

Dosages des stéroïdes par spectrométrie de masse

Mass spectrometry for steroid assays

Diane Dufour-Rainfray^{1,3,4,a}
Valérie Moal^{5,a}
Lucie Cloix^{2,3}
Elisabeth Mathieu⁵
Anne-Sophie Gauchez⁶
Julie Brossaud⁷
Jean-Benoît Corcuff⁷
François Fraissinet⁸
Christine Collet¹
Florence Boux de Casson⁵
Denis Guilloteau^{1,3,4}
Patrick Emond^{1,3,4}
Pascal Reynier⁵, Groupe de
Biologie Spécialisée de la SFMN :
Arnaud Agin ; Kalyane Bach ; Julie
Brossaud ; Florence Boux de
Casson ; Anne Charrié ; Karim
Chikh ; Jean-Benoît Corcuff ;
Cédric Desbène ; Brigitte Dousset ;
Diane Dufour-Rainfray ; François
Fraissinet ; Anne-Sophie Gauchez ;
Agnès Georges ; David Guenet ;
Isabelle Lacroix ; Pierre-Jean
Lamy ; Monique Leban ;
Anne-Gaëlle Leloupp ;
Catherine Massart ; Damien
Masson ; Valérie Moal ;
Marie-Pierre Moineau ; Marie
Piketty ; Nathalie Reix ; Corinne
Sault ; Marie-Hélène Schlageter ;
Chantal Tse

¹ Laboratoire de médecine nucléaire,
CHRU de Tours, Tours, France

² Unité d'endocrinologie, nutrition et
diabétologie, Médecine interne, CHRU de
Tours, Tours, France

³ Université François Rabelais de Tours,
Tours, France

⁴ Inserm, U930, Imagerie et cerveau,
Tours, France

⁵ Département de biochimie et génétique,
CHRU d'Angers, Angers, France
<vamoal@chu-angers.fr>

⁶ Pôle de biologie, Plateforme de
radioactivité, CHRU de Grenoble,
Grenoble, France

⁷ Laboratoire hormonologie-marqueurs
tumoraux, Service de médecine nucléaire,
CHU de Bordeaux, Pessac, France

⁸ Laboratoire de biochimie, CHU de
Poitiers, France

Tirés à part : V. Moal

^aContribution à part égale.

Résumé. Le dosage des stéroïdes, initialement développé en radio-immunoanalyse, a été facilité par le développement des techniques d'immunoanalyse automatisées. Cependant, certaines hormones demeurent difficilement détectables en raison de leur faible concentration sanguine, de leur homologie de structure ou de la présence de molécules interférentes. La spectrométrie de masse couplée à la chromatographie liquide (LC-MS/MS) peut être considérée comme une alternative aux immunodosages. Cette approche permet le dosage simultané de plusieurs paramètres grâce à sa sélectivité amenée par le détecteur du spectromètre de masse et par la dimension séparative de la chromatographie liquide. De plus, le recours à l'UHPLC (*ultra high performance liquid chromatography*) permet d'améliorer la sélectivité et la sensibilité tout en limitant les volumes d'échantillons nécessaires au dosage. Les coffrets de dosage standardisés viennent progressivement compléter les techniques « maison » développées dans les laboratoires, élargissant ainsi le panel des stéroïdes dosés simultanément sur un même échantillon. Enfin, les méthodes de dosages, incluant une étape d'extraction préalable, permettent l'utilisation d'échantillons biologiques variés. Aussi, plusieurs indications cliniques peuvent tirer bénéfice de cette approche par spectrométrie de masse, notamment lorsque les concentrations des hormones recherchées sont faibles, lorsque plusieurs stéroïdes doivent être identifiés, lorsque le volume de matrice biologique est faible. Cependant, cette technologie nécessite un investissement financier important ainsi que des personnels qualifiés. De plus, certains stéroïdes sont difficiles à quantifier par spectrométrie de masse. C'est donc vraisemblablement par la complémentarité des techniques d'immunoanalyse et de spectrométrie de masse que nous répondrons le mieux aux questions cliniques posées par les stéroïdes.

Mots clés : LC-MS/MS, cortisol, 11-désoxycortisol, 17-hydroxyprogestérone, testostérone

Abstract. Steroid hormone measurement, first developed with radioimmunoassay, is now becoming easier with the use of automated platforms of immunoassay. However, some hormones remain uneasily detectable because of their low blood concentration, their structural homology or the presence of interferences. Liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) can be considered as an alternative to immunoassays. This approach allows the simultaneous determination of several parameters thanks to its selectivity led by the detector mass spectrometer and the separate dimension of chromatography liquid. In addition, recourse to UHPLC (*ultra high performance liquid chromatography*) allows improving selectivity and sensitivity while limiting the samples volumes. The "ready-to-use" kits are now available and added to the "homemade" techniques developed by laboratories, thus giving opportunity for measurement of a wide steroid panel with only one sample. Finally, mass spectrometry methods, including a prior extraction step, allow the use of

varied biological fluids (blood, urine, saliva. . .). Also, several clinical indications could gain from mass spectrometry, especially when hormone levels are low, when several steroids have to be identified, when the sample volume is low. However, this technology represents an important financial investment and in-depth staff training. In addition, some steroids are not easily quantifiable by mass spectrometry. It is likely by immunoassay and mass spectrometry, well-matched technologies, that we could answer the best to clinical questions about steroids.

Key words: LC-MS/MS, cortisol, 11-deoxycortisol, 17-hydroxyprogesterone, testosterone

Les innovations récentes de la spectrométrie de masse en tandem couplée à la chromatographie liquide (LC-MS/MS) permettent l'utilisation de cette technologie en pratique courante dans les laboratoires d'hormonologie. La LC-MS/MS est particulièrement adaptée aux stéroïdes, petites molécules, dont le dosage par immunoanalyse (notamment les techniques automatisées) manque parfois de spécificité et de sensibilité. Pour certains stéroïdes comme le 11-désoxycortisol ou la 17-hydroxyprogesterone, les méthodes RIA (*radioimmunoassay*) sont fréquemment utilisées. Cependant, ces méthodes RIA nécessitent l'obtention d'autorisations (locaux et personnel) de l'Autorité de sûreté nucléaire (ASN), l'utilisation de réactifs qui font l'objet de difficultés d'approvisionnement et ne permettent le dosage que d'un paramètre à la fois. La LC-MS/MS représente ainsi une alternative prometteuse aux immunodosages compte tenu de son caractère multiparamétrique sensible et spécifique.

Après nous être intéressés aux caractéristiques des stéroïdes et à leurs méthodes de dosages par LC-MS/MS, nous évoquerons les principales indications pouvant tirer bénéfice de cette technologie et terminerons en évoquant les avantages mais aussi les limites de cette approche appliquée aux dosages des stéroïdes.

Caractéristiques des stéroïdes

Structure moléculaire

La biosynthèse des hormones stéroïdiennes s'effectue à partir du cholestérol au niveau des glandes endocrines corticosurrénales, gonades et tissus périphériques. Elle est réalisée grâce à l'action d'enzymes appartenant à la famille des déshydrogénases et du cytochrome P450 (*figure 1*). Aussi, les stéroïdes sont des molécules de faibles masses moléculaires qui possèdent des structures très proches. Ces caractéristiques rendent leurs dosages délicats par les techniques d'immunoanalyse (RIA ou Elisa). En effet, d'une part, leurs faibles masses moléculaires n'offrent que peu

d'épitopes différents pouvant être reconnus par les anticorps des immunodosages. D'autre part, en raison de l'homologie de structure, ces anticorps peuvent présenter un défaut de spécificité à l'origine de réactions croisées entre stéroïdes pouvant générer une surestimation des résultats des dosages. C'est le cas de la 17-hydroxyprégnénone et de sa forme sulfatée qui peuvent interférer dans le dosage par immunoanalyse de la 17-hydroxyprogesterone [1]. Ces interférences entre stéroïdes sont plus fréquentes chez le nouveau-né et le prématuré car le métabolisme des stéroïdes diffère, favorisant les hormones stéroïdiennes en amont de la 3 β -hydroxystéroïde-déshydrogénase peu active et leurs formes sulfatées [2]. De plus, des stéroïdes de synthèse, de structures voisines des hormones endogènes, sont utilisés en thérapeutique et peuvent également être à l'origine de réactions croisées. Ainsi, la prednisolone principalement utilisée pour ses effets anti-inflammatoires, peut générer des résultats erronés de cortisol avec certains immunodosages [3].

Formes libres et liées

Dans le sang, les stéroïdes circulent majoritairement sous forme liée à des protéines porteuses spécifiques (SHBG : *sex hormone binding globulin*, CBG : *corticosteroid binding globulin*) ou non spécifiques (albumine), et minoritairement sous forme libre, biologiquement active après liaison à un récepteur spécifique. Les dosages utilisés en routine permettent d'évaluer la fraction totale de chaque stéroïde (formes libre + liée). La fraction libre des stéroïdes est mesurable après dialyse à l'équilibre ou ultrafiltration.

Dans d'autres milieux biologiques tels que les urines ou la salive, certains stéroïdes sont présents, parfois en concentrations très faibles. C'est notamment le cas du cortisol qui peut être dosé dans les urines et la salive après extraction par des solvants tels que le dichlorométhane. Ces dosages permettent d'évaluer la forme libre de l'hormone par des méthodes simples et sur des échantillons de recueils aisés.

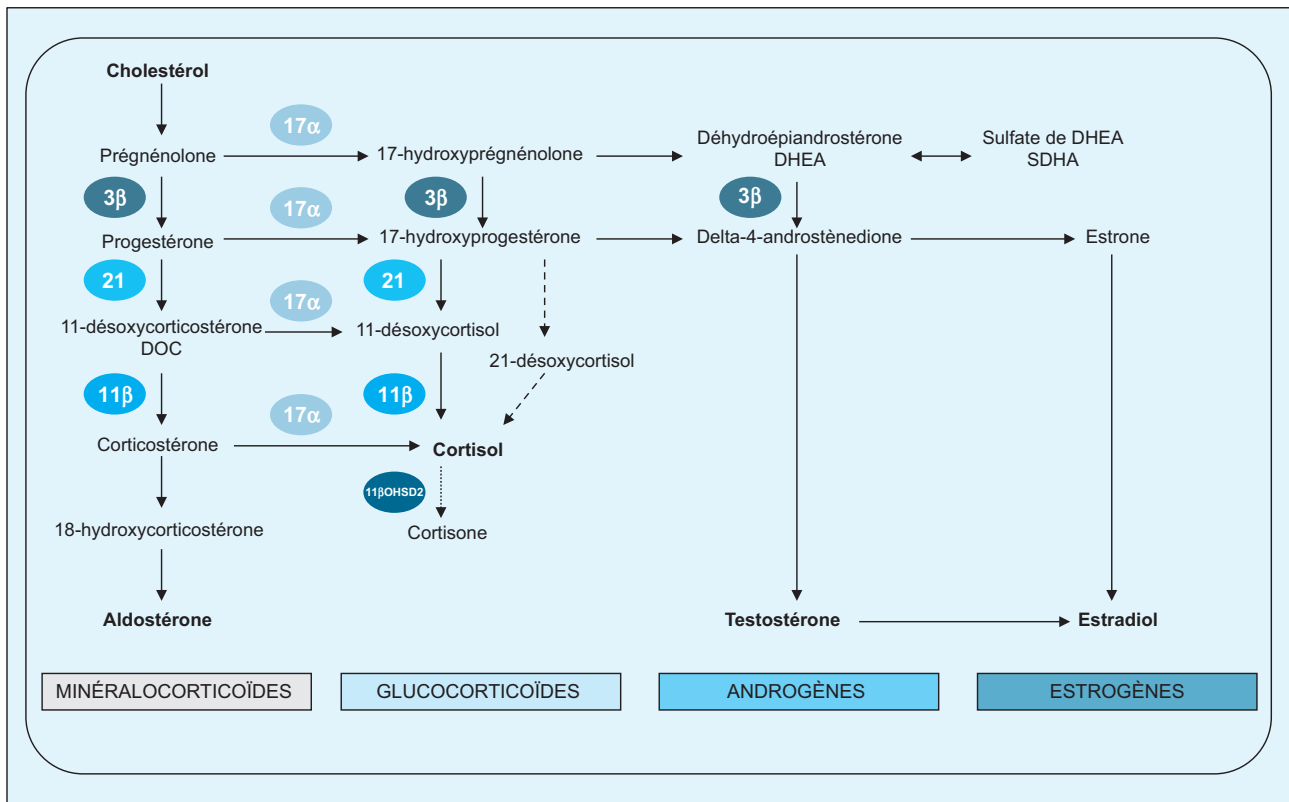


Figure 1. Biosynthèse des principaux stéroïdes. 3β : 3β-hydroxystéroïde-déshydrogénase ; 11β : 11β-hydroxylase ; 11βOHS2 : 11β-hydroxystéroïde-déshydrogénase type 2 ; 17α : 17α-hydroxylase ; 21 : 21-hydroxylase.

Historique des dosages des stéroïdes

C'est avec la naissance de la radio-immunoanalyse que se sont développés les dosages des stéroïdes [4]. Ces petites molécules de structures proches et de concentrations sanguines faibles étaient en effet difficiles à identifier et quantifier. La production d'anticorps monoclonaux, valant un prix Nobel en 1984 à ses découvreurs Köhler, Milstein et Jerne, a permis d'améliorer la reconnaissance et l'identification des molécules. Les techniques d'immunoanalyse se sont automatisées notamment pour l'estradiol, la testostérone ou le cortisol, apportant un gain de temps et de reproductibilité pour les dosages. Cependant, il persistait des interférences entre certains stéroïdes comme le 11-désoxycortisol et le cortisol, et avec certaines formes telles que les formes sulfatées. Pour pallier ce manque de sélectivité, des méthodes combinant une séparation chromatographique et une quantification par radio-immunoanalyse ont été décrites [5]. Le principe consiste à extraire les stéroïdes du sérum puis à les séparer par des solvants de polarité croissante en chromatographie d'absorption utilisant la célite comme phase solide. Ces méthodes combinées ont amélioré la spécificité des immunodosages mais nécessitent l'utilisation de traceurs tritiés, actuellement difficiles à obtenir, pour les calculs de

rendements d'extraction et l'identification des pics. De plus, ces méthodes requièrent un volume important d'échantillon (supérieur à 1 mL) ce qui peut être une difficulté, surtout en pédiatrie. Le développement de la spectrométrie de masse en tandem couplée à l'UHPLC (*ultra high performance liquid chromatography*) permet de limiter les volumes d'échantillons nécessaires, tout en améliorant la sensibilité et la résolution chromatographique. Cette technologie couplée à une détection par spectrométrie de masse s'est développée notamment pour des applications en toxicologie, proposant une nouvelle orientation dans le dosage des stéroïdes.

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/MS. Ces appareils résultent du couplage d'un équipement en chromatographie liquide d'une part, et d'un spectromètre de masse en tandem de type triple quadripôle capable de détecter des ions fils issus de la fragmentation d'ions parents (expérience MS/MS) d'autre

part. Par cette sélectivité, la technologie LC-MS/MS assure une bonne spécificité analytique.

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 fragments. Cette étape est très souvent réalisée grâce à des colonnes apolaires (C8, C18) avec de plus en plus le recours à l'UHPLC (pressions de travail pouvant atteindre 1 000 bars) ce qui permet un gain en sensibilité, en résolution, en rapidité de séparation et en consommation de solvants. Concernant les spectromètres de masse utilisés pour les dosages des stéroïdes, ils sont majoritairement constitués d'une source d'ionisation, d'un triple-quadrupôle 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 photo-ionisation à pression atmosphérique (APPI). Les molécules ainsi ionisées sont dirigées vers le premier quadrupôle qui sélectionne les ions selon leurs rapports masse sur charge (ions parents, m/z). Le deuxième quadrupôle correspond à une chambre de collision dans laquelle les ions sélectionnés sont fragmentés en ions fils. Puis, les ions issus de la fragmentation sont de nouveau sélectionnés selon leurs rapports masse sur charge par le troisième quadrupôle. L'utilisation de ces trois quadrupôles est appelée spectrométrie en tandem. Les ions fils ainsi triés sont orientés vers le détecteur. Le suivi de plusieurs transitions ions parents/ions fils constitue le mode d'analyse en MRM (*multiple reaction monitoring*). Des logiciels (tels que Analyst® ou MassLynx®) permettent de traiter les données obtenues en mode MRM (figure 2).

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, une séparation chromatographique est indispensable. 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. De plus, le dosage des stéroïdes impose de choisir un appareil suffisamment sensible, la sensibilité du spectromètre étant en partie dépendante de sa capacité d'acquisition (nombre de scans acquis pendant un pic chromatographique), du nombre de molécules fragmentées et donc du nombre d'ions analysés.

Méthodes de dosages

Aujourd'hui, pour le dosage des stéroïdes en spectrométrie de masse, deux approches sont possibles : les méthodes dites « maison » et l'utilisation de coffrets de

dosage prêts à l'emploi (tels que ceux proposés par Perkin Elmer® ou Biocrates Life Sciences®). Les coffrets de dosages prêts à l'emploi possèdent un marquage CE. La mise en œuvre de ces méthodes reconnues peut simplifier les démarches d'accréditation selon la norme ISO 15189 car leurs validations correspondent à une vérification sur site des performances annoncées par le fabricant pour le couple équipement-réactif. Les méthodes dites « maison » nécessitent, quant à elles, la réalisation de vérifications bibliographiques et expérimentales plus complètes. Quelle que soit la méthode adoptée pour le dosage des stéroïdes, une première étape consiste à ajouter, dans chaque échantillon, des étalons internes qui permettent de quantifier les molécules correspondantes contenues dans l'échantillon en s'affranchissant des fluctuations de détection du signal (dues aux variations d'ionisation et aux 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 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 encore mettent en œuvre une extraction en phase solide. Le surnageant est ensuite récupéré, évaporé et reconstitué dans la phase mobile avant d'être injecté dans le système chromatographique. La séparation chromatographique est réalisée sur une colonne de silice de type C8 ou C18 à l'aide d'un gradient d'éluant (eau-méthanol ou acétonitrile selon les méthodes). Dans le spectromètre de masse, les molécules sont ionisées (en mode positif ou négatif selon les molécules et la méthode) [6]. Des calibrateurs, des contrôles et les échantillons à doser sont ainsi traités. Les calibrateurs peuvent être obtenus par surcharge d'albumine de sérum bovin (BSA) déstéroïdée, 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, quant à eux, 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.

Quantification et évaluation des performances analytiques

La quantification repose sur l'établissement de gammes d'étalonnage pour chaque stéroïde. Ces gammes d'étalonnage sont créées en rapportant, pour chaque point, l'aire du calibrateur à celle de l'étalon interne. Puis,

les concentrations des différents stéroïdes contenus dans les échantillons à doser sont calculées de la même manière à l'aide du rapport des aires des pics d'intérêts et des pics correspondants des étalons internes. Plusieurs étalons internes peuvent être ajoutés à l'échantillon permettant la quantification simultanée de plusieurs stéroïdes dans le même échantillon, au cours de la même durée d'analyse. 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 les aires des étalons internes. Pour illustrer les performances analytiques, le *tableau 1* compare les fidélités intermédiaires obtenues sur des pools, par des méthodes de spectrométrie de masse et des méthodes d'immunoanalyse pour deux paramètres : le 11-désoxycortisol sanguin et le cortisol libre urinaire (CLU). Pour le 11-désoxycortisol,

les dosages ont été effectués en spectrométrie de masse (méthode utilisant des coffrets prêts à l'emploi), en RIA directe et en RIA après séparation chromatographique. Pour le cortisol urinaire, les dosages ont été effectués en spectrométrie de masse (méthode dite « maison ») et en immunoanalyse automatisée après extraction. Les résultats montrent que les coefficients de variation (CV) obtenus pour les deux paramètres sont améliorés en LC-MS/MS par rapport à l'immunoanalyse. Cependant, les étapes préalables à l'injection dans le système chromatographique sont peu ou pas automatisées, induisant une variabilité à maîtriser. De plus, un effort doit également être fait afin de standardiser les techniques entre laboratoires. Enfin, le groupe de pairs des utilisateurs de spectrométrie de masse pour le dosage des stéroïdes s'étoffant, les comparaisons inter-laboratoires les intègrent progressivement ce qui permet l'évaluation des performances des participants.

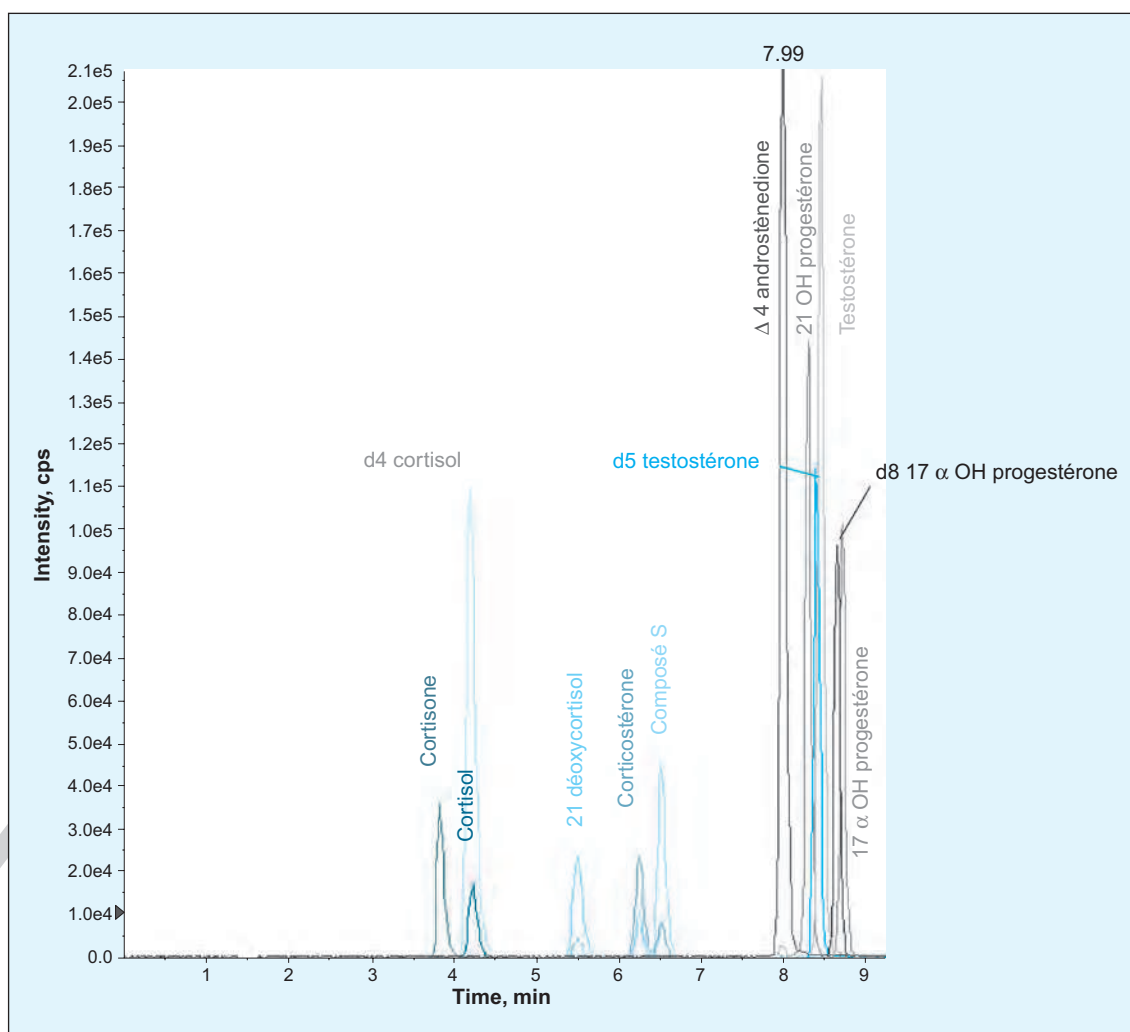


Figure 2. Chromatogramme (9 stéroïdes) obtenu par LC-MS/MS à partir d'albumine de sérum bovin (BSA) surchargé à 10 ng/mL.

Tableau 1. Comparaison des fidélités intermédiaires obtenues par des méthodes de spectrométrie de masse et des méthodes d'immunoanalyse pour le 11-désoxycortisol sanguin et le cortisol libre urinaire.

Fidélité intermédiaire	11-désoxycortisol sanguin						Cortisol libre urinaire			
	Méthode LC-MS/MS (Xevo TQ-S Waters® et kit PerkinElmer®)		Méthode RIA directe (Diasource®)		Méthode RIA après séparation chromatographique (Diasource®)		Méthode LC-MS/MS (API3000 ABSCIEX® et méthode « maison »)		Méthode par immunoanalyse après extraction (Immulite2000® Siemens)	
Niveau de concentrations	Pool 1 Faible	Pool 2 Fort	Pool 3 Faible	Pool 4 Fort	Pool 5 Faible	Pool 6 Fort	Pool 7 Faible	Pool 8 Fort	Pool 9 Faible	Pool 10 Fort
Moyenne (nmol/L)	4,5	25,6	5,3	23,9	3,95	18,0	152,2	361,1	172,2	1071,6
Nombre de passages	49	49	55	55	38	40	38	38	92	76
Ecart-type (nmol/L)	0,3	2,3	0,7	3,0	1,0	2,5	7,2	15,5	18,2	94,1
CV (%)	7,3	9,0	14,1	12,5	24,4	14,2	4,7	4,3	10,6	8,8

CV : coefficient de variation ; RIA : radio-immunologie ; LC-MS/MS : spectrométrie de masse couplée à la chromatographie liquide.

Principales indications cliniques tirant bénéfice de la spectrométrie de masse

Hyperplasies congénitales des surrénales

L'hyperplasie congénitale des surrénales est due le plus souvent à un déficit en 21-hydroxylase et plus rarement à un déficit en 11-hydroxylase.

La diminution ou l'absence de synthèse des stéroïdes est fonction de l'activité enzymatique résiduelle. La synthèse des glucocorticoïdes et des minéralocorticoïdes est affectée dans les formes avec perte de sel, tandis que seule la synthèse des glucocorticoïdes est perturbée dans les formes virilisantes pures. L'hypersécrétion d'ACTH due à la levée du rétrocontrôle du cortisol provoque en outre une accumulation des stéroïdes en amont du déficit (17-hydroxyprogestérone pour le déficit en 21-hydroxylase et 11-désoxycortisol pour le déficit en 11 β -hydroxylase) ainsi qu'une augmentation des stéroïdes androgéniques (delta-4-androstènedione et testostérone) dont la synthèse ne nécessite pas ces hydroxylases.

L'hyperproduction de testostérone, se manifestant par une ambiguïté sexuelle chez la petite fille à la naissance ou une pseudo-puberté précoce chez les jeunes garçons, fait suspecter une hyperplasie congénitale des surrénales. Le dépistage néonatal systématique de la 17-hydroxyprogestérone sur buvard permet d'éviter le décès des nouveau-nés par perte de sel. La spectrométrie de masse peut aider au diagnostic en permettant le dosage simultané des précurseurs et des produits des enzymes (notamment le cortisol, 11-désoxycortisol, 21-désoxycortisol, 17-hydroxyprogestérone et désoxycorticostérone) à partir de 100 à 500 μ L de sang [7].

Autres insuffisances surrénales

L'insuffisance surrénale peut aussi être secondaire à un défaut d'action de la commande hypophysaire. Les insuffisances surrénales primitives, qu'elles soient secondaires à une atteinte auto-immune, métastatique lymphomateuse ou infectieuse (tuberculose, VIH), occasionnent un déficit à la fois en glucocorticoïdes, minéralocorticoïdes et précurseurs androgéniques. L'atteinte centrale entraîne quant à elle un déficit en glucocorticoïdes tout en respectant la fonction minéralocorticoïde. Une cortisolémie basse ou ne s'élevant pas suffisamment après un test de stimulation (Test au Synacthène® le plus souvent) permet de poser le diagnostic d'insuffisance surrénale. Dans ces indications, la spectrométrie de masse peut permettre un dosage spécifique de chaque stéroïde.

Syndromes de Cushing

Les syndromes de Cushing se caractérisent par une sécrétion excessive de cortisol par les corticosurrénales. L'hypersécrétion peut être ACTH dépendante (d'origine hypophysaire dans la maladie de Cushing ou production tumorale ectopique d'ACTH par exemple) ou ACTH indépendante (adénome surrénalien bénin, tumeur maligne surrénalienne appelée corticosurréalome, hyperplasie macronodulaire des surrénales ou administration prolongée de glucocorticoïdes par exemple). Alors que les adénomes surrénaux entraînent une hypersécrétion isolée de cortisol, les corticosurréalomes sécrètent à la fois des glucocorticoïdes, des minéralocorticoïdes, des stéroïdes sexuels et leurs précurseurs. Le dosage du cortisol urinaire (urines de 24h), sanguin (à minuit ou après test de freinage à la dexaméthasone) et salivaire (à

minuit) permettent le diagnostic du syndrome de Cushing [8]. Les immunodosages fréquemment utilisés pour le dosage du CLU présentent des réactions croisées avec la cortisone et la prednisolone malgré une extraction au préalable par des solvants tels que le dichlorométhane. Les méthodes LC-MS/MS développées pour la mesure du CLU présentent une grande spécificité [9,10]. Cette spécificité permet de ne pas craindre les réactions croisées avec des composés tels que la prednisone (syndrome de Cushing par prise occulte) ou avec des composés tels que le 11-désoxycortisol (traitement des syndromes de Cushing par métyrapone). Le dosage du cortisol salivaire à minuit est une alternative intéressante au CLU (simplicité du recueil). Bien corrélé au cortisol libre sanguin, sa mesure nécessite cependant un équipement LC-MS/MS permettant d'atteindre une limite de quantification suffisamment basse recherchée en raison des concentrations salivaires faibles.

Hypertensions d'origines endocriniennes

L'hyperaldostéronisme primaire peut être causé par un adénome de Conn (bénin), une hyperplasie bilatérale des surrénales ou un corticosurrénaome. Dans le cadre de l'hyperaldostéronisme primaire, une mesure correcte de l'aldostérone sanguine ou urinaire est indispensable. Les conditions optimales de prélèvement exigent une natriurèse suffisante (témoignant d'une volémie normale), une kaliémie corrigée et l'arrêt préalable de certaines molécules antihypertensives pouvant fausser les dosages. L'aldostérone est classiquement mesurée par méthode RIA et quelques méthodes d'immunoanalyse utilisant des marqueurs non radioactifs sont actuellement disponibles. Lors de la mise au point de méthodes de dosages de l'aldostérone par LC-MS/MS le biologiste est confronté à deux difficultés. D'une part, l'aldostérone est une hormone qui se trouve en très faible concentration dans le sang et d'autre part, c'est une molécule qui s'ionise difficilement. Plusieurs méthodes ont été décrites permettant d'atteindre une limite de quantification suffisamment basse pour rendre ce dosage utilisable en pratique clinique [11].

La LC-MS/MS est également intéressante dans l'exploration du déficit en 11 β -hydroxystéroïde-déshydrogénase de type 2, enzyme catalysant l'oxydation du cortisol en cortisone, responsable d'hypertension artérielle [12]. Le diagnostic du syndrome d'excès apparent en minéralocorticoïdes nécessite le dosage dans le sang du cortisol couplé à celui de la cortisone, et dans les urines, le dosage des métabolites urinaires hydrogénés du cortisol (tétrahydrocortisol ou THF et allo-THF) et de la cortisone (tétrahydrocortisone ou THE). La mise au point de la technique de dosage de ces métabolites est un challenge car de nombreux métabolites de structures

proches sont présents dans les urines. Aussi, la méthode chromatographique devra être suffisamment résolutive pour séparer efficacement ces métabolites.

Hypo- et hypergonadismes

La testostérone est l'androgène majeur chez l'homme, en revanche, sa concentration est faible chez la femme et l'enfant. Il est donc intéressant d'avoir une technique possédant une limite de quantification suffisamment basse pour détecter une sécrétion anormale chez ces derniers [13]. Il en est de même pour le diagnostic ou l'adaptation thérapeutique de l'hypogonadisme ou du retard pubertaire chez l'homme. Plusieurs études ont rapporté un manque d'exactitude dans la mesure des concentrations basses de testostérone ainsi qu'un défaut de standardisation des différents immunodosages [14, 15]. Des méthodes LC-MS/MS se sont développées ces dernières années apportant un gain en sensibilité et en spécificité à ce dosage [16-18]. L'exploration des hyperandrogénies chez la femme peut nécessiter, en plus de la testostérone, le dosage de la delta-4-androstènedione et de la DHEA pour orienter vers une étiologie surrénalienne plutôt qu'ovarienne. Aussi, un profil obtenu en une seule analyse, permettant le dosage simultané de ces trois stéroïdes, est pertinent dans ces indications.

Chez la femme, l'estradiol est responsable du développement et du maintien des caractéristiques féminines et de la fonction de reproduction. Par analogie avec la testostérone, la sensibilité du dosage doit être suffisante pour mettre en évidence une puberté précoce, un retard pubertaire ou explorer une aménorrhée. Les immunodosages automatisés peuvent être pris en défaut sur les valeurs basses d'estradiol [19, 20]. Cependant, comme l'aldostérone, l'estradiol s'ionise difficilement en spectrométrie de masse (utilisation du mode négatif) et une dérivation (dansylation) est parfois nécessaire selon la méthode utilisée [11].

Avantages et limites de la spectrométrie de masse

Principaux avantages

La chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse offre de nombreux avantages pour l'analyse des stéroïdes. Outre les qualités analytiques précédemment illustrées, la spectrométrie de masse permet l'analyse simultanée de plusieurs stéroïdes limitant ainsi le volume d'échantillon nécessaire et le temps d'analyse. À 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 μ L en LC-MS/MS suivant la méthode adoptée. De plus, l'analyse de plusieurs stéroïdes par chromatographie

couplée à la RIA nécessite une extraction suivie d'autant de RIA que de stéroïdes recherchés, tandis que la LC-MS/MS analyse simultanément les molécules. L'automatisation de l'extraction (extraction en ligne) offre des perspectives intéressantes en termes de simplicité de réalisation et de rapidité d'exécution [21]. 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 [22, 23].

Principales limites

Malgré son intérêt indéniable, la spectrométrie de masse se heurte à plusieurs limites. Tout d'abord, l'investissement nécessaire à l'acquisition et la maintenance d'un tel appareil restent conséquent. Cet investissement peut être minimisé par la mutualisation entre disciplines (analyse des acides aminés, de l'homocystéine, screening toxicologique...). Cette mutualisation requiert un travail par plage horaire qui doit prendre en compte la notion d'urgence présentée par certaines situations cliniques. 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 sans extraction. Certains stéroïdes sont difficilement quantifiables par LC-MS/MS. C'est le cas de l'estradiol et de l'aldostérone qui s'ionisent difficilement et dont les concentrations physiologiques peuvent être faibles dans certaines conditions cliniques. De plus, l'analyse simultanée de plusieurs stéroïdes nécessite des compromis en ce qui concerne le choix des solvants d'extraction, de la méthode chromatographique et du mode d'ionisation. 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 etc. Cependant, plusieurs publications proposent des valeurs de référence, élaborées à l'aide de techniques de LC-MS/MS, qui peuvent être adaptées dans le laboratoire selon l'équipement détenu et la méthode utilisée [24]. 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 spectrométrie de masse appliquée au dosage des stéroïdes apportent d'excellentes performances analytiques. Elle est adaptée aux dosages de stéroïdes nécessitant de bonnes spécificités et sensibilités tels que le 11-désoxycortisol ou la testostérone. De plus, il est possible d'obtenir en une seule analyse un ensemble de résultats pour différents stéroïdes, ou profil stéroïdien, permettant

ainsi un gain de temps et réduisant le volume d'échantillon nécessaire ce qui est intéressant en endocrinologie pédiatrique. Il est probable que de plus en plus de centres adoptent cette technique et étendent le panel proposé. Cependant, compte tenu des limites énoncées, les immunodosages automatisés gardent leur place pour le dosage de molécules nécessitant un rendu de résultats quotidiens, dont les spécificités et sensibilités sont suffisantes et pour lesquelles les demandes quotidiennes sont nombreuses comme ce peut être le cas de l'estradiol ou du cortisol. C'est donc vraisemblablement par la complémentarité des techniques que nous répondrons le mieux aux questions cliniques posées par le dosage des stéroïdes.

Liens d'intérêts : Les auteurs déclarent ne pas avoir de lien d'intérêt en rapport avec cet article.

Références

1. Wong T, Shackleton CH, Covey TR, Ellis G. Identification of the steroids in neonatal plasma that interfere with 17 alpha-hydroxyprogesterone radioimmunoassays. *Clin Chem* 1992;38: 1830-7.
2. Greaves RF, Jevalikar G, Hewitt JK, Zacharin MR. A guide to understanding the steroid pathway: New insights and diagnostic implications. *Clin Biochem* 2014;47: 5-15.
3. Monaghan PJ, Keevil BG, Trainer PJ. The use of mass spectrometry to improve the diagnosis and the management of the HPA axis. *Rev Endocr Metab Disord* 2013; 14: 143-57.
4. Forest MG. Use of highly specific antibodies against 17alpha-OH-progesterone in a simplified nonchromatographic RIA and in the simultaneous determination of four sex hormones in human plasma. *Horm Res* 1976; 7: 260-73.
5. Cochran RC, Ewing LL. Celite column chromatography followed by reversed-phase high-performance liquid chromatography: a simple, two-step method for separating 14 testicular steroids. *J Chromatogr* 1979; 173: 175-81.
6. Kushnir MM, Rockwood AL, Roberts WL, Yue B, Bergquist J, Meikle AW. Liquid chromatography tandem mass spectrometry for analysis of steroids in clinical laboratories. *Clin Biochem* 2011;44: 77-88.
7. Carvalho VM, Nakamura OH, Vieira JG. Simultaneous quantitation of seven endogenous C-21 adrenal steroids by liquid chromatography tandem mass spectrometry in human serum. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 2008; 872: 154-61.
8. Erickson D, Singh RJ, Sathananthan A, Vella A, Bryant SC. Late-night salivary cortisol for diagnosis of Cushing's syndrome by liquid chromatography/tandem mass spectrometry assay. *Clin Endocrinol* 2012; 76: 467-72.
9. Kushnir MM, Rockwood AL, Nelson GJ, Terry AH, Meikle AW. Liquid chromatography-tandem mass spectrometry analysis of urinary free cortisol. *Clin Chem* 2003; 49: 965-7.
10. Taylor RL, Machacek D, Singh RJ. Validation of a high-throughput liquid chromatography-tandem mass spectrometry method for urinary cortisol and cortisone. *Clin Chem* 2002; 48: 1511-9.

11. Keevil BG. Novel liquid chromatography tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) methods for measuring steroids. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* 2013 ; 27 : 663-74.
12. Vantighem MC, Marcelli-Tourvieille S, Defrance F, Wemeau JL. 11beta-hydroxysteroid dehydrogenases. Recent advances. *Ann Endocrinol* 2007 ; 68 : 349-56.
13. Fanelli F, Gambineri A, Mezzullo M, Vicennati V, Pelusi C, Pasquali R, et al. Revisiting hyper- and hypo-androgenism by tandem mass spectrometry. *Rev Endocr Metab Disord* 2013 ; 14 : 185-205.
14. Ketha H, Kaur S, Grebe SK, Singh RJ. Clinical applications of LC-MS sex steroid assays : evolution of methodologies in the 21st century. *Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes* 2014 ; 21 : 217-26.
15. Taieb J, Mathian B, Millot F, Patricot MC, Mathieu E, Queyrel N, et al. Testosterone measured by 10 immunoassays and by isotope-dilution gas chromatography-mass spectrometry in sera from 116 men, women, and children. *Clin Chem* 2003 ; 49 : 1381-95.
16. Moal V, Mathieu E, Reynier P, Malthiery Y, Gallois Y. Low serum testosterone assayed by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. Comparison with five immunoassay techniques. *Clin Chim Acta* 2007 ; 386 : 12-9.
17. Thienpont LM, Van Uytvanghe K, Blincko S, Ramsay CS, Xie H, Doss RC, et al. State-of-the-art of serum testosterone measurement by isotope dilution-liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Clin Chem* 2008 ; 54 : 1290-7.
18. Botelho JC, Shacklady C, Cooper HC, Tai SS, Van Uytvanghe K, Thienpont LM, et al. Isotope-dilution liquid chromatography-tandem mass spectrometry candidate reference method for total testosterone in human serum. *Clin Chem* 2013 ; 59 : 372-80.
19. Vesper HW, Botelho JC, Vidal ML, Rahmani Y, Thienpont LM, Caudill SP. High variability in serum estradiol measurements in men and women. *Steroids* 2014 ; 82 : 7-13.
20. Yang DT, Owen WE, Ramsay CS, Xie H, Roberts WL. Performance characteristics of eight estradiol immunoassays. *Am J Clin Pathol* 2004 ; 122 : 332-7.
21. Rauh M, Gröschl M, Rascher W, Dörr HG. Automated, fast and sensitive quantification of 17 alpha-hydroxy-progesterone, androstenedione and testosterone by tandem mass spectrometry with on-line extraction. *Steroids* 2006 ; 71 : 450-8.
22. Turpeinen U, Hämäläinen E. Determination of cortisol in serum, saliva and urine. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* 2013 ; 27 : 795-801.
23. Magnisali P, Chalioti MB, Livadara T, Mataragas M, Paliatsiou S, Malamitsi-Puchner A, 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 : 1565-72.
24. Kyriakopoulou L, Yazdanpanah M, Colantonio DA, Chan MK, Daly CH, Adeli K. A sensitive and rapid mass spectrometric method for the simultaneous measurement of eight steroid hormones and CALIPER pediatric reference intervals. *Clin Biochem* 2013 ; 46 : 642-51.