

ATELIER

Le dosage des stéroïdes par spectrométrie de masse en tandem : une avancée majeure pour le diagnostic des endocrinopathies

Najiba Lahlou¹, Lionel Groussin²

Service d'Hormonologie - Métabolisme¹ et Service d'Endocrinologie², Hôpital Cochin
Hôpitaux Universitaires Paris Centre
Université Paris Descartes - Paris

Mots clés : chromatographie liquide, urine, sérum, salive, cheveu

La spectrométrie de masse en tandem (Mass Spectrometer / Mass Spectrometer) comporte une chromatographie liquide à haute performance (LC), puis une sélection séquentielle des molécules ionisées par un premier spectromètre quadripôle, puis une sélection des ions fils produits dans la cellule de collision par un deuxième quadripôle. Cette technologie s'installe maintenant dans les laboratoires de biologie médicale sous le sigle LC-MS/MS. Les hormones stéroïdes en sont une cible privilégiée car les immuno-essais directs sur automate sont toujours affectés d'un certain degré de réaction croisée entre molécules de formes voisines, induisant une majoration de leurs taux réels.

Les hormones stéroïdes

Ce sont des molécules formées essentiellement dans les gonades et les surrénales à partir du cholestérol et constituées uniquement de carbone, hydrogène et oxygène. Elles ne sont pas naturellement antigéniques. La première étape est la conversion du cholestérol en prégnénolone dans les mitochondries, les étapes suivantes ont lieu dans les microsomes. Ce sont de petites molécules classées en trois familles selon le nombre d'atomes de carbone (Figure 1) :

- les stéroïdes œstrogéniques à 18 atomes de carbone, dont le plus léger, l'estrone, a une masse de 270 daltons ;

- les stéroïdes androgéniques à 19 atomes de carbone, dont les plus lourds, déshydroépiandrostérone et testostérone, ont une masse de 288 daltons ;
- les minéralo- et gluco-corticoïdes et leurs précurseurs, à 21 atomes de carbone, d'origine exclusivement surrénalienne, dont le plus lourd, le cortisol, a une masse de 362 daltons.

De nombreux stéroïdes synthétiques sont aussi utilisés en thérapeutique, ou comme agents dopants, certains pouvant comporter un atome de fluor comme la fludrocortisone. Comme on le verra plus loin, la faible masse des stéroïdes les exclut des dosages immunologiques dits « sandwich », mais les rend tout à fait appropriés aux dosages par spectrométrie de masse.

Dosage des stéroïdes par immuno-essai

Les immuno-essais reposent sur la reconnaissance d'un épitope donné d'une chaîne peptidique par un anticorps. Dans les années 1950, Solomon Berson et Rosalyn Yalow (Prix Nobel 1977), étudiant la liaison de l'insuline marquée à l'iode 131 par des sérums de diabétiques traités par l'insuline bovine, observèrent qu'un volume donné de sérum fixait une quantité donnée de radioactivité et que cette radioactivité pouvait être déplacée par de l'insuline froide. Il existait une relation inverse, mais non linéaire, entre la quantité de radioactivité liée à l'antisérum

et la quantité d'insuline froide ajoutée au milieu d'incubation. L'immuno-essai par compétition était né [1].

Immuno-essai par compétition

C'est un système de dosage dans lequel l'hormone à mesurer est mise en présence d'un anticorps ou d'un antisérum en quantité limitée. L'hormone entre en compétition avec un traceur marqué, soit par un composé radioactif, luminescent ou fluorescent, soit par une enzyme, pour se fixer sur l'un des sites disponibles de l'anticorps (Figure 2).

Longtemps, on a exclusivement utilisé, pour les immuno-essais, des antisérums polyclonaux obtenus par immunisation d'un animal contre l'antigène hormonal préparé, c'est-à-dire l'hormone elle-même, s'il s'agit d'une protéine, ou un complexe formé d'une protéine comme par exemple l'albumine d'une autre espèce animale, et d'une hormone si celle-ci n'est pas naturellement antigénique comme c'est le cas des stéroïdes et des hormones thyroïdiennes. Mais cette méthode présente deux inconvénients majeurs. D'une part, l'antisérum animal obtenu est un mélange d'anticorps d'affinités et de spécificités différentes provenant de plusieurs clones de cellules immunitaires. D'autre part, un animal ne peut fournir qu'une quantité limitée d'antisérum, même s'il s'agit d'un gros animal comme un mouton ou une chèvre. C'est la

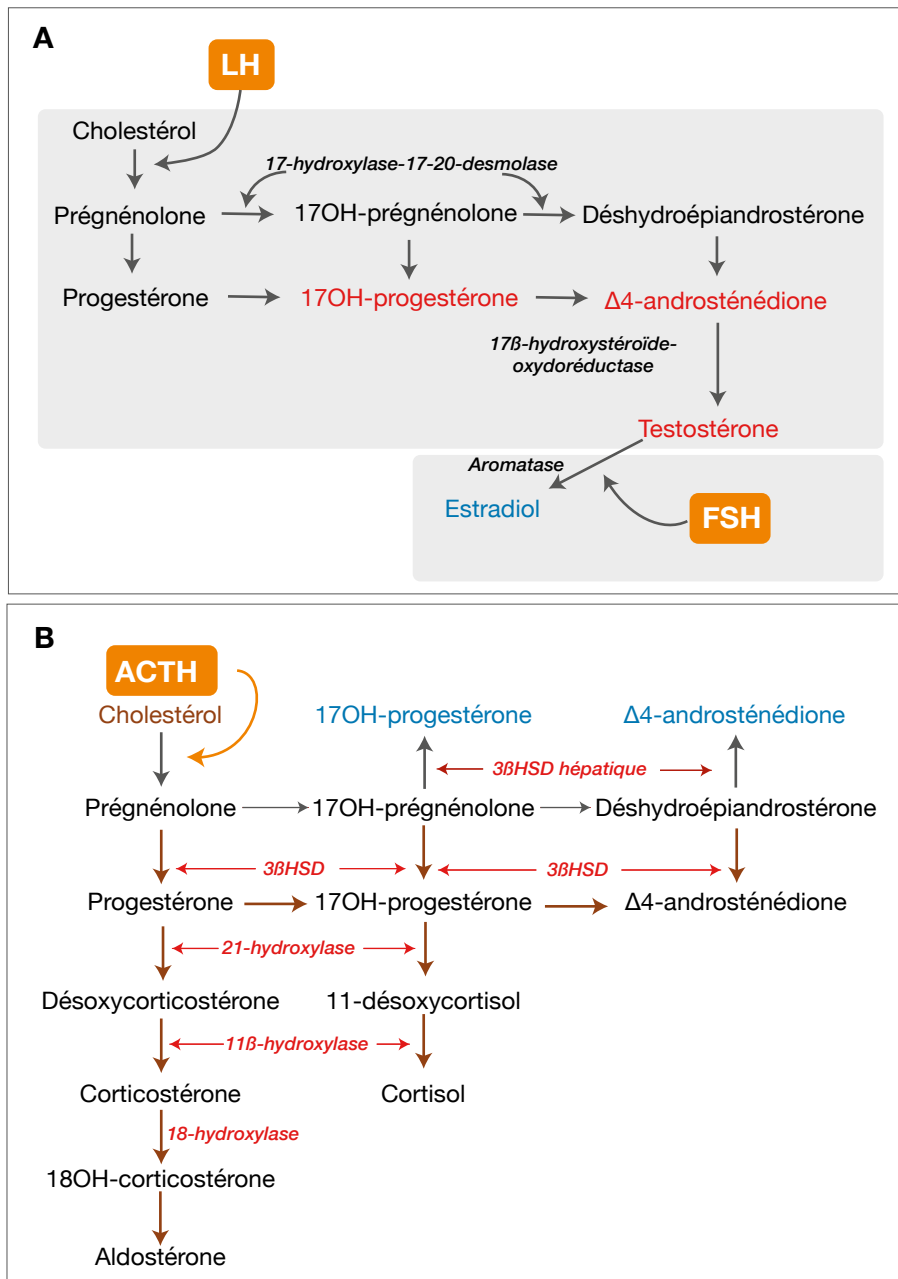


Figure 1. Schéma des stéroïdogénèses gonadiques (A) et surrénaliennes (B), montrant les différentes voies de biosynthèse avec mention des enzymes impliquées à chaque étape. 3 β HSD = 3 β -hydroxy-stéroïde déshydrogénase.

raison pour laquelle un antiserum polyclonal n'est jamais disponible indéfiniment.

Immuno-essai « sandwich » des hormones protéiques

La technologie développée en 1975 [2] par Kohler et Milstein (Prix Nobel 1984) surmonte les deux inconvénients exposés précédemment. Après immunisation d'un animal, en général une souris, les cellules

spléniques sont fusionnées avec des cellules tumorales pour former des hybridomes capables de produire des anticorps indéfiniment. On peut sélectionner un clone particulier produisant un anticorps de caractéristiques définies en termes de spécificité et d'affinité. Cette technologie est particulièrement adaptée à la construction de systèmes dits immunométriques qui sont très gourmands en anticorps. En effet

dans le dosage immunométrique, l'analyte est mis en présence de deux anticorps différents dont chacun est spécifique d'un épitope particulier. La molécule à doser est ainsi prise en sandwich entre les deux anticorps réactifs monoclonaux (Figure 2). On peut utiliser dans ce système de grandes quantités d'anticorps, à la différence des systèmes par compétition, car l'objectif est ici de lier la plus grande quantité possible de molécules de l'analyte au couple d'anticorps.

Mais ce système a une contrainte majeure : puisque la molécule doit se lier à deux anticorps différents pour être détectée et quantifiée, elle doit avoir une taille minimale pour éviter un encombrement stérique entre les deux anticorps. Ainsi la taille des stéroïdes et des petits peptides comme la TRH (3 acides aminés) ou la LHRH (10 acides aminés) ne permet pas la construction d'un sandwich entre deux anticorps, la taille requise minimale étant de l'ordre de 2000 daltons, soit près de 20 acides aminés.

La dispersion des dosages par immuno-essai

L'analyse des résultats des contrôles de qualité inter-laboratoires montre que pour un même paramètre il existe une grande dispersion entre les méthodes de dosage (Table 1). Cette dispersion résulte de la plus ou moins grande précision des techniques, mais surtout de la plus ou moins grande spécificité des anti-séras utilisés.

Ce problème de la spécificité des anticorps est particulièrement aigu en ce qui concerne les hormones stéroïdes dont les différences de structure sont ténues. Nous avons vu précédemment que l'on ne pouvait obtenir un anticorps anti-stéroïde qu'en couplant l'hormone à une protéine d'une espèce étrangère à l'animal injecté pour former l'immunogène. Or la partie du stéroïde liée à la protéine immunogène est masquée et, en quelque sorte, invisible pour le système immunitaire de l'animal injecté. Aussi une chimie élaborée est-elle indispensable pour obtenir un bon immunogène en liant le stéroïde par l'intermédiaire d'un carbone sans groupement fonctionnel, comme le carbone 7 par exemple. Ce sont

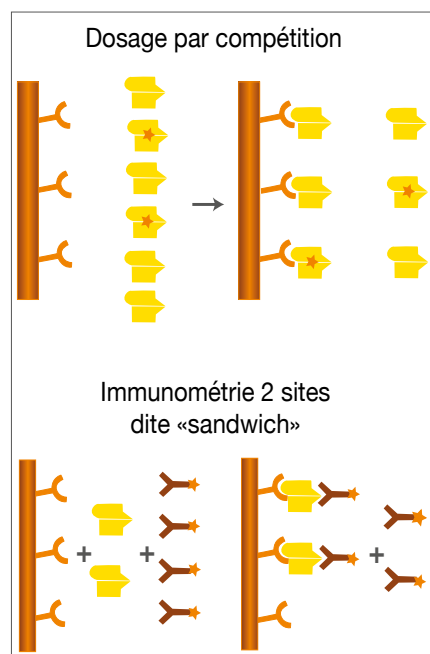


Figure 2. Schéma des immuno-essais par compétition (en haut) et par immunométrie (en bas). Dans les immuno-essais par compétition l'anticorps est en quantité limitée et l'hormone à doser et le traceur (radioactif ou non) sont en compétition pour s'accrocher à l'anticorps. Dans les dosages immunométriques, l'hormone est prise en sandwich entre deux anticorps, l'un et l'autre en excès, dont l'un est marqué par une molécule fluorescente ou luminescente, ou accroché à une enzyme qui entraînera une réaction colorée.

Seuls les systèmes par compétition sont appropriés au dosage des petites molécules comme les hormones stéroïdes.

alors l'ensemble des groupes fonctionnels, liés aux carbones 3, 11, 17, 21, et les méthyles 18 et 19, qui sont exposés en vue de la reconnaissance par l'anticorps, et la probabilité est grande d'obtenir alors un anticorps très spécifique. Finalement l'immuno-essai repose bien sur la reconnaissance de la forme dans l'espace de la molécule de stéroïde et si la différence de forme entre deux stéroïdes est faible, les anticorps générés contre l'un des stéroïdes pourront reconnaître l'autre stéroïde de forme proche, de façon non intentionnelle et non souhaitable, et c'est ce que l'on dénomme « la reconnaissance par réaction croisée » (Figure 3).

Les tableaux de réactions croisées fournis par les fournisseurs de réactifs commerciaux doivent être examinés avec un esprit critique, en tenant compte du contexte dans

Tableau 1. Dispersion des valeurs observées dans les contrôles inter-laboratoires du College of American Pathologists, exprimée par le rapport H / B de la valeur extrême la plus haute (H) à la valeur extrême la plus basse (B). Adapté d'après Soldin et Soldin [3].

Séroïde	H / B immuno-essais	H / B Spectrométrie de masse
Testostérone	2,8	1,2 – 1,4
Estradiol	9,0	1,0
Progestérone	3,3	1,1 – 1,3

lequel est prescrit le dosage. Par exemple, un antisérum anti-cortisol qui a une réaction croisée de 20 % avec le 11-désoxycortisol n'obère en rien le dosage du cortisol dans les situations courantes mais, chez un nouveau-né ayant un bloc complet de la 11 β -hydroxylase, et dont la concentration de 11-désoxycortisol est de 300 ng/ml, la concentration apparente du cortisol sera de 60 ng/ml alors que la vraie concentration peut être nulle.

D'où l'intérêt croissant des biologistes pour les dosages en spectrométrie de masse.

La spectrométrie de masse en tandem

Il y a une trentaine d'années, la spectrométrie de masse couplée à la chromatographie gazeuse était recherchée pour le dosage des hormones stéroïdes, surtout plasmatiques, mais elle a été supplantée, provisoirement, par les progrès faits par les immuno-essais après les travaux princeps de Berson et Yalow.

Le principe de cette méthode physique est la détection des molécules en fonction de leur masse, et plus précisément du rapport masse/charge après ionisation et, éventuellement, fragmentation de la molécule.

Les avancées technologiques dont a bénéficié ce type de matériel l'a réinstallé au premier plan, non seulement pour les stéroïdes, mais aussi pour les peptides hormonaux, si l'on se limite à l'hormonologie. Le « nec plus ultra » est maintenant la spectrométrie de masse en tandem, c'est-à-dire deux spectromètres travaillant séquentiellement, précédés par une séparation en chromatographie liquide à haute pression / haute performance (HPLC) ou même ultra-haute pression (UPLC).

L'échantillon qui a subi une préparation

importante par « extraction » s'il s'agit d'une hormone stéroïde (prétraitement permettant d'extraire les stéroïdes tout en se débarrassant des protéines existantes dans le milieu à doser) puis HPLC, est introduit dans le spectromètre où les molécules sont d'abord ionisées par bombardement électronique (Figure 4). Le premier spectromètre de masse analyse les masses des molécules qui lui sont présentées en fonction de leur rapport masse sur charge (m/z), puis la molécule ionisée choisie est introduite dans la chambre de collision où elle est fragmentée. Le deuxième spectromètre de masse analyse les masses des ions fils qui lui sont présentées et les envoie vers le détecteur. Grâce à l'incorporation dans l'échantillon brut d'un standard interne deutéré (où l'hydrogène H1 a été remplacé par le Deutérium H2), il est possible d'évaluer les pertes survenues dans la séquence préparation-purification, ce qui confère à la spectrométrie de masse un haut niveau d'exactitude, pour peu que le standard interne soit stable, c'est-à-dire préparé par synthèse chimique [4] et non par simple échange isotopique.

Ce qu'apporte la spectrométrie de masse

La spectrométrie de masse en tandem couplée à la chromatographie liquide haute performance (HPLC/MS-MS) est applicable à la détection et la quantification de la plupart des hormones stéroïdes naturelles, de même que des stéroïdes synthétiques [5, 6].

Les dosages par spectrométrie de masse en tandem ont pour qualité majeure une grande spécificité étant donné la succession de plusieurs opérations de purification : extraction, puis chromatographie, puis séparation des molécules ionisées, puis

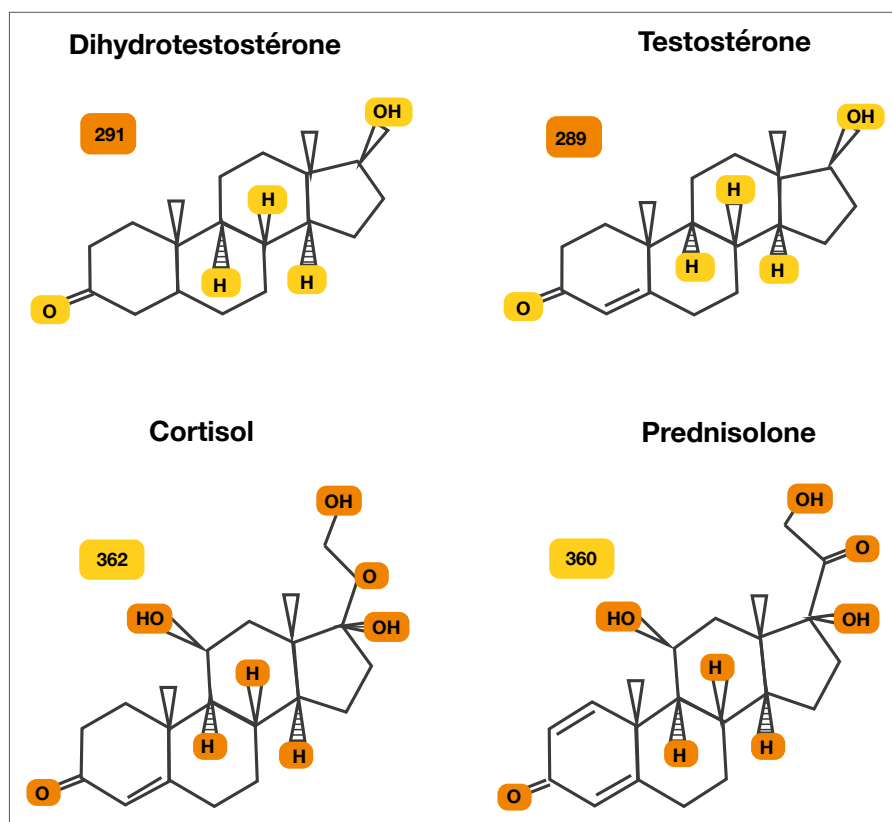


Figure 3. La parenté structurale entre dihydrotestostérone et testostérone d'une part, entre cortisol et prednisolone (métabolite du Cortancyl®) d'autre part, fait qu'il existe toujours dans les immuno-essais une interférence de l'un dans le dosage de l'autre, ce que l'on appelle une réaction croisée. En revanche la très faible différence de masse entre les éléments de chacun des couples, permet à la spectrométrie de masse de les distinguer sans ambiguïté.

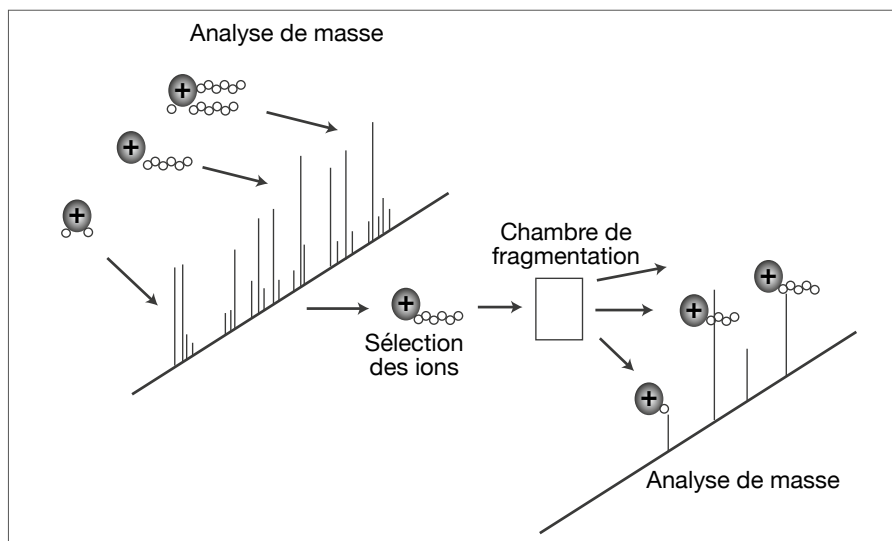


Figure 4. Spectrométrie de masse en tandem: le premier spectromètre quadripôle analyse les molécules qui lui sont présentées à la sortie de la chambre d'ionisation, puis la molécule ionisée choisie est introduite dans la chambre de collision où elle est fragmentée en ions fils. Les ions fils sont ensuite analysés dans le deuxième quadripôle et quantifiés par référence à une gamme étalon.

séparation des ions fils. Ainsi ils peuvent distinguer deux hormones très proches l'une de l'autre, comme par exemple cortisol et prednisolone (métabolite principal de la prednisone ou Cortancyl®), ou testostérone et dihydrotestostérone (Figure 3), ce qu'aucun immuno-essai ne réussit à 100 %. Cette avancée en spécificité se traduit, lors des contrôles inter-laboratoires, par une moindre dispersion des résultats par rapport aux immuno-essais (Tableau 1). De plus il est possible de quantifier en une seule injection, et d'un volume très limité, 100µl en général, représentant un volume 10 à 20 fois inférieur que celui nécessité par les immuno-essais séquentiels, plusieurs hormones de la même famille [4], ceci permettant des diagnostics très rapides, voire en urgence, qu'il serait impossible de réaliser par des dosages séquentiels. Ces avantages : rapidité, multiplexage, économie de sérum, sont particulièrement recherchés en néonatalogie, où les situations d'accumulation excessive de l'un ou plusieurs stéroïdes, coexistant avec un déficit de certains autres stéroïdes que ce soit par bloc de la synthèse du cortisol, ou par hypersécrétion d'origine tumorale, sont mises en évidence de façon simultanée. La grande sensibilité permet par ailleurs le dépistage de pathologies encore frustes, ou de concentrations basales très basses qui ne seraient pas détectées par les immuno-essais.

Application au dosage des stéroïdes

C'est la raison pour laquelle le dosage par spectrométrie de masse en tandem passe progressivement en routine, notamment pour le dosage des précurseurs du cortisol pour lesquels on ne dispose pratiquement pas de dosages sur automate, et dont les réactifs pour RIA disparaissent progressivement.

Pour chaque stéroïde une transition « molécule mère - ion fils » est sélectionnée pour la quantification, comme par exemple dans le Tableau 2.

Les avantages de la spectrométrie de masse

Les avantages de la spectrométrie de masse

Tableau 2. Temps de rétention sur la colonne Acquity et transitions molécule > ion fils pour quelques stéroïdes (UPLC –MSMS Quattro Premier Waters).

	Temps de rétention mn	Transition
Cortisol	2,88	363,18 > 97,20
Corticostérone	3,94	347,18 > 121,10
11-désoxycortisol	4,20	347,18 > 97,15
Androstènedione	4,98	287,18 > 97,11
DOC	5,57	331,21 > 97,17
Testostérone	5,71	289,19 > 97,13
17-hydroxy-progestérone	6,27	331,21 > 97,17
Progestérone	8,45	315,21 > 97,21

moderne sont évidents :

1. La méthode est applicable à tous les milieux biologiques disponibles et sa très basse limite de détection en font une méthode de choix pour les milieux où les concentrations sont très faibles, comme la salive ou les cheveux.
2. Il est possible en un seul temps, de doser une dizaine de stéroïdes ou plus, ce qui est impossible pour un immuno-essai.
3. La spécificité de la MS en tandem permet de mesurer sans confusion des stéroïdes dont la différence de masse est seulement de une ou deux unités (Figure 3).
4. La chromatographie à ultra-haute pression permet d'obtenir des résultats en quelques minutes, ce qui rend la technique appropriée pour les dosages en urgence si la préparation (extraction + injection) est elle-même automatisée. En revanche le temps d'obtention des mêmes résultats se calcule toujours en jours si on fait appel à des techniques radio-immunologiques, considérées, avant le retour de la spectrométrie de masse, comme des techniques de référence pour les stéroïdes.

Les différents milieux

La préparation de l'échantillon par extraction liquide ou solide préalable rend le dosage par spectrométrie de masse adaptable à tous les milieux biologiques.

Les stéroïdes urinaires

Les hormones stéroïdes sont éliminées dans les urines, majoritairement sous la forme de métabolites hydrosolubles par conjugaison avec l'acide glucuronique ou l'acide sulfurique. Ces conjugués sont formés dans les tissus périphériques, essentiellement foie et rein à partir des stéroïdes sécrétés. D'où la nécessité de pratiquer une hydrolyse des conjugués avant le dosage proprement dit, ce qui représente une perte de temps et un risque de sous-estimation si l'hydrolyse n'est pas complète.

D'autre part, un même métabolite peut être issu de plusieurs molécules différentes, par exemple les 17-cétostéroïdes urinaires peuvent être issus du métabolisme de la DHA, de l'androstènedione ou de la testostérone, d'où un résultat ambigu sur le plan sémiologique. Et il pourrait paraître paradoxal d'utiliser une technique aussi sophistiquée que la spectrométrie de masse pour fournir des résultats ambigus.

Reste le cas des stéroïdes urinaires libres, et notamment du cortisol urinaire libre, souvent symbolisé par le sigle FLU pour « composé F Libre Urinaire ». Il s'agit là d'un reflet direct du cortisol libre sérique transféré à travers le glomérule sans réabsorption dans le tubule. Effectivement la mesure du cortisol libre urinaire par LC-MS/MS a été rapportée comme étant la méthode la plus exacte pour le diagnostic d'hypercortisolisme [8], même si le cortisol

libre sérique dont dépend le cortisol libre urinaire n'est pas nécessairement un reflet fidèle de la production du cortisol puisqu'il dépend aussi de la concentration de la transcortine ou CBG [revue in 9].

En fait le dosage par immuno-essai automatisé, à l'aide de la méthode sérique adaptée pour les urines, s'il n'est pas précédé d'une extraction, fournit des valeurs doubles des résultats par LC-MS/MS [10]. En revanche si l'immuno-essai est précédé d'une extraction efficace, les différences s'abrasent la plupart du temps.

Un autre avantage de la LC-MS/MS par rapport aux immuno-essais est la possibilité de mesurer simultanément en une seule extraction plusieurs métabolites urinaires libres [11].

Les stéroïdes sériques

C'est ce même point fort qui invite à doser par LC-MS/MS les stéroïdes sériques et la technique par spectrométrie en tandem a été validée aussi bien pour le dosage des stéroïdes androgéniques [12-14], que pour les glucocorticoïdes [3, 5-7] et plus récemment pour l'aldostérone [15-18], comme pour l'ensemble de la voie dite « Delta5 » allant de la pregnénolone à l'androstènediol [19]. En fait, il est possible, si l'on dispose de l'équipement approprié, de doser simultanément 8 à 15 stéroïdes sériques différents. La Figure 5 et le Tableau 3 en sont un exemple et d'autres exemples pathologiques seront discutés en atelier.

Les stéroïdes salivaires

La sensibilité du dosage par spectrométrie de masse en fait un outil de choix pour le dosage des stéroïdes salivaires. Ils proviennent des stéroïdes libres sériques par transfert actif à travers l'épithélium salivaire. La vitesse de transfert des hormones stéroïdiennes de la circulation sanguine vers le liquide salivaire dépend de leur diffusion à travers les couches lipidiques des capillaires sanguins et des cellules épithéliales glandulaires. Grâce à leurs propriétés hydrophobes, elles passent beaucoup plus rapidement que les molécules hydrophiles telles que des peptides à travers la paroi capillaire, la membrane basale et les cellules acinaires [20].

Ainsi les concentrations salivaires des hormones stéroïdiennes reflètent les concentrations des mêmes formes libres que dans le sérum car il y a un maintien de l'équilibre entre les fractions sériques et les fractions salivaires selon un coefficient de perméabilité. Pour le cortisol, cela nécessite moins d'une minute pour que cet équilibre soit atteint. La concentration de cortisol salivaire est donc représentative de la fraction libre sérique même en situation de variation rapide. Le cortisol salivaire hydrophobe représente ainsi 10 p.100 de la concentration sérique en cortisol libre [20].

La salive est donc un milieu biologique intéressant car elle permet de doser les mêmes stéroïdes que dans le sérum c'est-à-dire non conjugués pour la plupart, contrairement aux stéroïdes urinaires. Il a été rapporté de façon répétée que le dosage dans la salive en fin de nuit est plus informatif, pour le diagnostic du syndrome de Cushing, que le cortisol libre urinaire [21] et que cette approche est particulièrement efficace pour le diagnostic des formes infracliniques d'hypercortisolisme [22].

Le dosage dans la salive s'avère aussi particulièrement approprié dans plusieurs circonstances, car il permet d'éviter une hospitalisation. C'est le cas notamment du test à la métyrapone avec dosages sériques du cortisol et du 11-désoxycortisol, habituellement pratiqué en hospitalisation, alors que le recueil de salive après prise de métyrapone peut être réalisé à domicile [23]. On peut ainsi doser simultanément cortisol et 11-désoxycortisol dans le prélèvement salivaire (Figure 5).

Les stéroïdes capillaires

Enfin, le dosage par spectrométrie de masse est particulièrement adéquat pour le dosage des hormones stéroïdes dans les cheveux. Comme le prélèvement salivaire, le prélèvement d'un échantillon de cheveux est peu invasif. De plus chaque segment d'un cheveu est représentatif d'une période de temps, d'autant plus éloignée du jour du prélèvement que le segment est plus loin de la racine. Un segment de 3 cm est représentatif d'environ 3 mois d'imprégnation. On peut donc obtenir une image rétrospective de l'imprégnation hormo-

Tableau 3. Concentration de 8 stéroïdes mesurés simultanément chez un nouveau-né mâle normal, correspondant au spectre de la figure 5.

	nmol/L	Références
Cortisol	275	276 - 552
Corticostérone	9,8	1,3 - 36,5
11-désoxycortisol	2,4	3,5 - 23
Androstènedione	1,20	1,05 à 4,19
DOC	0,105	0,073 - 0,358
Testostérone	2	0,35 - 3,12
17-hydroxy-progesterone	1,8	1,8 - 33,3
Progestérone	1,5	0,3 - 3,80

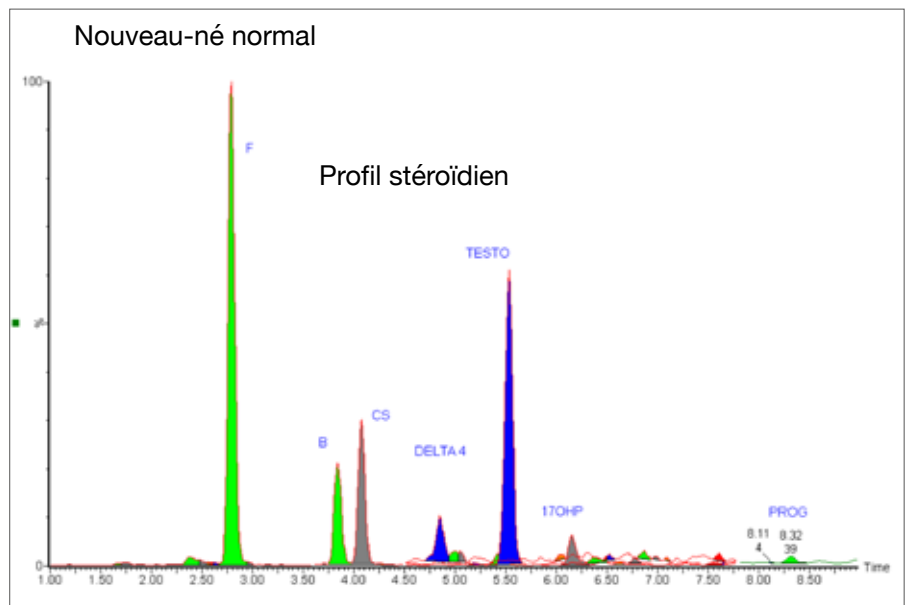


Figure 5. Profil stéroïdien d'un nouveau-né mâle normal montrant la quantification simultanée de 8 stéroïdes sur une prise d'essai de seulement 100 µL de sérum. Les concentrations obtenues sont représentées dans le tableau 3.

nale, ce que les prélèvements urinaires et encore moins sériques ou salivaires ne peuvent fournir. Le cheveu est aussi une matrice particulièrement stable car peu biodégradable. Enfin la couleur naturelle des cheveux, l'âge et le sexe ont peu d'influence sur la qualité du prélèvement.

Certes, un certain nombre de données où le cortisol a été dosé par immuno-essai,

notamment pour le diagnostic du syndrome de Cushing, ont été publiées [24-26]. Mais, là encore, la spectrométrie de masse apporte exactitude et sensibilité et permet le dosage de plusieurs stéroïdes simultanément, aussi bien les androgènes que le cortisol et ses précurseurs [27]. Nous montrerons au cours de l'atelier un exemple de profil stéroïdien dans les cheveux.

Applications cliniques

Au cours de l'atelier seront discutés des exemples de profil stéroïdien dans plusieurs situations cliniques :

1. Tel patient présente-t-il une hypersécrétion surrénalienne ? Au profit de quel(s) stéroïde(s) ? S'agit-il d'un corticosurrénalome ?
2. Tel enfant présente-t-il ou non un bloc enzymatique ou un autre trouble de la différenciation sexuelle ?
3. Tel patient présente-t-il un syndrome de Cushing ou un corticosurrénalome ?
4. Peut-on affirmer l'existence d'un syndrome de Cushing chez tel autre patient, ou pas ?
5. Tel sportif est-il dopé aux corticoïdes ou non ?

Conclusion : bénéfices /contraintes

La spectrométrie de masse, comme son nom l'indique, identifie les molécules par leur masse, après ionisation. Il n'est donc plus question de différence de forme, mais de différence de masse. Mais la sélection de la molécule à doser doit être précédée d'un traitement de l'échantillon biologique en vue de réaliser une « pré-sélection » : extraction et séparation par chromatographie liquide. L'automatisation de ce traitement préalable de l'échantillon, avant la mesure par spectrométrie de masse proprement dite, permettra certainement, à terme, une démocratisation de ces appareils dans les laboratoires d'hormonologie de routine.

Plaident en faveur de la spectrométrie de masse : sa sensibilité, sa spécificité, sa capacité de multiplexage, son économie du volume sanguin nécessaire, qui font que son application dans le domaine du diagnostic est une plus-value pour toute exploration des axes gonadique et surrénalien.

Mais son implantation dans les laboratoires d'hormonologie est lente (actuellement plus de 97 % des labs d'hormonologie utilisent encore les immuno-essais, contre moins de 3 % qui font appel à la spectrométrie de masse), car :

- l'investissement est lourd ;
- le coût des réactifs prêts à l'emploi, quand ils existent, est élevé ;

- la formation des opérateurs (techniciens, biologistes) est longue ;
- les étapes non automatisées sont encore trop nombreuses, notamment les extractions « maison » sont chronophages, etc...

Il est très vraisemblable qu'un autre saut technologique, permettant de mettre à disposition des laboratoires à grand débit une automatisation de la phase préanalytique, en l'occurrence la phase d'extraction, et permettant de s'affranchir pendant l'analyse elle-même, des étapes manuelles, vienne améliorer cette situation.

N. Lahlou, L. Groussin
najiba.lahlou@aphp.fr

RÉFÉRENCES

1. Yalow RS, Berson SA. Assay of plasma insulin in human subjects by immunological methods. *Nature* 1959; 184 (Suppl. 21):1648-49.
2. Kohler G, Milstein C. Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature* 1975; 256:495-97.
3. Soldin SJ, Soldin OP. Steroid hormone analysis by tandem mass spectrometry. *Clin Chem* 2009; 55:1061-66.
4. Dehennin L, A Reiffsteck, R Scholler. Simple methods for the synthesis of twenty different, highly enriched deuterium-labeled steroids, suitable as internal standards for isotope dilution mass spectrometry. *Biomed Mass Spectrom* 1980; 7:493-99.
5. McWynney BC, Briscoe SE, Ungerer JP, Pretorius CJ. Measurement of cortisol, cortisone, prednisolone, dexamethasone and 11-deoxycortisol with ultra high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry: Application for plasma, plasma ultrafiltrate, urine and saliva in a routine laboratory. *J Chromatogr* 2010; 878:2863-69.
6. Kushnir MM, Rockwood AL, Roberts WL, et al. Liquid chromatography tandem mass spectrometry for analysis of steroids in clinical laboratories. *Clin Biochem* 2011; 44:77-88.
7. Abdel-Khalik J, Björklund E, Hansen M. Simultaneous determination of endogenous steroid hormones in human and animal plasma and serum by liquid or gas chromatography coupled to tandem mass spectrometry. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 2013; 928:58-77.
8. Ceccato F, Barbot M, Zilio M, et al. Screening Tests for Cushing's Syndrome: Urinary Free Cortisol Role Measured by LC-MS/MS. *J Clin Endocrinol Metab* 2015; 100:3856-61.
9. Raff H, Auchus RJ, Findling JW, Nieman LK. Urine free cortisol in the diagnosis of Cushing's syndrome: is it worth doing and, if so, how? *J Clin Endocrinol Metab* 2015; 100:395-97.
10. McCann SJ, Gillingwater S, Keevil BG. Measurement of urinary free cortisol using liquid chromatography-tandem mass spectrometry: comparison with the urine adapted ACS:180 serum cortisol chemiluminescent immunoassay and development of a new reference range. *Ann Clin Biochem* 2005;

42:112-118.

11. Allende F, Solari S, Campino C, et al. LC-MS/MS Method for the Simultaneous Determination of Free Urinary Steroids. *Chromatographia* 2014; 77:637-42.
12. Licea-Perez H, Wang S, Szapacs ME, Yang E. Development of a highly sensitive and selective UPLC/MS/MS method for the simultaneous determination of testosterone and 5alpha-dihydrotestosterone in human serum to support testosterone replacement therapy for hypogonadism. *Steroids* 2008; 73:601-610.
13. Janse F, Eijkemans MJ, Goverde AJ, et al. Assessment of androgen concentration in women: liquid chromatography-tandem mass spectrometry and extraction RIA show comparable results. *Eur J Endocrinol* 2011; 165:925-33.
14. Quanson JL et al. High-throughput analysis of 19 endogenous androgenic steroids by ultra-performance convergence chromatography tandem mass spectrometry. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 2016; 1031:131-138.
15. Meunier C, Blondelle D, Faure P, et al. Development and validation of a method using supported liquid extraction for aldosterone determination in human plasma by LC-MS/MS. *Clin Chim Acta* 2015; 447:8-15.
16. Van der Gugten JG, Holmes DT. Quantitation of Aldosterone in Serum or Plasma Using Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry (LC-MS/MS). *Methods Mol Biol* 2016; 1378:37-46.
17. Eisenhofer G, Dekkers T, Peitzsch M, et al. Mass Spectrometry-Based Adrenal and Peripheral Venous Steroid Profiling for Subtyping Primary Aldosteronism. *Clin Chem* 2016; 62:514-24.
18. Travers S, Martinier L, Bouvattier C, et al. Multiplexed steroid profiling of glucocorticoids pathways using a liquid chromatography tandem mass spectrometry method. *J Steroid Biochem Mol Biol* 2017; 165:202-11.
19. Kulle AE et al. Determination of 17OHPreg and DHEAS by LC/MS/MS: Impact of Age, Sex, Pubertal Stage and BMI on the Δ^5 -steroid-pathway. *J Clin Endocrinol Metab* 2017, sous presse.
20. Vining RF, McGinley RA, Symons RG. Hormones in saliva: mode of entry and consequent implications for clinical interpretation. *Clin Chem* 1983; 29:1752-56.
21. Elias PC, Martinez EZ, Barone BF, et al. Late-night salivary cortisol has a better performance than urinary free cortisol in the diagnosis of Cushing's syndrome. *J Clin Endocrinol Metab* 2014; 99:2045-51.
22. Palmieri S, Morelli V, Polledri E, et al. The role of salivary cortisol measured by liquid chromatography-tandem mass spectrometry in the diagnosis of subclinical hypercortisolism. *Eur J Endocrinol* 2013; 168:289-96.
23. Lahlou et al. Mass spectrometry to assess the short metyrapone test with salivary 11-deoxycortisol. 2017 (Soumis à publication).
24. Gow R, Thomson S, Rieder M, et al. An assessment of cortisol analysis in hair and its clinical applications. *Forensic Sci Int* 2010; 196:32-37.
25. Thomson S, Koren G, Fraser LA, et al. Hair analysis provides a historical record of cortisol levels in Cushing's syndrome. *Exp Clin Endocrinol Diabets* 2010; 118:133-38.
26. Manenschijn L, Koper JW, van den Akker EL, et al. A novel tool in the diagnosis and follow-up of (cyclic) Cushing's syndrome: measurement of long-term cortisol in scalp hair. *J Clin Endocrinol Metab* 2012; 97:E1836-43.
27. Noppe G, de Rijke YB, Dorst K, et al. LC-MS/MS-based method for long-term steroid profiling in human scalp hair. *Clin Endocrinol (Oxf)* 2015; 83:162-66.