours.

⁴ Département de Biochimie et Génétique, CHRU d'Angers.

⁵ Unité d'Endocrinologie, Nutrition et Diabétologie, Médecine Interne, CHRU de Tours.

⁶ Pôle de Biologie, Plateforme de radioactivité, CHRU de Grenoble.

⁷ Laboratoire Hormonologie-Marqueurs Tumoraux, Service de Médecine Nucléaire, CHU de Bordeaux, Pessac.

⁸ Laboratoire de Biochimie, CHU de Poitiers.

Les innovations récentes de la spectrométrie de masse en tandem couplée à la chromatographie liquide (LC-MS/MS) permettent son utilisation en pratique courante dans les laboratoires d'hormonologie. La LC-MS/MS est particulièrement adaptée aux stéroïdes pour lesquels le dosage par immuno-analyse manque parfois de spécificité et de sensibilité. Si les techniques ELISA sont accessibles à tout laboratoire, les méthodes RIA (*Radio Immuno Assay*) nécessitent l'obtention d'autorisations de l'Autorité de Sûreté Nucléaire (ASN) et l'utilisation de réactifs qui font l'objet de difficultés d'approvisionnement. De plus, les immunodosages ne permettent le dosage que d'un paramètre biologique à la fois. La LC-MS/MS représente ainsi une alternative prometteuse aux immunodosages compte tenu de ses caractères multiparamétriques, sensible et spécifique.

Caractéristiques des stéroïdes

Les hormones stéroïdiennes sont des molécules de faibles masses moléculaires et de structures très proches. Leur synthèse s'effectue à partir du cholestérol au niveau des glandes endocrines corticosurrénales, gonades et tissus périphériques. Elle est réalisée grâce à l'action de déshydrogénases et du cytochrome P450 (Figure 1) [1]. Ces caractéristiques rendent leurs dosages délicats par les techniques RIA ou ELISA ; d'une part en raison de leurs faibles masses moléculaires n'offrant que peu d'épitopes différents, et d'autre part, en raison de l'homologie de structure pouvant être à l'origine de réactions croisées pouvant générer une surestimation des résultats des dosages [2].

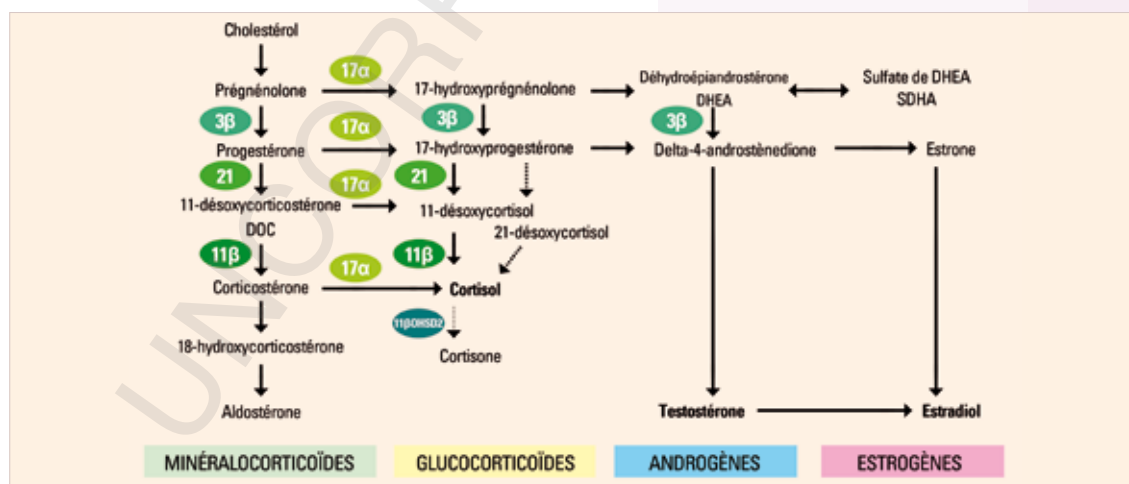


Figure 1 : Biosynthèse des principaux stéroïdes [1].

3β : 3β-hydroxystéroïde-déshydrogénase ; 11β : 11β-hydroxylase ; 11βOHS2 : 11β-hydroxystéroïde-déshydrogénase type 2 ; 17α : 17α-hydroxylase ; 21 : 21-hydroxylase

Ces interférences sont plus fréquentes chez le nouveau-né et le prématuré en raison d'une production stéroïdienne en amont de la 3 β -hydroxystéroïde-déshydrogénase peu active à cette période de la vie [3]. De plus, des stéroïdes de synthèse sont utilisés en thérapeutique et peuvent également être à l'origine de réactions croisées. C'est le cas de la prednisolone utilisée pour ses effets anti-inflammatoires qui peut générer une surestimation des résultats de cortisol avec certains immunodosages [4]. Ainsi, la méthode de dosage choisie devra permettre d'assurer la quantification spécifique de chaque stéroïde afin de ne pas orienter vers des hypothèses diagnostiques erronées.

Dosage des stéroïdes par spectrométrie de masse

Caractéristiques des appareils

Les appareils largement utilisés pour le dosage des stéroïdes en clinique sont des LC-MS qui résultent du couplage d'une chromatographie liquide et d'un spectromètre de masse de type triple quadripôle capable de réaliser des expériences MS2. Tout d'abord, la séparation par chromatographie liquide en amont du spectromètre de masse est une étape critique de l'analyse, puisqu'elle doit séparer efficacement les molécules de même masse (isobares) et pouvant potentiellement donner les mêmes transitions en masse en raison de leur homologie de structure. Cette étape est très souvent réalisée grâce à des colonnes apolaires (C8, C18). Plus récemment, le développement de la spectrométrie de masse en tandem couplée à l'*Ultra High Performance Liquid Chromatography* (UHPLC), utilisant des pressions de travail pouvant atteindre 1 000 bars, permet un gain en sensibilité, en résolution, en rapidité de séparation et limite la consommation de solvants et des volumes de prélèvements nécessaires à l'analyse. Les spectromètres de masse utilisés pour les dosages des stéroïdes sont majoritairement constitués d'une source d'ionisation, d'un triple-quadripôle et d'un détecteur. Les types d'ionisation fréquemment utilisés en hormonologie stéroïdienne sont l'électrospray (ESI), l'ionisation chimique à pression atmosphérique (APCI) et la photoionisation à pression atmosphérique (APPI). Les molécules ionisées sont dirigées vers le premier quadripôle qui sélectionne les ions selon leurs rapports masse sur charge (ions parents, m/z) dans

un domaine temporel défini. Le deuxième quadripôle correspond à une chambre de collision dans laquelle les ions sélectionnés sont fragmentés en ions fils. Puis, les ions issus de cette fragmentation sont, de nouveau, sélectionnés selon leurs rapports m/z par le troisième quadripôle. L'utilisation de ces trois quadripôles simultanément est appelée spectrométrie en tandem. Le suivi de plusieurs transitions ions parents / ions fils constitue le mode d'analyse en *Multiple Reaction Monitoring* (MRM). Ainsi, le filtre moléculaire constitué par le spectromètre de masse apporte la sélectivité au dosage car la transition ion parent – ion fils est spécifique de la molécule à doser. Dans le cas de molécules isobares de structures proches et susceptibles de donner les mêmes transitions, l'étape de séparation chromatographique est critique. Le couplage de la séparation chromatographique et de la spectrométrie de masse apporte la possibilité de réaliser sur un même échantillon, en une seule analyse, le dosage de plusieurs paramètres biologiques de manière sélective. Il est donc possible d'obtenir simultanément des résultats pour différents stéroïdes appelés également profil stéroïdien.

Méthodes de dosages

Aujourd'hui, pour le dosage des stéroïdes en spectrométrie de masse, deux approches sont possibles : l'utilisation de méthodes dites "maison" et l'utilisation de coffrets de dosage prêts à l'emploi (Perkin Elmer® ou Biocrates Life Sciences®). Les coffrets de dosages possèdent un marquage CE et la mise en œuvre de ces méthodes reconnues peut simplifier les démarches d'accréditation selon la norme ISO 15189 car leur accréditation ne nécessite qu'une vérification de méthode. Les méthodes dites "maison" nécessitent, quant à elles, une validation complète tant bibliographique qu'expérimentale. Quelque soit la méthode adoptée, une première étape consiste à ajouter, dans chaque échantillon, des étalons internes afin de quantifier les molécules correspondantes en s'affranchissant des fluctuations de détection du signal (variations d'extraction, d'ionisation et effets matrices notamment). Classiquement, l'étalon interne correspond à la molécule à doser marquée par un ou plusieurs deutériums, carbone-13 ou azote-14. En cela, le comportement de l'étalon interne sera similaire à celui de la molécule à doser, à toutes les étapes du dosage (extraction, séparation chromatographique, ionisation). Des solvants organiques (dichlorométhane, méthyl-tert-butyl-éther ou acétonitrile selon les méthodes)

sont également ajoutés pour réaliser une extraction en phase liquide ainsi qu'une précipitation des protéines. D'autres méthodes mettent en œuvre une extraction en phase solide. Le surnageant est ensuite évaporé et reconstitué dans la phase mobile avant d'être injecté dans le système chromatographique. La séparation chromatographique est réalisée sur une colonne de type C8 ou C18 à l'aide d'un gradient d'élution (eau-méthanol ou acétonitrile selon les méthodes) [5]. Des calibrateurs, des contrôles et les échantillons à doser sont ainsi traités. Les calibrateurs peuvent être obtenus par surcharge d'albumine de sérum bovin "déstéroïdé", avec des concentrations connues de stéroïdes ou sont prêts à l'emploi si la méthode utilise des coffrets de dosage. Les calibrateurs permettent la création de gammes d'étalonnage par injection de quantités croissantes des molécules à doser. Les contrôles peuvent être obtenus à partir de pools plasmatiques ou peuvent être prêts à l'emploi. Ils sont placés en début et fin de série pour permettre de valider les résultats de la série. Pour chaque stéroïde on dispose de deux transitions MS2 au minimum, l'une servant à la quantification, la seconde servant à la confirmation de l'identification de la molécule. La présence de ces deux transitions MS2 au temps de rétention de référence est un pré-requis à la validation de l'intégration des pics chromatographiques pour la quantification.

Quantification

La quantification repose sur des gammes d'étalonnage pour chaque stéroïde qui sont créées à partir des rapports des aires chromatographiques du calibrateur et celle de l'étalon interne en fonction de la concentration en calibrateur. Les concentrations des différents stéroïdes des échantillons à doser sont déterminées à l'aide du rapport des aires des pics d'intérêts et des pics des étalons internes correspondants. Plusieurs

étalons internes sont ajoutés à l'échantillon permettant la quantification simultanée de plusieurs stéroïdes dans le même échantillon. Outre les contrôles de qualité de début et fin de série, certains critères analytiques peuvent être suivis pour s'assurer de la qualité des analyses. Il s'agit notamment des temps de rétention chromatographiques des différents composés ainsi que des aires des étalons internes.

Revue des performances analytiques

Pour illustrer les performances analytiques, les tableaux I et II reprennent les résultats obtenus lors d'une vérification de méthode effectuée pour 4 stéroïdes : testostérone, 17-hydroxyprogestérone, 11-désoxycortisol et delta-4-androstènedione. Les dosages ont été réalisés sur un spectromètre de masse TQS (Waters®) et des kits de dosages MSMS Steroids Kit de PerkinElmer®. Le tableau I montre les résultats de la répétabilité obtenus sur 3 niveaux de contrôles. Les CV obtenus pour le contrôle de niveau faible sont compris entre 8,5 et 12,0 % et entre 2,7 et 5,0 % pour les niveaux médian et haut. Le tableau II montre les résultats de la fidélité intermédiaire obtenus également sur les 3 niveaux de contrôles. Les coefficients de variation (CV) obtenus pour le contrôle de niveau faible sont compris entre 9,9 et 13,2 % et entre 4,6 et 7,3 % pour les niveaux médian et haut. Ces deux évaluations de la fidélité constituent une manifestation de la robustesse de la technique. Cependant, les étapes pré-analytiques sont peu ou pas automatisées induisant une variabilité. Un effort doit également être fait afin de standardiser les méthodes entre laboratoires. Toutefois, le groupe de pairs des utilisateurs de spectrométrie de masse pour le dosage des stéroïdes s'étoffeant, les comparaisons inter-laboratoires les intègrent progressivement, ce qui permet l'évaluation des performances des participants.

Tableau I : Résultats de la répétabilité obtenus sur 3 niveaux de contrôles pour 4 stéroïdes

Analytes	Niveau faible			Niveau médian			Niveau haut		
	Concentration (nmol/l)	Ecart-type (nmol/l)	CV (%)	Concentration (nmol/l)	Ecart-type (nmol/l)	CV (%)	Concentration (nmol/l)	Écart-type (nmol/l)	CV (%)
Testostérone	0,42	0,05	12,0	1,86	0,09	5,0	13,96	0,55	4,0
17-hydroxyprogestérone	1,38	0,12	8,8	5,62	0,20	3,6	45,68	1,24	2,7
11-désoxycortisol	0,80	0,07	8,5	3,98	0,19	4,7	29,71	0,95	3,2
Delta-4-androstènedione	1,01	0,09	9,2	4,42	0,14	3,2	37,00	1,24	3,4

CV : coefficient de variation

Tableau II : Résultats de la fidélité intermédiaire obtenus sur 3 niveaux de contrôles pour 4 stéroïdes

Analytes	Niveau faible			Niveau médian			Niveau haut		
	Concentration (nmol/l)	Ecart-type (nmol/l)	CV (%)	Concentration (nmol/l)	Ecart-type (nmol/l)	CV (%)	Concentration (nmol/l)	Écart-type (nmol/l)	CV (%)
Testostérone	0,44	0,06	13,2	1,96	0,12	5,9	14,09	0,65	4,6
17-hydroxyprogestérone	1,35	0,13	9,9	6,09	0,31	5,2	44,85	2,59	5,8
11-désoxycortisol	0,79	0,08	10,2	3,89	0,21	5,4	29,46	2,15	7,3
Delta-4-androstènedione	1,06	0,11	10,7	4,92	0,34	6,9	36,82	1,71	4,6

CV : coefficient de variation

Avantages et limites de la spectrométrie de masse

Principaux avantages

La LC-MS/MS offre de nombreux avantages pour l'analyse des stéroïdes. Ajoutée à ses performances analytiques, elle permet l'analyse simultanée de plusieurs stéroïdes limitant ainsi le volume d'échantillon nécessaire et le temps d'analyse. A titre de comparaison, le volume de sérum nécessaire à la détermination de stéroïdes par chromatographie couplée à la RIA est de 1 à 2 ml, alors qu'il n'est que de 100 à 500 µl en LC-MS/MS. L'automatisation de l'extraction (extraction en ligne) offre des perspectives intéressantes en termes de simplicité de réalisation et de rapidité d'exécution [6]. Enfin, la préparation des échantillons est simple et peut être adaptée à différentes matrices permettant le dosage des stéroïdes dans des milieux tels que les urines, la salive ou le sang total prélevé sur buvard [7, 8].

Principales limites

Malgré son intérêt indéniable, la LC-MS/MS se heurte à plusieurs limites. Tout d'abord, l'investissement nécessaire à l'acquisition et la maintenance d'un tel appareil reste conséquent. Cet investissement peut être minimisé par la mutualisation entre disciplines (MNIV, biochimie, toxicologie). La durée totale de l'analyse (extraction, analyse, traitement informatique des données) reste peu compétitive en termes de débit face aux immunodosages en méthode directe

ou sans extraction. Certains stéroïdes tels que l'estradiol et l'aldostérone sont difficilement quantifiables par LC-MS/MS en raison d'une ionisation difficile. Les valeurs de référence, établies à l'aide de techniques RIA le plus souvent, doivent être reprises. Leur élaboration est difficile car cela demande de distinguer les sexes, les âges, les stades pubertaires entre autres. Cependant, plusieurs publications proposent des valeurs de référence pour la LC-MS/MS qui peuvent être adaptées dans le laboratoire selon l'équipement détenu [9]. Enfin, la formation du personnel utilisateur est longue et doit être approfondie, et il est souvent préféré que le personnel soit dédié à l'activité de spectrométrie de masse.

Conclusion

La LC-MS/MS appliquée au dosage des stéroïdes apporte d'excellentes performances analytiques. Elle permet d'obtenir des résultats pour différents stéroïdes amenant ainsi à un gain de temps et réduisant le volume d'échantillon. Le couplage LC-MS/MS pourvoit à la spécificité du dosage. Cette spécificité limite les causes d'interférence pouvant orienter vers des hypothèses diagnostiques erronées. Le recours à l'UHPLC permet d'atteindre de bonnes sensibilités et rend la quantification possible pour des stéroïdes en faibles concentrations comme le cortisol salivaire. Devant ces avantages, il est probable que de plus en plus de centres adoptent cette technique et étendent le panel proposé. Cependant, compte-tenu des limites énoncées, d'autres méthodes telles les



immunodosages automatisés gardent leur place pour le dosage de molécules telles que l'estradiol ou le cortisol nécessitant un rendu de résultats quotidiens. C'est donc vraisemblablement par la complémentarité des techniques que nous répondrons le mieux aux questions cliniques posées par le dosage des stéroïdes.

Références

- 1- Dufour-Rainfray et al. Mass spectrometry for steroids assays. *Ann Biol Clin* 2014; in press.
- 2- Wong T et al. Identification of the steroids in neonatal plasma that interfere with 17 alpha-hydroxyprogesterone radioimmunoassays. *Clin Chem*. 1992;38(9):1830-7.
- 3- Greaves RF et al. A guide to understanding the steroid pathway: New insights and diagnostic implications. *Clin Biochem*. 2014 ; in press.
- 4- Monaghan PJ et al. The use of mass spectrometry to improve the diagnosis and the management of the HPA axis. *Rev Endocr Metab Disord*. 2013;14(2):143-57.
- 5- Kushnir MM et al. Liquid chromatography tandem mass spectrometry for analysis of steroids in clinical laboratories. *Clin Biochem*. 2011;44(1):77-88.
- 6- Rauh M et al. Automated, fast and sensitive quantification of 17 alpha-hydroxy-progesterone, androstenedione and testosterone by tandem mass spectrometry with on-line extraction. *Steroids*. 2006;71(6):450-8.
- 7- Turpeinen U et al. Determination of cortisol in serum, saliva and urine. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab*. 2013;27(6):795-801.
- 8- Magnisali P et al. Simultaneous quantification of 17 α -OH progesterone, 11-deoxycortisol, Δ 4-androstenedione, cortisol and cortisone in newborn blood spots using liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*. 2011;879(19):1565-72.
- 9- Kyriakopoulou L et al. A sensitive and rapid mass spectrometric method for the simultaneous measurement of eight steroid hormones and CALIPER pediatric reference intervals. *Clin Biochem*. 2013;46(7-8):642-51. ■