

UNIVERSITE DE LIMOGES

Faculté de Pharmacie

ANNÉE 2014

THÈSE N°

Mise en place et validation du dosage du cortisol urinaire, du cortisol salivaire et des androgènes en LC-MS/MS

THÈSE POUR LE DIPLÔME D'ÉTAT DE DOCTEUR EN PHARMACIE

présentée et soutenue publiquement

le 19 décembre 2014

par

Elsa Laura CABANEL

née le 30/03/1988, à Gourdon (Lot)

Directeur de thèse : le Docteur Julie Brossaud

EXAMINATEURS DE LA THÈSE

M. le Professeur Franck Saint-Marcoux
M Le Professeur Philippe Caron
M Le Docteur Safouane Hamdi
M Le Professeur Jean-Benoît Corcuff
Mme. Le Docteur Julie Brossaud

DOYEN DE LA FACULTE : Monsieur le Professeur Jean-Luc **DUROUX**

1^{er} VICE-DOYEN : Madame Catherine **FAGNERE**, Maître de Conférences

PROFESSEURS :

BATTU Serge	CHIMIE ANALYTIQUE
BOTINEAU Michel	BOTANIQUE ET CRYPTOLOGIE
BUXERAUD Jacques	CHIMIE ORGANIQUE ET THERAPEUTIQUE
CARDOT Philippe	CHIMIE ANALYTIQUE ET BROMATOLOGIE
DELAGE Christiane	CHIMIE GENERALE ET MINERALE
DESMOULIERE Alexis	PHYSIOLOGIE
DUROUX Jean-Luc INFORMATIQUE	BIOPHYSIQUE, BIOMATHEMATIQUES ET
LIAGRE Bertrand	BIOCHIMIE ET BIOLOGIE MOLECULAIRE
MAMBU Lengo	PHARMACOGNOSIE
ROUSSEAU Annick	BIOSTATISTIQUE
VIANA Marylène	PHARMACOTECHNIE

PROFESSEURS DES UNIVERSITES – PRATICIENS HOSPITALIERS DES DISCIPLINES PHARMACEUTIQUES :

MOESCH Christian ENVIRONNEMENT	HYGIENE HYDROLOGIE
ROGEZ Sylvie	BACTERIOLOGIE ET VIROLOGIE
SAINT-MARCOUX Franck	TOXICOLOGIE

MAITRE DE CONFERENCES DES UNIVERSITES – PRATICIEN HOSPITALIER DES DISCIPLINES PHARMACEUTIQUES : (en détachement)

PICARD Nicolas	PHARMACOLOGIE
-----------------------	---------------

MAITRES DE CONFERENCES :

BASLY Jean-Philippe	CHIMIE ANALYTIQUE ET BROMATOLOGIE
BEAUBRUN-GIRY Karine	PHARMACOTECHNIE
BILLET Fabrice	PHYSIOLOGIE
CALLISTE Claude INFORMATIQUE	BIOPHYSIQUE, BIOMATHEMATIQUES ET

CLEDAT Dominique	CHIMIE ANALYTIQUE ET BROMATOLOGIE
COMBY Francis	CHIMIE ORGANIQUE ET THERAPEUTIQUE
COURTIOUX Bertrand	PHARMACOLOGIE, PARASITOLOGIE
DELEBASSEE Sylvie IMMUNOLOGIE	MICROBIOLOGIE-PARASITOLOGIE-
DEMIOT Claire-Elise	PHARMACOLOGIE
FAGNERE Catherine	CHIMIE ORGANIQUE ET THERAPEUTIQUE
FROISSARD Didier	BOTANIQUE ET CRYPTOLOGIE
JAMBUT Anne-Catherine	CHIMIE ORGANIQUE ET THERAPEUTIQUE
LABROUSSE Pascal	BOTANIQUE ET CRYPTOLOGIE
LEGER David	BIOCHIMIE ET BIOLOGIE MOLECULAIRE
MARRE-FOURNIER Françoise	BIOCHIMIE ET BIOLOGIE MOLECULAIRE
MERCIER Aurélien	PARASITOLOGIE
MILLOT Marion	PHARMACOGNOSIE
MOREAU Jeanne IMMUNOLOGIE	MICROBIOLOGIE-PARASITOLOGIE-
PASCAUD Patricia BIOMATERIAUX CERAMIQUES	PHARMACIE GALENIQUE –
POUGET Christelle	CHIMIE ORGANIQUE ET THERAPEUTIQUE
SIMON Alain	CHIMIE GENERALE ET MINERALE
TROUILLAS Patrick INFORMATIQUE	BIOPHYSIQUE, BIOMATHEMATIQUES ET
VIGNOLES Philippe INFORMATIQUE	BIOPHYSIQUE, BIOMATHEMATIQUES ET
<u>PROFESSEUR :</u>	
ROUMIEUX Gwenhaël	ANGLAIS
<u>ATTACHE TEMPORAIRE D'ENSEIGNEMENT ET DE RECHERCHE :</u>	
PARENT Marianne GALENIQUE	PHARMACOTECHNIE, PHARMACIE
VEDRENNE Nicolas	CHIMIE ANALYTIQUE
<u>DETACHEMENT à compter du 1/09/2014 pour 2 ans</u>	
MARION-THORE Sandrine	CHIMIE ORGANIQUE ET THERAPEUTIQUE

Remerciements

A Monsieur le Professeur Franck Saint-Marcoux,

Pour m'avoir fait l'honneur de présider mon jury de thèse. Soyez assuré de mon profond respect et de ma considération.

A Madame le Docteur Julie Brossaud, ma directrice de thèse,

Merci Julie d'avoir accepté de m'encadrer sur ce projet, et de l'avoir fait avec autant de bonne humeur et de dynamisme. Ce fut vraiment un plaisir de travailler avec toi ! Je te remercie pour ta patience face à mes « ratées » dans les premières manipulations, ta passion pour ton travail, ta gentillesse et ta très très grande disponibilité ! Je suis vraiment très heureuse que tu sois ma directrice de thèse, et j'espère que nous serons amenées à nous revoir !

A Monsieur le Professeur Jean-Benoît Corcuff,

Merci encore de m'avoir proposé ce projet, de m'avoir formée à la validation et fait bénéficier de tes compétences et de ton expérience en endocrinologie. Merci donc pour cette opportunité et tous ces bons moments partagés.

A Monsieur le Professeur Philippe Caron,

Je vous remercie de me faire profiter de votre expertise en tant que clinicien en participant à mon jury de thèse. Merci pour l'intérêt que vous avez porté à ce travail. Respectueusement.

A Monsieur le Docteur Safouane Hamdi,

Pour m'avoir fait le plaisir de venir juger mon travail avec enthousiasme et intérêt. J'espère que ce mémoire sera à la hauteur de vos attentes.

Aux personnes ayant participé à ce travail par leurs conseils et leur aide,

A Madame le Professeur Agnès Georges,

Merci de m'avoir accueillie dans ton service et de m'avoir permis d'y effectuer ma thèse.

A Madame le Docteur Nassima Belaidi,

Pour reprendre la phrase avec laquelle tout le monde sera d'accord : tu es le rayon de soleil de ce laboratoire. Merci pour ta gentillesse, pour nos discussions et nos fou-rires. Travailler avec toi est un véritable bonheur. Je te remercie aussi bien sûr pour le regard critique et rigoureux que tu as su m'enseigner dans la validation des techniques manuelles.

A Monsieur Dominique Ducint,

Tes connaissances en analytique sont immenses et je te remercie de les avoir partagées avec moi. Merci pour ta gentillesse, ta patience, ta simplicité et ton sens de l'humour.

Je tiens également et tout particulièrement à remercier les techniciennes du laboratoire d'hormonologie de l'hôpital à Haut-L'évêque. Vous avez su rendre ce stage extrêmement chaleureux et je m'y suis sentie chez moi. Merci pour nos fou-rires, nos discussions et votre soutien durant ces six mois.

Je tiens surtout à remercier Dominique Gualde. J'ai eu l'immense plaisir de travailler avec toi et je te suis reconnaissante. J'ai sincèrement apprécié ta « sagesse » ;) , tes conseils et ton grand sens de l'humour.

Je remercie aussi l'ensemble des techniciens du PTMP de Pellegrin pour m'y avoir accueillie et permis de travailler avec eux.

Merci à Marguerite ma co-interne médecin. Je te souhaite beaucoup de réussite et de bonheur dans cette carrière et dans ta vie personnelle. Merci pour tout, et à très bientôt !

Pour toutes les personnes qui ont marqué mon internat et mes années d'étude,

Merci à mes co-internes toulousains. Je pense principalement à Christophe (mon p'tit Chrichri), Laura et Sébastien avec qui j'ai enduré mon semestre d'été 2013... Vous êtes de loin les personnes les plus gentilles que j'ai rencontrées sur Toulouse !

Merci à Marie Canteloup pour avoir rendu ce séjour Bordelais fort sympathique ! Tu es une excellente colloc' je ne pouvais vraiment pas tomber mieux ! Je me souviens du soir où je suis arrivée tu m'avais gardé la place devant l'appart et mitonné un bon petit repas ! J'ai vraiment été aux petits oignons avec toi ! Il y a peu de personnes aussi attentionnées, passionnées, et enjouées que toi ! Merci vraiment pour tout !

Merci à mes grands amis limougeauds Batiste, Alice, Marianne et Bruno. J'ai fait mes premiers pas dans ce long périple qu'est l'internat avec vous et je ne l'oublierai pas. Vous avez transformé ces 2 semestres passés à Limoges en de merveilleux souvenirs ! Cela me paraissait bien difficile à l'époque... Et pourtant, ce furent les meilleurs moments de ma vie d'interne ! (Vivement le nouvel an !!!!)

Merci à mes deux amies des bancs de fac, Sandra et Pauline. Les meilleurs moments que j'y ai vécus je les ai partagés avec vous. C'est à chaque fois un plaisir de vous revoir. On a vécu tellement de moments de stress, de doutes avec ce concours de P1, et puis de soirées !!! Vous me manquez énormément, j'espère qu'on ne perdra pas le contact, je me rappelle encore de la première fois que je vous ai vues, Sandra impressionnante à la prépa avec toutes tes connaissances et Pauline toute pimpante avec ce jean que j'aurais voulu te chiper !!! On était faites pour se rencontrer ! Rien que pour cela ça valait le coup de faire pharma !

Je remercie aussi les copains rencontrés sur Toulouse : les futurs parents Remy et Natacha, Bernard, Natalie, les albigeois Chloé et Djoha, les bons vivants Jérémy et Joss, les exilés du bout du monde Cécile et Romain, ainsi que Juju et Sophie !

Et bien sûr aux autres, nombreux : internes (notamment à mes co-internes de parasito), biologistes et techniciens (d'immuno Limoges, de parasito et d'hémato Toulouse) avec qui j'ai apprécié travailler.

Je dédie ma thèse à ma famille. A ma petite mamie qui sera si contente de découvrir mon travail ! Et surtout à mes parents qui m'ont toujours soutenue durant toutes ces années et qui je le sais me soutiendront toujours. Je n'en serais probablement pas arrivée là sans vos encouragements et votre amour. A mon frère, le meilleur des grands frères et depuis quelques années le meilleur des papas !

Merci à mes « presque » beaux-parents et « beaux-grands-parents », car j'ai bien de la chance d'en avoir d'aussi gentils ! Aux Californiens Bastien et Macha, vivement les vacances de Noël que l'on se voit « to celebrate » !!!!!

Pour finir, merci à mon « petit chéri » Mathieu. Je ne vais pas trop faire dans le « gnangnan » car cela ne te plait pas. Mais merci pour ta grande compréhension et ton soutien pendant que je buchais ce satané concours, désolée de te l'avoir fait vivre par procuration... Tu es quelqu'un de doux et très attentionné. Je suis heureuse avec toi. Que serait ma vie si je ne t'avais pas rencontré ! Je t'aime.

Droits d'auteurs



Cette création est mise à disposition selon le Contrat : « **Paternité-Pas d'Utilisation Commerciale-Pas de modification** » disponible en ligne
<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/2.0/fr/>

Sommaire

Remerciements	5
Droits d'auteurs	9
Sommaire.....	10
Abréviations :	15
Introduction	17

Première partie : Physiopathologie des Glucocorticoïdes et des Androgènes.

1. Généralités sur les hormones stéroïdiennes.....	18
1.1. Stéroïdogénèse : organes producteurs, synthèse.	18
1.1.1. Les glandes surrénales.....	18
1.1.2. Les organes reproducteurs	19
1.2. Structure des hormones stéroïdiennes	20
1.3. Transport des hormones stéroïdiennes	21
1.4. Mécanisme d'action des hormones stéroïdiennes	21
1.5. Voies de régulation	22
1.6. Métabolisme et élimination	22
2. Glucocorticoïdes	23
2.1. Effets	23
2.2. Variations physiologiques	23
2.3. Pathologie.....	24
2.3.1. Excès de cortisol.....	24
2.3.1.1. Clinique.....	24
2.3.1.2. Etiologies	25
2.3.2. Défaut de cortisol.....	25
2.3.2.1. Clinique.....	25
2.3.2.2. Etiologies	27
3. Androgènes	27
3.1. Rôles physiologiques	27

3.2.	Pathologies associées :	27
3.2.1.	Hyperandrogénie	27
3.2.2.	Etiologies	28
3.2.2.1.	Hyperplasie congénitale des surrénales (HCS)	28
3.2.2.2.	Syndrome des ovaires polykystiques	29
3.2.2.3.	Autres	29
3.2.3.	Hypogonadisme masculin	29
4.	Place des dosages étudiés dans la démarche diagnostique	30
4.1.	Dosages du cortisol	30
4.1.1.	Cortisol libre urinaire	30
4.1.1.1.	Intérêts	30
4.1.1.2.	Conditions pré analytiques	30
4.1.2.	Cortisol salivaire	31
4.1.2.1.	Intérêts	31
4.1.2.2.	Conditions préanalytiques	31
4.2.	Dosage des androgènes	32
4.2.1.	Composés : intérêts du dosage en pathologie	32
4.2.1.1.	Testostérone	32
4.2.1.2.	11-Désoxycortisol (Composé-S), et 17-Hydroxyprogestérone (17OHP)	32
4.2.1.3.	Déhydroandrostènedione = DHEA ; Delta-4-androstènedione	33
4.2.2.	Conditions préanalytiques	33

Seconde Partie : Présentation des techniques de dosages des glucocorticoïdes et des androgènes surrénaliens au laboratoire

1.	Rappels sur les techniques de dosages utilisées au laboratoire	34
1.1.	Méthodes immunologiques	34
1.2.	Phase de prétraitement de l'échantillon : l'extraction	35
2.	Nouvelle méthode de dosage : chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse en tandem (LC-MS/MS)	37

2.1.	La chromatographie :.....	37
2.2.	La spectrométrie de masse :.....	38
2.3.	Principe de l'étalon interne : molécule deutérée	42
3.	Intérêts et limites des techniques présentées	43
4.	Choix du changement de méthode de dosage	44

Troisième Partie : Validation des méthodes de dosage

1.	Bases théoriques de la qualité.....	45
1.1.	Démarche d'accréditation.....	45
1.2.	Validation de méthode comme décrite dans le SH GTA 04.....	45
1.2.1.	Définitions utiles pour la suite de l'exposé	47
1.2.2.	Détermination des limites acceptables	49
2.	Présentation des validations de méthode effectuées.....	50
3.	Détermination des critères de performance et des limites d'acceptabilité à respecter.....	50
4.	Dosages du cortisol libre urinaire sur le Quattro-micro	52
4.1.	Mode opératoire.....	52
4.2.	Evaluation de la répétabilité.....	52
4.3.	Evaluation de la fidélité intermédiaire (reproductibilité).....	53
4.4.	Evaluation de la justesse	54
4.5.	Evaluation de la spécificité vis-à-vis des métabolites urinaires du cortisol	54
4.6.	Evaluation de la linéarité.....	55
4.7.	Evaluation de la contamination.....	58
4.8.	Détermination de la limite de détection	60
4.9.	Détermination de la limite de quantification	60
4.10.	Evaluation de la stabilité des réactifs.....	61
4.11.	Détermination des incertitudes	63
4.12.	Comparaison de méthode	64

4.13.	Essais spécifiques à la méthode.....	66
4.13.1.	Détermination du coefficient d'extraction	66
4.13.2.	Détermination de l'effet matrice	67
4.14.	Essais concernant les paramètres de la phase préanalytique et pouvant influencer la phase analytique	70
4.14.1.	Essais stabilité des échantillons	70
4.14.2.	Evaluation de l'influence du PH sur la qualité de l'extraction.....	73
4.15.	Conclusions	75
5.	Dosage du cortisol urinaire sur le 5500-Qtrap	76
5.1.	Répétabilité et reproductibilité.....	76
5.2.	Linéarité.....	77
5.3.	Limite de quantification	78
5.4.	Justesse	79
5.5.	Spécificité	79
5.6.	Conclusions	79
6.	Dosage du cortisol salivaire	80
6.1.	Mode opératoire.....	80
6.2.	Evaluation de la répétabilité.....	81
6.3.	Evaluation de la fidélité intermédiaire (reproductibilité).....	81
6.4.	Evaluation de la justesse	82
6.5.	Evaluation de la spécificité	82
6.6.	Evaluation de la linéarité.....	82
6.7.	Evaluation de la contamination.....	84
6.8.	Détermination de la limite de détection.....	85
6.9.	Détermination de la limite de quantification	85
6.10.	Evaluation de la stabilité des réactifs.....	85
6.11.	Détermination des incertitudes	86

6.12.	Comparaison de méthode	87
6.13.	Détermination des valeurs de référence :	89
6.14.	Essais spécifiques à la méthode.....	92
6.14.1.	Détermination du coefficient d'extraction	92
6.14.2.	Détermination de l'effet matrice	92
6.15.	Essais concernant les paramètres de la phase préanalytique et pouvant influencer la phase analytique	94
6.15.1.	Essais stabilité des échantillons	94
6.16.	Conclusions	96
7.	Dosage des androgènes.....	97
7.1.	Mode opératoire.....	97
7.2.	Evaluation de la répétabilité.....	98
7.3.	Evaluation de la reproductibilité	99
7.4.	Limite de quantification	100
7.5.	Effet matrice.....	100
7.6.	Comparaison de méthode	101
7.7.	Coefficient d'extraction	102
7.8.	Spécificité	102
7.9.	Exactitude.....	102
7.10.	Stabilité des échantillons	103
7.11.	Conclusions	103
	Conclusions, perspectives, avenir :	104
	Table des illustrations	106
	Références bibliographiques	108
	SERMENT DE GALIEN	113
	Résumé	

Abréviations :

ACN : acétonitrile

ACTH : corticotropine, corticostimuline, adrénocorticotrophine

ADH : hormone anti-diurétique

ADN : acide désoribonunucléique

AFNOR : Agence Française de NORmalisation

APCI : ionisation chimique à pression atmosphérique

ASC : aire sous courbe

CBG : cortisol binding protein

CEQ : contrôle externe de qualité

CIQ : contrôle interne de qualité

CIL : contrôle inter-laboratoire

CLSI : Clinical Laboratory of Standards Institute
CLU : cortisol libre urinaire

COFRAC : COmité FRançais d'ACcréditation

Composé-S : 11-Désoxycortisol

CRH : corticotrophin-releasing hormone ou corticolibérine

CV : Coefficient de Variation

CVw : within-subject biologic variation.
Variations biologiques intra-individuelles

DHEA : Déhydroandrostènedione

D4 : Deutééré

EEQ : Evaluation externe de la qualité

EI : Etalon Interne

EIA : Enzymoimmunoassay

ELISA : Enzyme-labeled immunosorbent assay

ESI : electrospray ionisation

Et : écart-type

FSH : hormone folliculo-stimulante

GnRH : gonadotropin releasing hormone ou gonadolibérine

H+ : ion hydrogène

HCS : hyperplasie congénitale des surrénales

HPLC : high performance liquid chromatography

HPST : Hôpital Santé Territoire

HRE : hormone responsive element

H₂O : symbole chimique de l'eau

I : Imprécision

IFCC : International Federation of Clinical Chemistry

IGAS : Inspection Générale des Affaires Sociales

ISO : Organisation internationale de normalisation

LBM : laboratoire de biologie médicale

LC-MSMS : liquid chromatography – mass spectrometry / mass spectrometry

LH : hormone lutéinisante

LHRH : Luteinizing Hormone Releasing Hormone

LOD : Level Of Detail (limite de détection)

LOQ : Limit Of Quantification

m : moyenne

MALDI : matrix assisted laser desorption ionization

TOF : time-of-flight

MeOH : méthanol

MSH : pour melanocyt-stimulating hormone

N : nombre d'occurrences

NF (EN) ISO : Norme Française (Européenne) organisation internationale de normalisation

PCR : polymerisation chain reaction

POMC : pro-opiomélanocortine

PTMP : Plateau technique de mesure physique

S : écart-type

SDHA : Sulfate de déhydroandrostènedione

SFBC : société française de biologie clinique

SHBG : sex-hormone binding protein

SH GTA : Santé humaine, Guide Technique d'Accréditation

SPE : solid phase extraction

TOFF : temps de vol

TeBG : testosterone binding protein

RIA : Radioimmunoassay

ROC : Receiver Operating Charactic

UPLC : Ultra Performance Liquid Chromatography

UV : ultraviolet

z : nombre de charges portées par l'ion

HSD : Hydroxysteroid dehydrogenase

17OHP : 17-Hydroxyprogestérone

5DHT : 5-dehydrotestostérone

²H : deuterium

Introduction

Le diagnostic de certaines pathologies endocriniennes passe par le dosage des hormones stéroïdiennes. Ces hormones sont structurellement très proches et diffèrent parfois entre elles par un seul groupement. De plus elles sont dosées à des concentrations très faibles de l'ordre du nano par litre. Leur dosage est donc complexe, car la technique requiert à la fois une bonne sensibilité et une bonne spécificité. Il existe plusieurs techniques de dosage. Le laboratoire d'hormonologie du CHU de Bordeaux emploie pour le dosage du cortisol salivaire et des androgènes sériques une technique RIA (radioimmunoanalyse) c'est-à-dire un immunodosage compétitif utilisant un marquage radioactif des anticorps. Cette technique offre un bon couple sensibilité/spécificité par rapport aux autres techniques immunométriques disponibles sur le marché. Cependant l'utilisation de la radioactivité en laboratoire est délicate et nécessite un personnel formé avec un suivi médical adapté, des locaux spécifiques et une gestion des déchets strictement réglementée. Il s'agit donc de techniques manuelles lourdes et coûteuses. Une autre méthode intéressante est le dosage en LC-MS/MS. Il consiste en une séparation chromatographique des composés d'intérêts puis en une détection et identification des molécules sur un spectromètre de masse, ce qui en fait une technique très spécifique. Certains spectromètres offrent aujourd'hui une sensibilité suffisante pour les dosages des glucocorticoïdes et des androgènes. Suite à l'acquisition au CHU de Bordeaux d'un nouveau spectromètre de masse, les biologistes du laboratoire d'hormonologie ont décidé d'adapter le dosage du cortisol urinaire, du cortisol salivaire et des androgènes à cette nouvelle méthode de dosage.

Ce mémoire vise à présenter la validation de ces dosages, nécessaire pour s'assurer de leur fiabilité avant leur passage en routine. Nous referons donc d'abord des rappels physiologiques sur les hormones stéroïdiennes et nous reverrons l'intérêt des différents dosages présentés. Nous aborderons ensuite les différentes méthodes de dosages utilisées au CHU pour ses composés en expliquant leurs intérêts et limites. Enfin, après avoir replacé le principe des validations des méthodes dans le cadre légal de l'accréditation, nous détaillerons les trois validations effectuées (dosages du cortisol libre urinaire, du cortisol salivaire et des androgènes sériques) en veillant à interpréter les résultats obtenus.

Première partie : Physiopathologie des Glucocorticoïdes et des Androgènes.

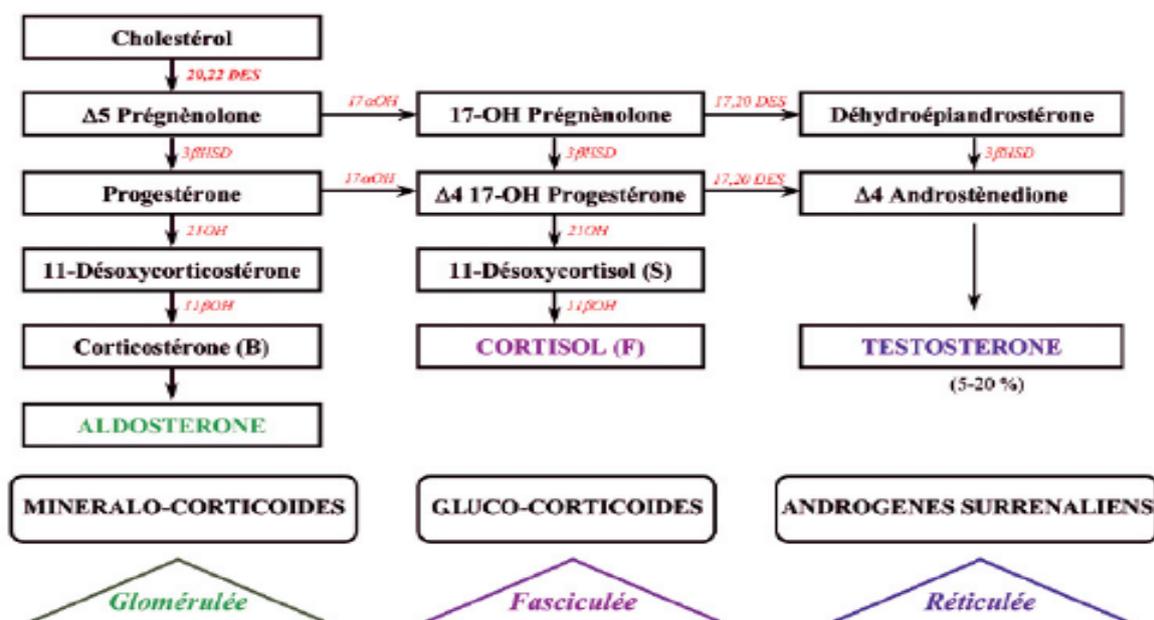
1. Généralités sur les hormones stéroïdiennes

1.1. Stéroïdogénèse : organes producteurs, synthèse.

1.1.1. Les glandes surrénales

La stéroïdogénèse s'effectue en partie au niveau des glandes surrénales. Chacune d'elles est constituée de 2 parties, l'une externe la corticosurrénale, l'autre interne la médullosurrénale (non impliquée dans la synthèse des stéroïdes). La corticosurrénale est composée de 3 types histologiques distincts comprenant un équipement enzymatique différent. La partie externe correspond à la zone glomérulée où s'effectue la synthèse d'un minéralocorticoïde, l'aldostérone. Au milieu, on retrouve la zone fasciculée dont l'équipement enzymatique entraîne la production de glucocorticoïdes de façon majoritaire. Enfin, la partie la plus interne correspond à la zone réticulée où sont principalement produits les androgènes¹.

Plusieurs voies enzymatiques successives permettent d'aboutir aux mêmes composés puisque les enzymes impliquées partagent plusieurs substrats. Il en résulte, au niveau surrénalien, un schéma de synthèse complexe comme décrit en figure 1.



1. CYP11A : 20,22DES (20,22 desmolase)
2. CYP17 : 17 α OH (17 alpha hydroxylase ou Cyt b5) et 17,20 DES (17,20 desmolase)
3. CYP21 : 21OH (21hydroxylase)
4. CYP11B1 : 11 β OH (11 β hydroxylase)
5. 3 β HSD : 3 β hydroxystéroïdedéshydrogénase

Figure 1: Voie de synthèse des stéroïdes de la corticosurrénale

1.1.2. Les organes reproducteurs

Au niveau ovarien, il existe deux voies majeures de synthèse des stéroïdes à partir du cholestérol (figure 2). La voie delta4 et la voie delta5 définies par la position de la double liaison sur le composé formé. Seule la voie delta4 conduit à la synthèse de progestérone, alors que la voie delta5 permet la formation d'androgènes et d'œstrogènes. On assiste à une très faible production d'androgènes par le stroma et par les cellules de la thèque interne. Ces androgènes subissent ensuite une conversion en œstrogènes (notamment œstrone et œstradiol) par une enzyme appelée aromatase, au niveau de la granulosa².

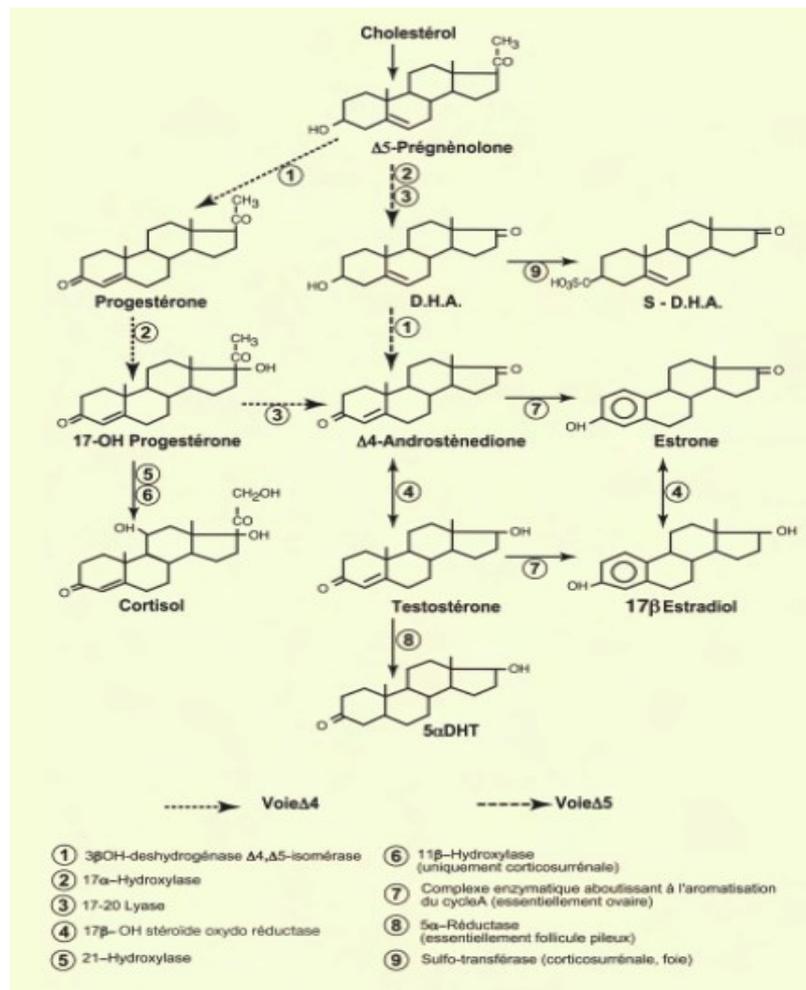
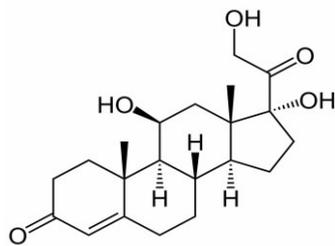


Figure 2 : Voies de synthèse des hormones stéroïdes au niveau ovarien.

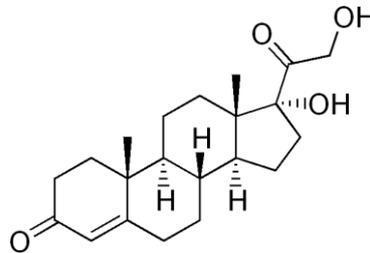
Au niveau testiculaire, le principal androgène synthétisé est la testostérone. Cette synthèse est assurée par les cellules de Leydig^{3,4}.

1.2. Structure des hormones stéroïdiennes

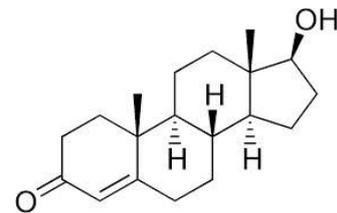
Les hormones stéroïdes, sont synthétisées à partir d'un précurseur commun : le cholestérol. Il s'agit d'une molécule de type cyclopentanoperhydropentane à 17 atomes de carbone, composée de 3 cycles hexane et d'un cyclopentane. Plusieurs dérivés (prégnane, androstane, œstrane) sont synthétisés à partir de ce squelette de base par ajout d'un radical spécifique (hydroxyle, carbonyle, cétonique...). Ils sont caractéristiques d'une famille de stéroïdes particulière. Le noyau prégnane à 21 atomes de carbone est spécifique des minéralocorticoïdes et des glucocorticoïdes, le noyau œstrane à 18 atomes de carbone constitue le squelette de base des œstrogènes, et le noyau androstane (19 atomes de carbone) celui des androgènes. Ainsi les stéroïdes d'une même famille sont structurellement très proches, et certains ne diffèrent entre eux que par un seul radical (exemple cortisol versus cortisone) ce qui rend leur dosage très difficile. Les composés étudiés dans nos validations de méthode sont présentés ci-dessous.



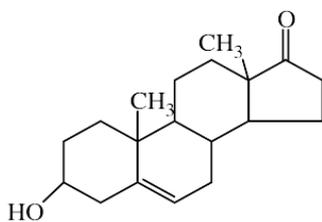
Cortisol



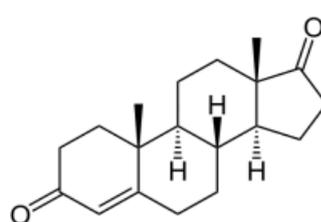
Composé S



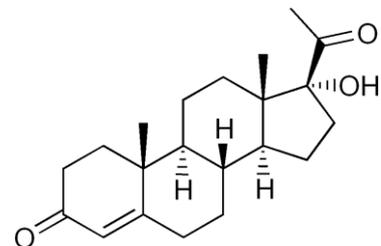
Testostérone



DHEA



Delta4androstènedione



17Hydroxyprogesterone

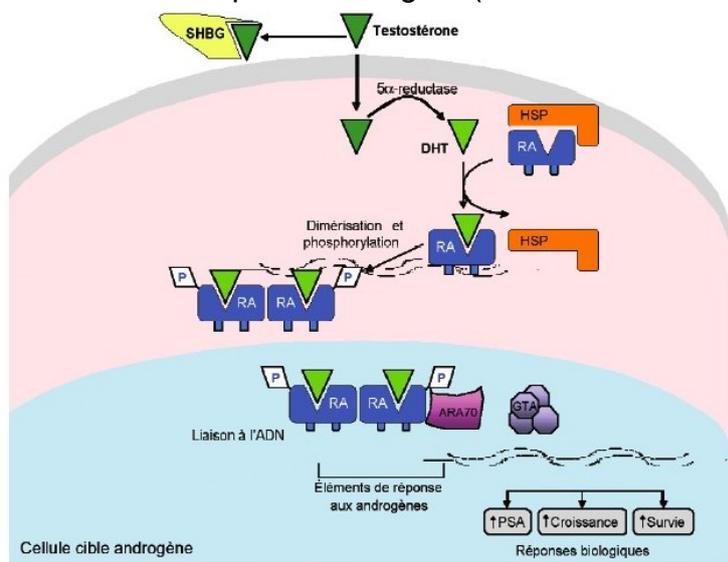
1.3. Transport des hormones stéroïdiennes

Les hormones stéroïdiennes circulent sous différentes formes. Elles sont majoritairement (80-90%) liées à une protéine plasmatique de haute affinité dont l'origine est hépatique : cortisol-binding globulin (CBG)⁴ pour le cortisol et testostérone-binding protein (TeBG) pour la testostérone⁵. Cette liaison est non spécifique. Une fraction plus minoritaire est liée à des protéines avec une plus faible affinité comme l'albumine (10-15% environ) qui en assure la protection : et le reste circule sous forme libre (5%). Cette dernière fraction, du fait de sa lipophilie et d'un passage transmembranaire passif, constitue la forme biologiquement active¹.

1.4. Mécanisme d'action des hormones stéroïdiennes

Les stéroïdes ont un mécanisme d'action particulier dans la transmission du signal. Leur lipophilie leur permet un transfert passif à travers les membranes des cellules cibles. Ils sont ensuite pris en charge par un récepteur peptidique soluble composé de trois régions, l'une (C terminale) permettant sa liaison à l'ADN, une région intermédiaire, et une troisième (N-terminale) impliquée dans la régulation de la transcription. Cette fixation entraîne une dimérisation du complexe récepteur-hormone qui est alors transloqué dans le noyau cellulaire pour ensuite aller se lier à un élément de réponse au signal (HRE = hormone responsive element) présent sur

l'ADN. Cette liaison engendre alors une régulation positive ou négative sur la transcription de l'ADN ciblé et donc un effet cellulaire^{6,7}.



Légende : SHBG= TeBG ; HSP=heat shock protein ; DHT= déhydrotestostérone ; RA = récepteur soluble ;

Figure 3 : Mécanisme d'action des récepteurs nucléaires. Exemple de la testostérone.

1.5. Voies de régulation

La synthèse de cortisol est sous la dépendance de la sécrétion d'ACTH (aussi appelée hormone corticotrope, corticostimuline, ou encore adrénocorticotrophine). L'ACTH est une hormone polypeptidique issue d'un propeptide le POMC (pro-opiomélanocortine) commun à plusieurs hormones dont la mélanocortine (MSH pour melanocyt-stimulating hormone). Elle est sécrétée de façon pulsatile par l'antéhypophyse. L'ACTH est elle-même sous la dépendance d'une hormone hypothalamique la CRH (corticotrophin-releasing hormone ou corticolibérine). Par ailleurs le cortisol exerce un rétrocontrôle négatif sur l'axe hypothalamohypophysaire^{1,8}.

La sécrétion de la testostérone est sous la dépendance de deux hormones peptidiques antéhypophysaires : la LH (hormone lutéinisante) et la FSH (hormone folliculo-stimulante), elles-mêmes sous la dépendance d'une hormone hypothalamique : la GnRH (gonadotropin-releasing hormone ou gonadolibérine) ou LHRH (pour luteinizing hormone-releasing hormone). Cet axe est ensuite régulé par rétrocontrôle négatif⁷.

La 17hydroxyprogestérone, 11 désoxycortisol (composé S), DHEA, et la delta4androstènedione sont, comme pour le cortisol, sous la dépendance de l'ACTH.

1.6. Métabolisme et élimination

Le cortisol et les androgènes sont essentiellement éliminés au niveau rénal. La majeure partie est excrétée sous forme de métabolites après transformation hépatique¹.

Pour le cortisol, il s'agit, en majeure partie, de dérivés hydrogénés qui ensuite subissent ou non une étape de conjugaison (obtention de dérivés glucuroconjugés)⁹. Le reste est éliminé sous forme libre (environ 1%) dont une partie est réabsorbée. La cortisone est un métabolite du cortisol, la conversion « cortisol/cortisone » est assurée par une enzyme présente dans différents tissus comme le rein et les glandes salivaires : la 11 β HSD2 (11 β oxo-réductase)^{4,10}. La

conversion inverse est réalisée par la 11 β HSD1 (11 β deshydrogénase) isoforme de la première^{11,12}. Une partie du cortisol libre est aussi sécrétée au niveau salivaire⁴.

Pour la testostérone, il s'agit principalement de métabolites conjugués, mais une faible quantité est aussi excrétée sous forme libre. Elle est aussi transformée en composés actifs. Le principal est la 5-dihydrotestostérone (5-DHT) obtenue après action de la 5- α -hydroxylase, ce métabolite est responsable de l'effet biologique attribué à la testostérone. Chez l'homme, principalement au niveau du tissu adipeux, l'aromatase est responsable de la transformation de la testostérone en œstradiol. Enfin, une faible quantité de testostérone est métabolisée au niveau cutané et éliminée par sudation⁷.

2. Glucocorticoïdes

2.1. Effets

Le cortisol a plusieurs effets notamment cataboliques sur les métabolismes protéiques, lipidiques, glucidiques et osseux. Il s'agit d'une hormone de stress car elle permet ainsi la mobilisation de toutes les réserves de l'organisme par le biais de la lipolyse, de la glycogénolyse et le catabolisme des protéines¹.

2.2. Variations physiologiques

La sécrétion de cortisol suit un rythme nyctéméral avec une sécrétion maximale quelques minutes avant le lever, diminuant durant la journée pour finalement être minimale aux alentours de minuit⁴. Ce rythme circadien peut être inversé chez les gens travaillant de nuit. Sa sécrétion est augmentée en cas de stress physiologique tel que les infections ou les traumatismes, mais aussi dans les stress psychologiques. Ainsi les prélèvements sanguins en vue d'analyses sont effectués à des heures précises et une augmentation isolée de la cortisolémie n'est pas significative.

2.3. Pathologie

2.3.1. Excès de cortisol

2.3.1.1. Clinique

Le cortisol a des effets catabolisants et son excès entraîne des signes cliniques bien définis sous le terme de Syndrome de Cushing. Cliniquement, le

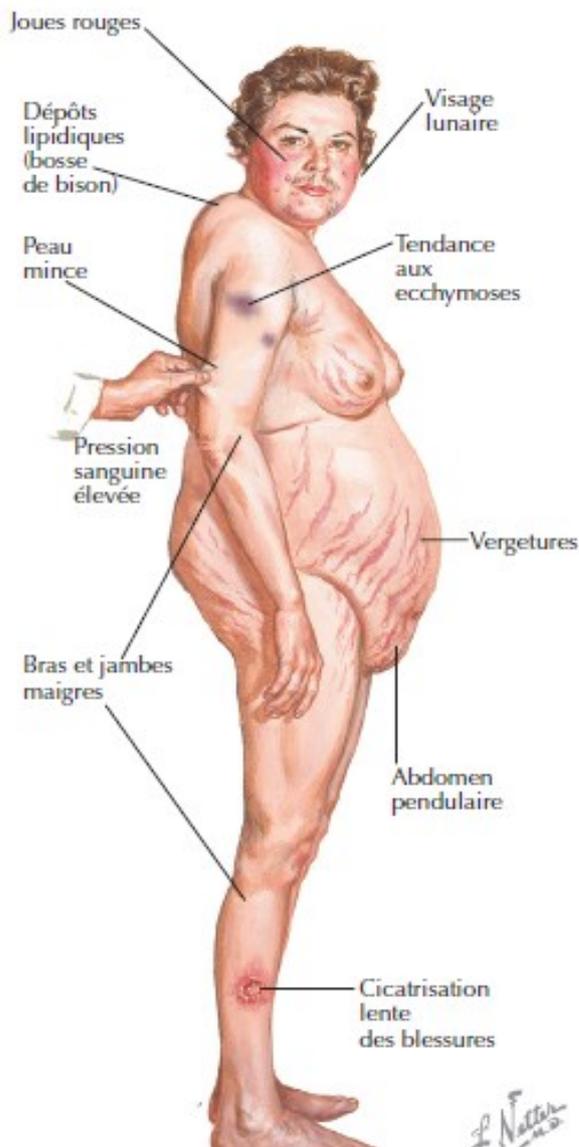


Figure 4 : Illustration du syndrome de Cushing

patient présente une anomalie de la répartition des graisses avec une obésité facio-tronculaire caractérisée par la typique bosse de bison. La protéolyse se manifeste par un amincissement des bras et des jambes ainsi qu'une peau fine avec une tendance à l'ecchymose, une mauvaise cicatrisation, et la présence de vergetures pourpres. L'augmentation de la gluconéogenèse et la baisse de la glycogénolyse entraînent une hyperglycémie qui se manifeste par une intolérance au glucose voire par un diabète. Le catabolisme osseux est lui aussi augmenté engendrant une ostéoporose. Par entraînement, l'excès d'hormones surrénaliennes est plus généralisé. L'augmentation des minéralocorticoïdes donne une

tendance à l'hypertension, à l'œdème et à l'hypokaliémie. L'hyperandrogénie se manifeste surtout chez la femme avec un hirsutisme, une acné et parfois une aménorrhée. Enfin, le cortisol a un effet immunosuppresseur et anti-inflammatoire ce qui conduit à un risque infectieux accru⁸.

2.3.1.2. Etiologies

Les étiologies du syndrome de Cushing sont classées en deux catégories : celles dépendantes de la sécrétion d'ACTH (70% des cas d'hypercorticismes) et celles qui en sont indépendantes (30% des cas)^{1,13,14}.

Parmi les étiologies dépendantes de l'ACTH, 80% sont dues à une hypersécrétion hypophysaire⁸. Le cas le plus fréquent est l'adénome hypophysaire qui correspond à la « maladie de Cushing ». Les 20% restants concernent les hypercorticismes liés à une sécrétion ectopique d'ACTH le plus couramment rencontrés dans les syndromes paranéoplasiques du cancer du poumon à petites cellules par exemple^{1,13}.

Les hypercorticismes indépendants de l'ACTH sont dits primaires ou d'origine basse car c'est la surrénale seule qui est à l'origine de l'augmentation de cortisol. Il s'agit, la plus part du temps, d'un adénome surrénalien ou plus rarement d'un corticosurréalome¹.

La diversité des mécanismes à l'origine de ce syndrome est telle que le diagnostic étiologique du syndrome de Cushing est parfois difficile.

2.3.2. Défaut de cortisol

2.3.2.1. Clinique

L'insuffisance surrénalienne peut être lente comme dans la maladie d'Addison. Elle peut aussi être aiguë sur fond, ou non, d'insuffisance chronique déclenchée par une situation de stress. L'insuffisance lente s'installe de façon insidieuse et a pour principaux signes cliniques la perte de poids, une asthénie accompagnée de faiblesses musculaires, et certains signes comme l'hypotension orthostatique, liés au déficit en minéralocorticoïdes qui y est souvent associé.

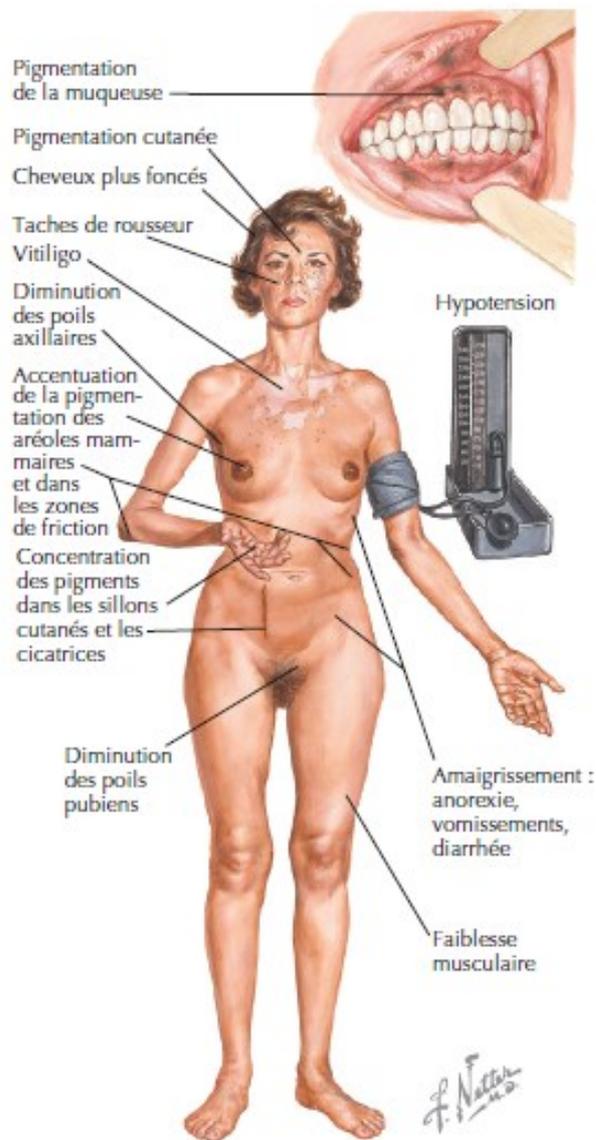


Figure 5 : Illustration d'un défaut de cortisol

L'insuffisance surrénalienne basse s'accompagne d'une pigmentation cutanée augmentée (pigmentation des zones de friction, aréoles mammaires) contrairement à l'insuffisance surrénalienne haute¹⁵. En effet, la diminution en cortisol entraîne une levée du rétrocontrôle inhibiteur hypothalamohypophysaire ce qui provoque une augmentation de la synthèse d'ACTH et donc de MSH puisque celles-ci partagent le même propeptide (la POMC)⁸.

Des épisodes d'insuffisance surrénalienne aiguë peuvent survenir lorsque le besoin en cortisol augmente comme dans les situations de stress aigu. Cette insuffisance surrénalienne peut être découverte de façon fortuite lors d'un bilan de routine qui révèle une

hyperkaliémie liée à la baisse de minéralocorticoïdes ou lors d'une situation de stress « physiologique » comme un épisode infectieux ou un traumatisme. Elle se manifeste alors par un choc, avec hypotension, hypoglycémie, acidose et hyperkaliémie. L'insuffisance surrénalienne aiguë peut mettre en jeu le pronostic vital du patient, c'est pourquoi un diagnostic en amont est indispensable⁸.

2.3.2.2. Etiologies

Les étiologies d'insuffisance surrénalienne peuvent être présentées de deux façons :

Celles d'origine haute (dites secondaires) par rapport à celles d'origine basse (dites primaires). Les insuffisances surrénaliennes primaires peuvent être liées, par exemple, à une atteinte lésionnelle bilatérale des surrénales (hémorragie), à une atteinte auto-immune (on parle alors de maladie d'Addison)⁸ ou infectieuse (tuberculose), ou encore liée à un déficit enzymatique comme le déficit en 21hydroxylase dans le cas de l'hyperplasie congénitale des surrénales. Les causes d'insuffisance d'origine haute, sont nombreuses. Le plus souvent, il s'agit d'une mise au repos de l'axe hypothalamo-hypophysaire par rétrocontrôle négatif dû à la prise de glucocorticoïdes de synthèse, ou d'une cause iatrogène (hypophysectomie, radiothérapie, engendrant un panhypopituitarisme), ou encore d'une tumeur hypothalamohypophysaire^{1,15}.

Celles conduisant à des insuffisances surrénaliennes lentes (maladie de Addison, HIV) versus celles donnant des insuffisances aiguës (décompensation d'une maladie d'Addison liée à un stress, lésions ou hémorragie bilatérale des surrénales, rupture de la tige pituitaire lors d'un accident, infection aiguë, arrêt brutal d'une corticothérapie au long court...).

3. Androgènes

3.1. Rôles physiologiques

De façon générale, les androgènes ont un effet anabolisant au niveau cutané, osseux et musculaire. Ils ont un rôle chez l'homme dans la différenciation et le développement des organes génitaux. Chez la femme, ils induisent un développement du clitoris et de certains caractères sexuels secondaires comme la pilosité.

3.2. Pathologies associées :

3.2.1. Hyperandrogénie

L'hyperandrogénie se définit par une augmentation de la concentration en androgènes circulants. Les manifestations cliniques dépendent de l'âge d'apparition

de celle-ci et du sexe de l'individu. Chez la femme adulte, elle se manifeste typiquement par un hirsutisme (définie par une augmentation de la pilosité dans des zones normalement masculines, comme le menton par exemple)¹⁶, une acné ou une séborrhée, une hypersudation, une alopécie androgénique et des troubles menstruels, bien sûr à des degrés variables et qui ne sont pas forcément corrélés à la concentration d'androgènes circulants¹⁶. Chez l'homme adulte, elle est moins détectable.

Chez les nouveau-nés, la détection de cette hyperandrogénie est importante car son étiologie la plus fréquente est l'hyperplasie congénitale des surrénales qui expose à un risque d'insuffisance surrénalienne aiguë et de décès de l'enfant par choc hypovolémique (confère infra). Chez la petite fille nouveau-née, elle se manifeste par un développement des organes génitaux anormal à type d'hypertrophie clitoridienne, ambiguïté sexuelle voire hermaphrodisme. Chez le petit garçon nouveau-né, la détection est bien plus difficile car il n'y a pas de problème d'identification sexuelle.

Chez le petit garçon avant la puberté, on observe une puberté précoce avec développement des caractères sexuels secondaires comme la pilosité, l'augmentation du volume testiculaire, la rauçité de la voix. Le problème majeur à ce niveau réside dans un arrêt de croissance de l'enfant.

3.2.2. Etiologies

3.2.2.1. Hyperplasie congénitale des surrénales (HCS)

L'HCS consiste en un déficit en l'un des enzymes impliqués dans la voie de synthèse des glucocorticoïdes. Le déficit le plus fréquent est celui en 21Hydroxylase, vient ensuite le déficit en 11 β HSD puis celui en 3 β HSD¹⁷. Ce déficit peut être partiel ou total selon si l'atteinte concerne un ou les deux allèles du gène codant pour l'enzyme. Il en résulte une diminution de la synthèse en cortisol et une augmentation des précurseurs formés au-dessus du bloc, du fait de l'absence de métabolisation en aval et d'un excès de production en amont lié à la levée du rétrocontrôle exercé par le cortisol sur l'axe hypothalamohypophysaire. La surrénale est ainsi constamment stimulée et on observe une tendance à l'hypertrophie de celle-ci, ce qui explique le nom de cette pathologie. On observe donc une augmentation des androgènes par

augmentation des précurseurs situés en amont, et une diminution du cortisol en aval du bloc. Par ailleurs, ces enzymes étant communes aux différentes voies de synthèse, celle des minéralocorticoïdes est elle aussi bloquée, on observe alors une baisse de l'aldostérone circulante partiellement compensée par une augmentation de la stimulation du système rénine angiotensine. Cette compensation reste insuffisante et le risque est majeur dans le cas d'un bloc enzymatique total car il y a un risque de perte en eau et en sels avec possible décès par choc hypovolémique. C'est pourquoi le diagnostic doit être précoce avec un dépistage réalisé grâce au dosage de la 17OHP¹⁷ dans un échantillon de sang séché sur buvard à J3 après la naissance. Un bloc total se manifeste le plus souvent à la naissance tandis que le bloc partiel peut rester inconnu jusqu'à l'adolescence voir parfois l'âge adulte.

3.2.2.2. Syndrome des ovaires polykystiques

Il s'agit d'une cause d'hyperandrogénie non surrénalienne¹⁶. Chez la femme adulte, il s'agit de la cause d'hyperandrogénie la plus fréquente. Il est responsable d'environ 80% des hyperandrogénies mais doit demeurer un diagnostic d'exclusion. Il s'agit d'un dérèglement de la stéroïdogénèse des cellules thécales ovariennes, associant hyperandrogénie, trouble du cycle menstruel et aspect micropolykystique des ovaires.

3.2.2.3. Autres

En ce qui concerne les autres étiologies, il peut s'agir de tumeurs surrénaliennes ou ovariennes, d'un syndrome de Cushing, de causes iatrogènes, ou encore d'hirsutisme idiopathique¹⁶.

3.2.3. Hypogonadisme masculin

L'hypogonadisme peut avoir 2 origines : l'insuffisance testiculaire et l'insuffisance gonadotrope. Il se manifeste par une insuffisance de la concentration d'androgènes circulants, dont la testostérone. L'insuffisance testiculaire est une insuffisance basse ; on assiste donc à une augmentation réactionnelle de la LH et de la FSH. A l'inverse, l'insuffisance gonadotrope est d'origine centrale on observe alors une baisse des hormones hypophysaires LH et FSH⁵. Elle se manifeste entre autre par une tendance à l'asthénie, une baisse de la libido, et une infertilité¹⁷. Parmi les étiologies on retrouve celles des insuffisances hypothalamohypophysaires (iatrogène

post-chirurgicale ou post-radiothérapie, les adénomes, les hyperprolactinémies, les craniopharyngiomes [...]), pour les insuffisances hautes. Pour les insuffisances testiculaires, on retrouve des anomalies primitives, et le vieillissement.

4. Place des dosages étudiés dans la démarche diagnostique

La démarche diagnostique des hypocorticismes ou des hypercorticismes est complexe. Elle s'appuie sur les dosages du cortisol et de l'ACTH à des heures précises, sur l'étude du cycle nyctéméral et sur des tests dynamiques de stimulation et de freinage afin d'évaluer la qualité de la réponse de l'axe hypothalamohypophysaire^{1,13}. Ce mémoire étant axé sur la validation de certains dosages, seul ceux-ci seront développés. En conséquence cette démarche ne sera pas d'avantage explicitée ici. Les méthodes de dosage de ces composés seront décrites en partie 2.

4.1. Dosages du cortisol

4.1.1. Cortisol libre urinaire

4.1.1.1. Intérêts

Le cortisol non métabolisé étant éliminé au niveau rénal, le dosage du cortisol libre urinaire (CLU) sur un recueil des urines de 24h permet d'avoir une vision globale de la synthèse de cortisol sur une journée en s'affranchissant des variations liées au stress ponctuel et au rythme circadien¹⁸. Ce dosage est d'autant plus intéressant qu'il est très sensible dans le diagnostic des syndromes de Cushing. En effet, la liaison du cortisol à la CBG est saturable. Quand la concentration en cortisol augmente, sa part libre augmente et l'excrétion du CLU augmente d'autant. C'est donc une analyse de choix dans la recherche d'un hypercorticisme. La limite majeure de ce dosage reste sa spécificité^{6,19} car les urines contiennent de nombreux métabolites qui provoquent des réactions croisées avec le dosage du cortisol, notamment par technique immunologique, et donc une surestimation du résultat du dosage¹⁷. Un prétraitement par purification ou extraction est donc indispensable^{1,4}.

4.1.1.2. Conditions pré analytiques

Le recueil des urines sur les 24h doit être le plus complet possible afin de ne pas sous-estimer le résultat du dosage. Pour augmenter la fiabilité du résultat un

rapport CLU/créatininurie peut être calculé afin de s'affranchir des variations liées à la diurèse⁴ (notamment chez les enfants). Les urines doivent être conservées au frais et centrifugées avant analyse. Par la suite, elles pourront être stockées à -20°C pendant 1 à 3 mois selon les auteurs^{6,19}.

4.1.2. Cortisol salivaire

4.1.2.1. Intérêts

Le principal intérêt du dosage du cortisol salivaire est le diagnostic du Syndrome de Cushing^{4,13}. Le cortisol salivaire représentant la fraction libre du cortisol total, son dosage permet d'écarter certains faux hypercorticismes liés à une élévation du taux de protéines porteuses comme on l'observe en cas d'augmentation de la concentration en œstrogènes (contraception œstroprogestative ou grossesse) par exemple. La sécrétion dans la salive du cortisol n'est pas influencée par le débit de sécrétion salivaire⁹. Le recueil du cortisol salivaire se fait à l'aide de « salivettes »¹⁰, il s'agit d'un prélèvement simple⁹ et non invasif ce qui permet un auto prélèvement par le patient à domicile. Ceci évite ainsi un surcoût d'hospitalisation mais aussi l'effet stress lié à la « blouse blanche » et donc des hypercortisolémies réactionnelles⁴. Ces prélèvements du fait de leur facilité peuvent ainsi être répétés afin d'obtenir une meilleure fiabilité des résultats.

4.1.2.2. Conditions préanalytiques

Le recueil se fait à l'aide d'une salivette. Ce dispositif médical est constitué d'un tube de recueil qui contient une mousse que le patient doit mastiquer. Ce prélèvement doit être standardisé. Il est conseillé au patient d'effectuer le prélèvement plusieurs jours de suite, au repos et avant le coucher, en dehors de toute situation de stress et à distance d'un repas, brossage de dents ou consommation de chewing-gum^{12,20,21}. Il doit être effectué entre 23h et minuit⁹ pour le diagnostic d'un syndrome de Cushing. En effet, le cortisol salivaire suit les variations nyctémérales, avec un nadir en milieu de nuit qui constitue le point le plus sensible en termes d'intérêt diagnostique. La salivette une fois utilisée doit être congelée et amenée au frais au laboratoire qui à son tour la conservera à +4°C ou à -20°C avant analyse. Le cortisol salivaire offre une excellente stabilité même après

plusieurs cycles de congélation-décongélation. L'échantillon doit ensuite être centrifugé et extrait avant analyse²⁰.

4.2. Dosage des androgènes

Il s'agit le plus fréquemment de détecter une hyperandrogénie ou un hypogonadisme par l'étude d'un profil hormonal général.

4.2.1. Composés : intérêts du dosage en pathologie

4.2.1.1. Testostérone

La testostérone circule donc dans l'organisme sous 3 formes principales. Ainsi plusieurs types de dosages peuvent être réalisés : la testostérone totale, la testostérone libre et la testostérone biodisponible⁷ pour les cellules cibles (c'est-à-dire la testostérone libre et la fraction liée à l'albumine du fait de la réversibilité de la liaison⁵). L'intérêt principal est le diagnostic d'hypogonadisme alors que la concentration en testostérone totale est dans les normes. En effet, dans certains cas on peut observer une augmentation de la concentration en protéines porteuses de haute affinité au détriment d'une diminution de la forme biodisponible (au cours du vieillissement par exemple). Seul le dosage de la testostérone totale a été adapté à la spectrométrie de masse, sa validation sera développée en partie 3.

4.2.1.2. 11-Désoxycortisol (Composé-S), et 17-Hydroxyprogestérone (17OHP)

La 17OHP et le composé S sont deux précurseurs dans la voie de synthèse du cortisol. La première provient de la transformation de la 17-hydroxyprégnélonone par la 3-bêta-hydroxystéroïde déshydrogénase (3 β -HSD), elle-même ensuite métabolisée par la 21-hydroxylase en 11 désoxycortisol. L'étude de ces précurseurs dans un bilan surrénalien permet de mettre en évidence certains blocs enzymatiques (déficit en 21-hydroxylase pour la 17OHP, et déficit en 11 β -HSD pour le composé S) dans le cadre de l'hyperplasie congénitale des surrénales (HCS).

Par ailleurs, le dosage du 11 désoxycortisol est effectué dans le test dynamique à la métopirone (Metyrapone). Celui-ci explore le bon fonctionnement de l'axe hypothalamus-hypophyse-surrénale et du rétrocontrôle exercé par le cortisol. La métopirone bloque normalement la 11 β hydroxylase empêchant la conversion du

11 désoxycortisol en cortisol. On assiste à une baisse du cortisol circulant, à une levée du rétrocontrôle négatif qu'il exerce, et donc à une augmentation de l'ACTH et par conséquent du composé S dont la synthèse est ainsi stimulée. Une mauvaise réponse à ce test est en faveur d'une rupture de la régulation de l'axe marquée par une insuffisance surrénalienne primaire (ACTH élevé et Composé S bas) ou hypothalamique ou hypophysaire (ACTH et Composé S bas). D'autres dosages sont alors nécessaires à cette identification.

4.2.1.3. Déhydroandrostènedione = DHEA ; Delta-4-androstènedione

La DHEA et la delta-4-androstènedione sont deux précurseurs dans la chaîne de synthèse menant à la testostérone. La delta-4-androstènedione est obtenue après conversion de la DHEA par la 3- β HSD. La DHEA est l'androgène produit en plus grande quantité par la corticosurrénale. La DHEA a longtemps été étudiée comme un facteur dans la lutte contre le vieillissement, mais ces données sont très controversées²². En effet, la concentration de la DHEA varie avec l'âge avec une augmentation jusqu'à 20 à 30 ans puis diminue progressivement jusqu'à atteindre 20% de sa valeur initiale à l'âge de 70 ans. Elle constitue chez la femme, l'androgène le plus représenté. Le dosage de ces deux composés est réalisé dans la recherche de blocs enzymatiques, tandis que le dosage de la delta4androstènedione est demandé dans les diagnostics d'hirsutisme et d'hyperandrogénie chez la femme.

4.2.2. Conditions préanalytiques

Il n'y a pas de conditions pré analytiques spécifiques en RIA. Il peut s'agir d'un échantillon sérique ou plasmatique. Par contre, en spectrométrie de masse, la question se posera quant à l'utilisation de tubes secs gélosés sur l'apparition d'éventuelles interférences.

Seconde Partie : Présentation des techniques de dosages des glucocorticoïdes et des androgènes surrénaliens au laboratoire

Les dosages des androgènes (testostérone, 11 désoxycortisol, et 17-hydroxyprogestérone, DHEA, delta-4-androstènedione) réalisés au laboratoire correspondent à des techniques RIA (RadioImmuno Assay, dosages compétitifs utilisant un antigène radiomarqué). Les dosages de la 17-Hydroxyprogestérone, du DHEA sont précédés d'une étape d'extraction liquide-liquide au dichlorométhane afin d'améliorer leur spécificité. Celui de la delta-4-androstènedione est précédé d'une étape d'extraction de type SPE (solid phase extraction).



Figure 6 : spectromètre de masse et système chromatographique du Quattro micro de WATERS

Le CLU est actuellement dosé sur l'analyseur Quattro-micro. Il s'agit d'un spectromètre de masse en tandem de chez Waters. Il combine un système HPLC à un spectromètre de masse. Cette analyse est précédée d'une étape d'extraction liquide-liquide au dichlorométhane.

Le cortisol salivaire est dosé en méthode RIA par compétition.

1. Rappels sur les techniques de dosages utilisées au laboratoire

1.1. Méthodes immunologiques

L'immunodosage exploite le principe fondamental de la liaison antigène-anticorps. Il existe deux principes de dosages : les méthodes compétitives et les méthodes sandwich. La réaction est ensuite révélée par différents marqueurs qui peuvent être radioactifs, enzymatiques, fluorescents ou luminescents. La technique de dosage RIA fait appel à un marquage radioactif à l'iode 125 de l'antigène en compétition²³.

Le principe de ces méthodes dites compétitives (ou indirectes) est le suivant : l'antigène à doser est mis en compétition avec un antigène identique marqué et ajouté en excès, vis-à-vis d'un anticorps spécifique²⁴ fixé sur la paroi du tube de réaction. L'anticorps doit être en quantité limitante. A la fin de la réaction, les complexes antigène-anticorps formés sont donc liés à la paroi du tube et le surnageant est aspiré et éliminé. Le tube contenant le complexe antigène-anticorps est ensuite passé devant un compteur à scintillation. La concentration de l'analyte est alors inversement proportionnelle à celle du signal mesuré (en coups par minute)²⁴. La mesure

de cette concentration est réalisée grâce au report de la valeur du signal sur une courbe de calibration. Cette courbe de calibration est élaborée de la manière suivante : une solution mère de concentration en antigène non marqué est diluée et ces dilutions subissent ensuite la même réaction que l'échantillon, le signal mesuré est ainsi corrélé à une concentration connue d'antigène.

Concernant le dosage des stéroïdes, seule une méthode compétitive²⁴ est possible, en effet les méthodes dites sandwich supposent la présence sur la molécule d'au moins deux épitopes pour permettre la reconnaissance par les deux anticorps, ce qui n'est pas le cas pour des petites molécules.

1.2. Phase de prétraitement de l'échantillon : l'extraction

Les hormones stéroïdiennes ayant des structures très proches, on observe un certain pourcentage de réactions croisées, surtout dans les immunodosages. Ainsi, certaines techniques, par manque de spécificité peuvent conduire à une surestimation de l'analyte dosé. C'est pourquoi, elles sont parfois précédées d'une phase d'extraction¹. Le principe d'extraction, consiste comme son nom l'indique à extraire l'analyte d'intérêt de l'échantillon initial. Par opposition, l'étape de purification

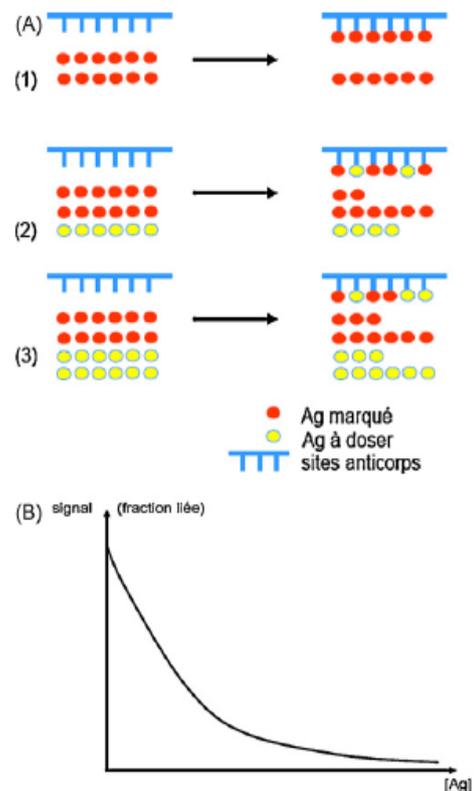


Figure 7 : Technique de d'immunodosage compétitive.

élimine de l'échantillon les composés pouvant interférer. Par ailleurs, une telle étape est indispensable dans les techniques de chromatographie afin d'éliminer les composés susceptibles d'encrasser les colonnes (lipides, protéines...).

Le mode d'extraction peut être de deux types : extraction liquide-liquide ou extraction en phase solide (SPE). La première met en jeu deux phases liquides non miscibles. Il s'agit le plus souvent d'une phase aqueuse (l'échantillon) et d'une phase organique (le liquide d'extraction). L'analyte doit avoir une solubilité supérieure dans le liquide d'extraction. Cette propriété d'un analyte pour deux liquides donnés est appelée coefficient de partage. Il peut être influencé par modification du pH du milieu, qui en jouant sur les propriétés acido-basiques de la molécule permet de modifier son état ionisé (plus hydrophile) ou non ionisé (plus hydrophobe). Les deux phases sont agitées afin de provoquer une émulsion et permettre le transfert de la molécule d'une phase à l'autre. Après décantation la phase aqueuse est rejetée et le composé est récupéré dans la phase organique pour dosage. Plusieurs étapes d'extraction peuvent être réalisées²⁵.

L'extraction de type SPE repose sur la propriété du composé à s'adsorber sur une surface solide. L'échantillon est déposé sur une cartouche d'extraction constituée d'une surface apolaire et poreuse de silice greffée de radicaux C8 ou C18. Il est aspiré à travers celle-ci, une partie des composés est ainsi retenue sur la cartouche : il s'agit de la phase de chargement de la colonne. Une phase de lavage, destinée à décrocher les autres molécules que celle d'intérêt est ensuite réalisée. Enfin, une phase d'élution de l'analyte est effectuée pour analyse (grâce à un liquide souvent organique dans lequel l'analyte est très soluble).

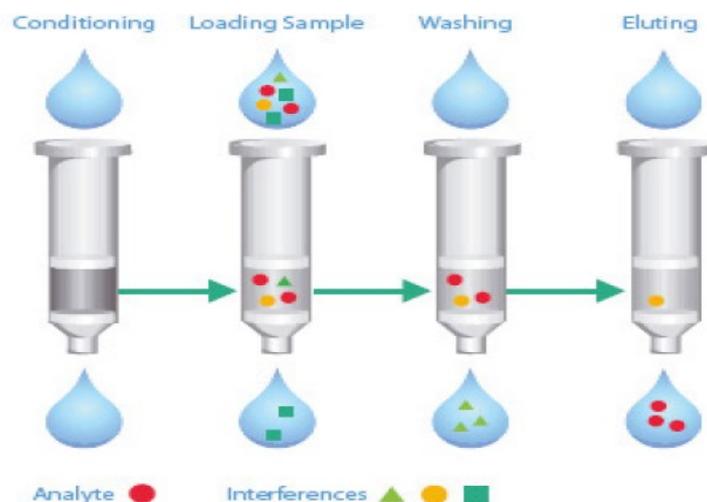


Figure 8 : Principe de l'extraction SPE.

La qualité d'une extraction est appréciée par le calcul de son rendement (pourcentage d'analyte réellement extrait, c'est-à-dire recueilli dans l'éluat).

Dans nos techniques, l'extraction réalisée est de type SPE sur des plaques 96 puits HBL de WATERS et les étapes d'aspiration sont effectuées sur des systèmes d'aspiration par création d'un vide comme présenté sur la photographie.



Figure 9 : Plaque SPE 96 puits et système d'aspiration de chez Waters.

2. Nouvelle méthode de dosage : chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse en tandem (LC-MS/MS)

2.1. La chromatographie :

Le principe de la chromatographie est le suivant : deux phases sont mises en contact, une phase dite stationnaire (fixe) et une phase mobile. Dans le cas de notre technique, la phase stationnaire est constituée de microbilles de silice auxquelles sont fixés des radicaux carbonés à 8 atomes de carbone ce qui la rend apolaire. La phase mobile est polaire et faite d'un mélange d'acétate d'ammonium 0,1M et d'acetonitrile. La phase mobile contenant l'échantillon est alors injectée à travers la phase stationnaire qui est contenue dans un fin capillaire appelé colonne de chromatographie. Selon leurs propriétés, les molécules sont plus ou moins retenues et mettent plus longtemps à traverser le capillaire. Il s'agit donc d'une technique de séparation. Chaque molécule traverse la colonne avec un temps qui lui est propre, appelé temps de rétention. Dans des conditions standardisées, ce temps est caractéristique de la molécule d'intérêt et contribue à son identification. L'injection des composés étudiés dans le chromatographe nécessite leur extraction préalable de l'échantillon biologique.

L'HPLC (chromatographie en phase liquide à haute performance) est une chromatographie en phase liquide qui utilise une colonne de très faible porosité dans laquelle l'échantillon doit être injecté à haute pression. Cette caractéristique la rend

plus discriminante et permet d'améliorer la résolution du système. L'U(H)PLC (chromatographie en phase liquide à ultra haute performance) exploite le même principe et est encore plus résolutive.

L'appareil de chromatographie se compose d'un système permettant l'injection de l'échantillon, d'une pompe permettant l'entrée de l'analyte en solution dans la colonne, de la colonne elle-même, le tout couplé à un détecteur (ici un spectromètre de masse) et un système informatique permettant de visualiser puis ensuite traiter les données.

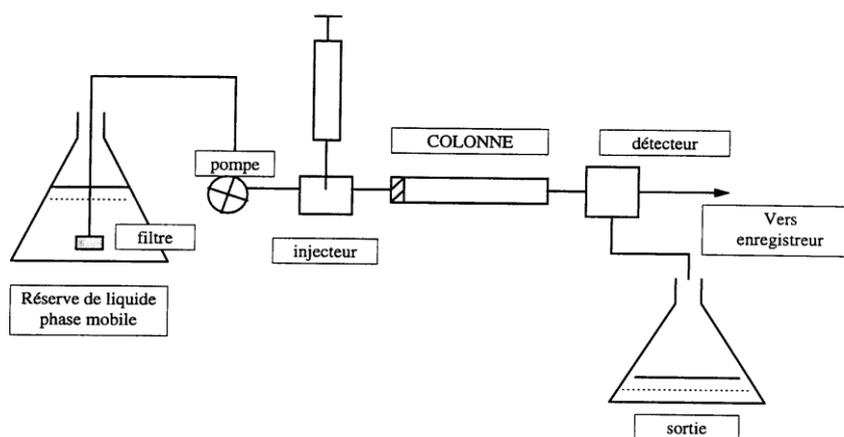


Figure 10 : Composants d'un appareil de chromatographie liquide.

2.2. La spectrométrie de masse :

La spectrométrie de masse est une technique d'identification et de quantification de composés selon leur masse moléculaire. L'échantillon est introduit dans une source qui permet d'abord son évaporation puis son ionisation. Les ions moléculaires formés sont ensuite accélérés, séparés selon leur rapport m/z (z représentant le nombre de charges portées par l'ion et m la masse moléculaire de celui-ci) avant d'être fragmentés pour obtenir l'ion fils qui est ensuite détecté par l'analyseur²⁶.

L'ionisation : Il existe plusieurs sources d'ionisation, la première utilisée dans nos analyseurs pour le dosage du cortisol libre urinaire et salivaire est une source ESI (ElectroSpray Ionization). L'electrospray consiste à ioniser les espèces présentes en solution dans un capillaire en appliquant un champ électrique sur celui-ci, et à faire migrer une partie des ions chargés identiquement à l'extrémité du capillaire afin d'y provoquer la formation d'un cône qui donnera ensuite un fin filament puis de fines

gouttelettes. L'échantillon est alors pulvérisé, et un flux de gaz neutre à contrecourant vient ensuite provoquer l'évaporation des gouttelettes ce qui a pour effet de libérer les ions qu'elles contiennent²⁷.

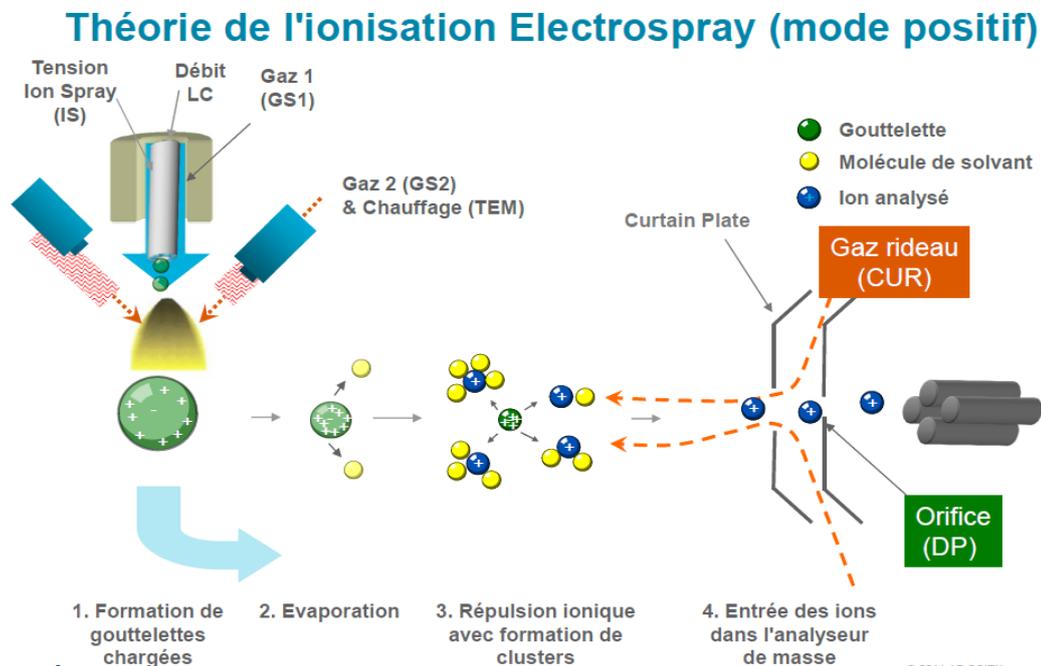


Figure 11 : Principe de l'électrospray.

La seconde source d'ionisation utilisée est une source APCI (pour Atmospheric Pressure Chemical Ionization). Il s'agit d'une technique d'ionisation dans la phase gazeuse. Le principe est le suivant : l'échantillon provenant de la colonne de chromatographie est nébulisé à l'aide d'azote gazeux et vaporisé à des températures élevées (500°C). Une électrode (appelée corona) permet l'ionisation du gaz N₂ en plusieurs espèces radicalaires (positives ou négatives selon la tension appliquée). Les radicaux d'azote formés réagissent ensuite chimiquement avec les molécules présentes dans l'échantillon nébulisé, qu'il s'agisse de l'analyte ou du solvant le contenant. Des réactions chimiques se produisent ensuite entre le solvant et l'analyte qui est ainsi ionisé²⁶. L'intérêt de l'ionisation APCI par rapport à l'electrospray est que l'ionisation s'effectue en phase gazeuse à très haute température. Ainsi la phase mobile où se trouve l'échantillon à la sortie de la colonne est éliminée, ce qui limite les interférences à l'origine du bruit de fond détecté par le spectromètre. Ce mode d'ionisation permet donc d'augmenter la sensibilité de

l'analyseur, c'est pourquoi il est recommandé pour le dosage des stéroïdes. Cette source d'ionisation est présente sur le Q-trap et a été utilisée dans nos méthodes pour le dosage des androgènes.

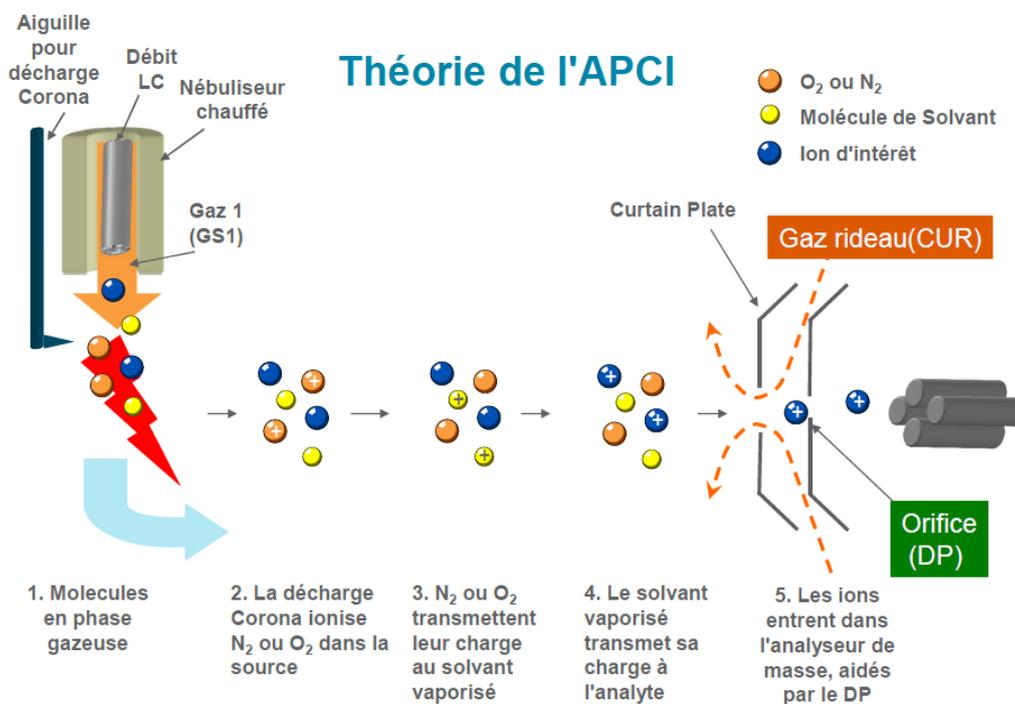


Figure 12 : Principe de l'APCI.

Dans nos techniques, le mode d'ionisation choisi est positif. Il y a transfert d'un proton H^+ à la molécule d'intérêt, on obtient l'ion MH^+ (M étant l'analyte d'intérêt).

Sélection de l'ion parent : premier quadripôle. Les ions moléculaires ainsi formés doivent ensuite être séparés selon leur rapport m/z . Les deux spectromètres employés pour ces dosages utilisent, pour cette séparation, des filtres quadripolaires²⁶. Le principe est le suivant : un ion chargé est attiré vers l'électrode de signe opposé. Placé entre deux électrodes dont la polarité est inversée alternativement, l'ion se trouve attiré et accéléré vers l'une puis l'autre électrode. Un filtre quadripolaire est formé de 4 barres métalliques parallèles et à égale distance d'un axe central imaginaire sur lesquelles sont appliquées des tensions variables. Ainsi dans un tel filtre, l'ion est accéléré selon une trajectoire hélicoïdale qui tend à devenir rectiligne quand l'amplitude et la fréquence de changement du champ, électrique est suffisante²⁶. Selon les paramètres de fréquence et d'amplitude de

champ électrique appliqués aux électrodes, un seul type d'ion d'un rapport m/z spécifique peut prendre une trajectoire rectiligne, les autres étant déviés et éliminés du filtre par leur trajectoire hélicoïdale (comme illustré figure 13²⁸).

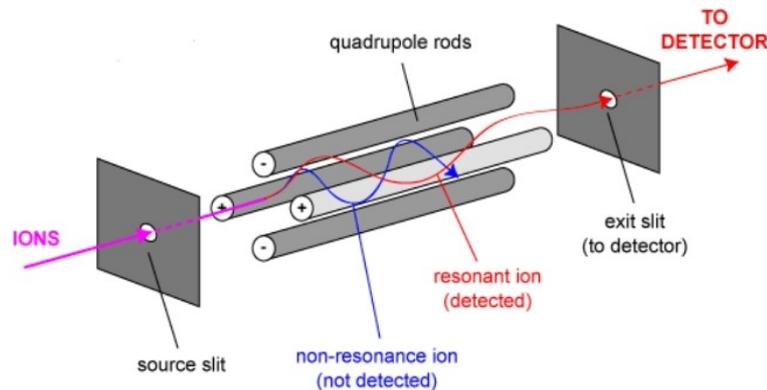


Figure 13 : Principe de du filtre quadripolaire.

Fragmentation de l'ion parent : cellule de collision. Une fois l'ion parent sélectionné, la molécule subit plusieurs cassures (utilisation d'un gaz inerte) dans un hexapode appelé cellule de collision. Ces cassures aboutissent à la formation de plusieurs ions secondaires appelés ions fils dans des proportions variables.

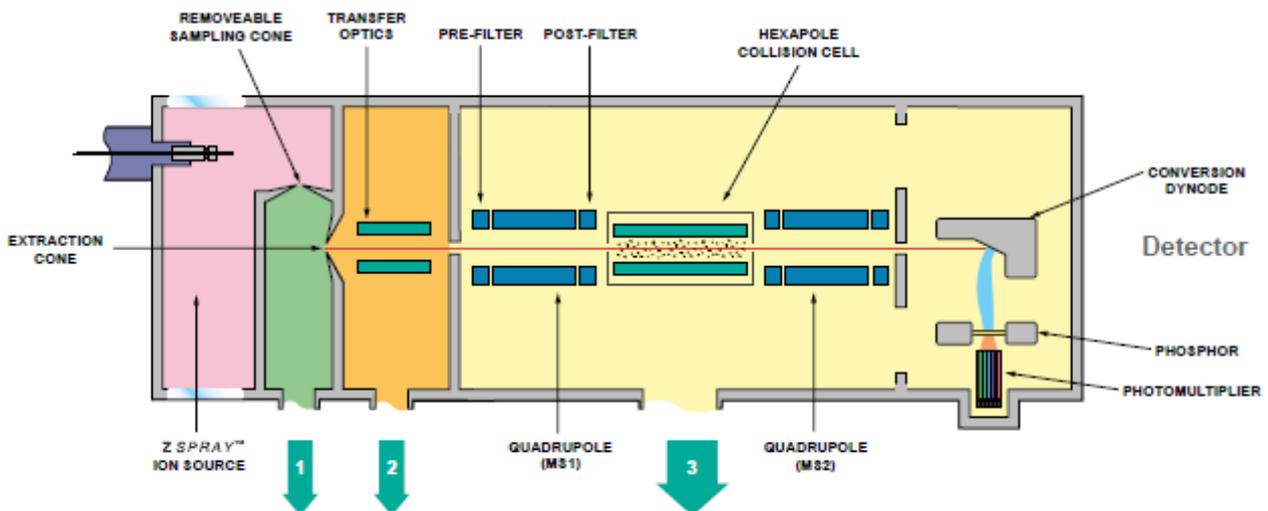


Figure 14 : Schéma du spectromètre de masse Quattro micro de chez WATERS.

Sélection de l'ion fils : second quadripôle : L'ion majoritaire formé est choisi comme étant l'ion secondaire qui sera isolé et comptabilisé. L'ion fils est alors isolé par un second filtre quadripolaire comme expliqué précédemment. Le passage de l'ion parent à l'ion fils est appelé transition moléculaire. Elle est caractéristique d'une molécule et permet son identification.

Détection : Il passe ensuite devant un détecteur qui convertit le signal perçu en signal électronique (génération d'un électron qui est ensuite amplifié par un photomultiplicateur puis converti graphiquement par l'analyseur sous forme d'un pic d'intégration). L'intensité du signal, et donc l'aire sous la courbe (ASC) du pic représentant l'analyte, est ainsi directement proportionnelle au nombre d'ions qui passent devant la cellule de détection.

2.3. Principe de l'étalon interne : molécule deutérée

Le dosage utilisé dans nos techniques comprend donc les étapes suivantes : extraction de type SPE, recueil de l'éluât et séparation par chromatographie HPLC ou UHPLC et détection en spectrométrie de masse (ionisation sélection de l'ion parent, fragmentation, sélection de l'ion fils et détection).

Afin de s'affranchir des variations liées à ces étapes (extraction, recueil et séparation incomplètes), on rajoute dans l'échantillon initial un étalon interne (EI)²⁶. Il s'agit d'un composé très similaire à l'analyte et n'ayant pas d'interaction avec celui-ci. Il doit présenter des propriétés physico-chimiques et structurales très proches de notre composé afin d'être extrait, séparé et détecté de la même façon que lui. Cet étalon interne ajouté en début d'analyse subit alors les mêmes étapes que l'analyte étudié. Etant ajouté en concentration connue dans les échantillons biologiques et dans la gamme en début d'analyse, le rapport des aires sous les courbes des signaux de l'étalon interne et de l'analyte permet ainsi de s'affranchir des pertes liées aux différentes étapes analytiques.

Dans nos techniques nous avons utilisé des isotopes deutérés des différentes molécules. C'est-à-dire contenant un ou plusieurs atomes de deutérium à la place d'un atome d'hydrogène. Le deutérium (symbole 2H ou D) est un isotope naturel de l'hydrogène. Ainsi notre étalon diffère de la molécule dosée d'au moins une unité de masse atomique. Il possède ainsi toutes les qualités nécessaires à un étalon interne mais sa masse plus lourde le différenciera en spectrométrie de masse de l'analyte à doser.

3. Intérêts et limites des techniques présentées

L'immunodosage : Les faibles différences structurales entre stéroïdes (confère paragraphe 1.2. partie I) engendrent des réactions croisées^{4,24} d'autant que leur petite dimension ne permet l'utilisation que d'un seul site antigénique dans les techniques immunologiques. Ce manque de spécificité engendre une surestimation des concentrations dans ces dosages. En revanche, l'avantage principal de ces techniques réside dans leur excellente sensibilité²³. L'autre inconvénient majeur des méthodes RIA reste la gestion des réactifs radioactifs et leur élimination.

L'HPLC MS/MS : Le couplage des techniques HPLC-détection par spectrométrie de masse permet une double identification du composé, par son temps de rétention, sa transition moléculaire. Il s'agit donc d'un système de dosage très spécifique²⁹. De plus la technique LC-MS/MS permet une analyse de plusieurs composés simultanément sur un même échantillon et permet ainsi de définir des profils très intéressants dans la recherche d'une pathologie endocrinienne car un résultat ne peut être analysé isolément. Cette analyse groupée permet de réduire le volume d'échantillon nécessaire aux dosages, mais elle ne constitue pas forcément un gain de temps puisqu'en technique manuelle les dosages d'un composé se font pour une série de patients, alors que l'analyseur met une dizaine de minutes à effectuer une analyse. Il constitue une méthode de dosage semi-automatisée car seule la phase d'extraction se fait manuellement. Par ailleurs, le prétraitement par une extraction de type SPE permet d'utiliser moins de solvants par opposition à une extraction liquide-liquide. Enfin, étant une technique non radioactive, elle présente un avantage certain pour la gestion des déchets en comparaison à la RIA.

L'inconvénient principal de la LC-MS/MS reste l'investissement initial nécessaire à l'achat d'un appareil de sensibilité suffisante, ce qui en fait une technique de dosage réservée à quelques laboratoires spécialisés. Il existe donc peu de techniques de dosage standardisées développées par un industriel, il est donc souvent nécessaire de développer une « technique maison ». La difficulté sur de telles techniques est alors de valider la méthode qui s'apparente à une portée B selon le SH GTA 04 (voir paragraphe 1.2 partie III). Cette démonstration de la qualité d'une technique passe par l'utilisation d'un EEQ (contrôle externe de qualité) indispensable mais inexistant pour des techniques aussi peu répandues et qui devra

donc être mis en place entre les laboratoires proposant la même technique au travers d'un contrôle inter-laboratoire (CIL)³⁰. L'autre inconvénient par rapport aux techniques de RIA reste la sensibilité⁴, même si celle-ci a récemment été améliorée et permet ainsi le dosage des androgènes.

4. Choix du changement de méthode de dosage

En décembre 2013, le PTMP (plateau technique de mesures physiques) du CHU Pellegrin à Bordeaux qui regroupe les laboratoires de Biochimie spécialisée, de Pharmacotoxicologie et une partie du laboratoire d'Hormonologie, a fait l'acquisition d'un nouvel automate LC-MS/MS le 5500 Qtrap de chez AB-Sciex. Il s'agit, en comparaison avec le Quattro-micro d'un système UHPLC. Son avantage majeur par rapport au Quattro-micro est qu'il offre une sensibilité et une résolution supérieure (grâce au système UHPLC et la plus haute résolution de son spectromètre de masse), qui est indispensable au dosage des androgènes.



Figure 15 : 5500 Qtrap de AB-Sciex.

L'acquisition de cet appareil a constitué une importante possibilité d'amélioration dans nos techniques de dosages compte tenu des avantages précédemment cités. Les biologistes du laboratoire d'Hormonologie ont donc décidé de mettre au point le dosage des androgènes et du cortisol salivaire sur cet appareil. Celui du CLU a été envisagé afin d'avoir un « back-up » en cas d'impossibilité d'utiliser le Quattro-micro.

Dans le but d'optimiser au mieux ce changement, il a aussi été question de faciliter les étapes de prétraitement des échantillons en passant d'une extraction liquide-liquide à une extraction de type SPE qui pourrait être automatisable. Ainsi plusieurs validations de méthode ont été réalisées. Elles sont exposées dans la partie suivante.

Troisième Partie : Validation des méthodes de dosage

1. Bases théoriques de la qualité

1.1. Démarche d'accréditation.

La norme NF ISO 15189 « Laboratoires d'analyses de biologie médicale - Exigences particulières concernant la qualité et la compétence », définit l'accréditation comme un processus méthodique selon lequel un « *organisme indépendant faisant autorité fournit une reconnaissance formelle qu'une personne, un laboratoire, un organisme d'inspection ou de certification est compétent pour réaliser des tâches spécifiques* »³¹. En France, l'organisme délivrant les accréditations est le COFRAC (COmité FRançais d'ACcréditation). Il a été désigné à la suite de la réforme de la loi HPST (Hôpital, Patients, Santé, Territoires) du 21 juillet 2009 afin de « mieux garantir la qualité des examens de biologie médicale, notamment en mettant en place une procédure d'accréditation des laboratoires »³².

Concernant le processus analytique qui va nous intéresser ici, le laboratoire doit procéder à une étape de validation des méthodes qu'il utilise. La validation est définie comme « *la confirmation par examen et apport de preuves objectives du fait que les prescriptions particulières d'une utilisation déterminée sont remplies* »³³. Le but de cette validation est donc de vérifier et démontrer, sur site, que les performances annoncées par le fabricant sont bien conformes à celles attendues ou souhaitées dans des conditions d'utilisations spécifiées. Pour s'aider dans cette démarche le laboratoire peut s'appuyer sur un guide technique d'accréditation le SH GTA 04 qui donne des recommandations directement issues de la norme NF ISO 15189, quant à la validation de la partie analytique de la technique.

Dans la suite de cet exposé nous nous intéresserons uniquement à la partie analytique pure de la validation de méthode. Concernant la phase pré-analytique, seule sera développée l'étude des conditions de conservation des échantillons.

1.2. Validation de méthode comme décrite dans le SH GTA 04.

Selon la norme, les méthodes « fournisseur » sont *à priori validées* dans leur domaine d'application, il s'agit alors pour le laboratoire de procéder à *une vérification* de leur maîtrise sur site. On parle dans ce cas d'une portée d'accréditation de type

A. A l'inverse, une validation de méthode-portée B, correspond à la validation d'une « *méthode adaptée ou développée en interne* », dans ce cas, le laboratoire *doit établir* « l'ensemble des critères de qualité de la méthode afin d'en *démontrer* la maîtrise, pour en *assurer la validation* ». Les critères de validation et les essais à réaliser sont alors plus nombreux et plus complexes.

En ce qui concerne le dosage du cortisol urinaire et salivaire et des androgènes sériques en spectrométrie de masse, il s'agit d'une validation de méthode de portée B quantitative puisque la méthode a été développée par l'équipe du laboratoire d'hormonologie en fonction de l'état de l'art.

Le guide technique d'accréditation 04 donne des recommandations quant à la réalisation des essais de validation de méthode. Il est vivement recommandé de les respecter au mieux surtout pour les techniques automatisées de réalisation aisée. Cependant ces recommandations n'ont pas de caractère obligatoire et peuvent être ajustées par le biologiste si nécessaire, afin de ne pas engendrer de « surqualité » péjorative. Ces ajustements doivent être justifiés (coût, lourdeur des manipulations), et ne pas diminuer la qualité de la validation de méthode. Ainsi, dans notre validation de méthode des adaptations ont été effectuées, sur les arguments précédents.

Comme recommandé dans le SH GTA 04 ont été effectués une revue de la bibliographie scientifique ainsi que des essais sur :

- la spécificité analytique,
- la fidélité (répétabilité et fidélité intermédiaire),
- la justesse,
- l'intervalle de mesure (limite de quantification et limite de linéarité),
- les incertitudes/facteurs de variabilité
- la contamination entre échantillons,
- la stabilité des réactifs (après ouverture, embarqués),
- les interférences (lipémie, hémoglobine plasmatique, bilirubine, médicaments),
- l'intervalle de référence « valeurs normales »,
- la comparaison avec méthode déjà utilisée au LBM.

Chacune de ces exigences et l'analyse de leurs résultats seront explicitées et décrites dans les paragraphes suivants.

Par ailleurs, le guide SH GTA 04 n'est pas exhaustif, et des essais supplémentaires, spécifiques d'une technique peuvent être envisagés. Par exemple dans le cas de notre technique, il a fallu évaluer l'importance de l'effet matrice, et calculer le coefficient d'extraction.

1.2.1. Définitions utiles pour la suite de l'exposé

Spécificité analytique : Il s'agit de la capacité qu'a un système de mesure à « produire des résultats qui ne dépendent ni les uns des autres ni de toute autre grandeur dans le système soumis au mesurage »³⁴. Une technique de dosage manque de spécificité quand elle est soumise à la présence d'interférences ou de réactions croisées qui peuvent modifier faussement son résultat.

Répétabilité et fidélité intermédiaire : La fidélité est définie comme : « l'étroitesse de l'accord entre [...] les valeurs mesurées obtenues par des mesurages répétés du même objet [...] dans des conditions spécifiées »³⁴. Les essais de répétabilité et de reproductibilité constituent deux façons d'évaluer la fidélité et qui permettent d'apprécier la robustesse de la méthode.

L'essai de répétabilité a pour but de caractériser la performance optimale de la technique, dans des conditions standardisées et de vérifier son bon fonctionnement pour le paramètre concerné. Pour cela un même échantillon est analysé plusieurs fois dans les mêmes conditions (même opérateur, même lot de réactifs, même instrument, même étalonnage dans un délai le plus court possible).

A l'inverse, l'essai de fidélité intermédiaire, aussi appelé « reproductibilité intra-laboratoire », consiste à analyser un même échantillon dans des conditions différentes en faisant varier au moins un des paramètres précédemment cités. Elle est établie sur environ 30 essais à partir du dosage d'échantillons de Contrôle Interne de Qualité (CIQ), avec deux niveaux de contrôle au minimum.

La justesse : L'exactitude ou justesse est définie comme « l'étroitesse de l'accord entre une valeur mesurée et une valeur vraie d'un mesurande (analyte) »³⁴ ou une valeur de référence.

Il est difficile d'approcher la justesse d'une méthode car cela implique d'établir la « valeur vraie » d'un dosage, ce qui est impossible. Ainsi, on peut soit apprécier l'inexactitude d'une méthode en utilisant les valeurs des échantillons d'EEQ et en les

comparant à la valeur cible (définie comme la moyenne des résultats obtenus par l'ensemble des participants du même groupe de pair, c'est à dire disposant de la même technique). Soit, faire de même en comparant la moyenne des échantillons de CIQ obtenue lors de l'étude de fidélité intermédiaire, à la valeur cible attendue, assimilée à la valeur "vraie" (v) de l'échantillon testé. On parle alors de biais. Pour utiliser les CIQ ceux-ci doivent être externalisés, c'est-à-dire réalisés par plusieurs laboratoires, sur un même lot de contrôle, et les résultats doivent être confrontés entre eux afin de déterminer la moyenne (valeur cible attendue) et ainsi la justesse périodiquement³⁵.

Incertitudes de mesure : Selon la norme NF ISO 15189 : « Le laboratoire doit pouvoir mettre à disposition du prescripteur, en cas de besoin, une approche dans l'évaluation des incertitudes de mesure »³¹. L'incertitude permet de caractériser « la dispersion des valeurs attribuées à un mesurande »³⁴.

Il existe plusieurs méthodes de calcul de l'incertitude. Elle peut être approchée grâce aux résultats des tests de fidélité intermédiaire et de justesse (méthode CIQ-EEQ). Il doit permettre de prendre en compte toutes les causes possibles d'incertitude sur le résultat (échantillonnage, aliquotage, calibrateurs, matériaux de référence, équipement utilisé, conditions expérimentales, état de l'échantillon et changements de manipulateur). Ces causes doivent être préalablement listées (grâce par exemple à la méthode des « 5M ») et les modalités de leur maîtrise doivent y être associées³⁶.

La contamination : Deux types de contamination peuvent être rencontrées sur un système automatisé : la contamination inter-échantillon et la contamination inter-réactif. Le premier permet d'évaluer la qualité du rinçage de l'aiguille de prélèvement entre deux échantillons et est évalué en passant successivement un échantillon dont la valeur du paramètre dosé est élevée à un échantillon de valeur basse. Le second est à déterminer lorsque le système de distribution est commun à tous les réactifs³⁴.

La limite de détection et la limite de quantification : La limite de détection est définie comme le petit *signal mesurable* qui peut être distingué de celui obtenu par mesure d'un blanc de réaction. La limite de quantification correspond à la plus petite *valeur mesurée* exprimée en concentration, dont le niveau de confiance et d'incertitude peut être considéré comme acceptable³⁴.

La limite supérieure de linéarité : Sa détermination permet, avec celle de la limite de quantification, de déterminer le domaine de linéarité du paramètre. Le domaine de linéarité peut être défini comme l'étendue de valeurs pour lesquelles le signal mesuré est directement proportionnel à la valeur du mesurande dans l'échantillon.

Intervalle des valeurs de référence : Cet intervalle est défini, expérimentalement, chez un très grand nombre de personnes (>100) issues d'une population saine (exempte de pathologie) pour laquelle la distribution du paramètre dosé suit une loi Normale (Gaussienne), comme il suit : [moyenne des dosages +/- 2écart-types]³⁴. Plusieurs intervalles peuvent être définis quand il existe plusieurs sous-populations (ex : tranche d'âge, stade pubertaires...). On peut définir des intervalles de référence pour des paramètres de distribution non gaussienne (CLU par exemple) en utilisant les 95èmes percentiles comme plage de référence des valeurs.

1.2.2. Détermination des limites acceptables

Pour déterminer les limites d'acceptabilité des différents tests effectués le biologiste peut s'aider de plusieurs documents. Tout d'abord, il dispose du document d'Anne Vassault *et col.* de 1999 dont la rédaction a été supervisée par la Société Française de Biologie Clinique (SFBC). Le second document contient les recommandations fournies par Carmen Ricos *et al.* 2011 et décrit les variations biologiques intra-individuelles (CVw) et interindividuelles (Cvg) du paramètre considéré³⁷. A partir de ces données sont calculés plusieurs paramètres dont l'imprécision (I%). Ce calcul est défini à partir du constat selon lequel pour « mettre en évidence des variations anormales chez un même individu [...], il faut disposer d'une technique dont la reproductibilité est inférieure à la variation biologique »³⁸. « L'imprécision analytique acceptable (I), exprimée en termes de coefficient de variation (CV), doit être inférieure à la moitié du coefficient de variation observé pour la variation biologique intra individuelle (CVw) ».

C'est-à-dire que le CV de reproductibilité obtenu lors de la validation de méthode doit être inférieur au « I » de la table de « Ricos » qui est égal à 0.5 x CVw.

D'autre part, nous pouvons obtenir une valeur de CV applicable pour les tests de répétabilité puisque selon le SH GTA 04, $CV_{\text{répétabilité}} = CV_{\text{reproductibilité}} / 1,33$.

Pour les techniques « fournisseurs » le biologiste peut, en l'absence de limites acceptables définies par les documents précédemment cités, utiliser les limites définies par le fabricant. Ce qui dans le cas de notre méthode est impossible puisqu'il s'agit d'une technique « maison ».

Enfin, une revue des données de la bibliographie scientifique peut être effectuée.

2. Présentation des validations de méthode effectuées

Nous avons procédé aux validations de méthode suivantes :

- Dosage du cortisol libre urinaire : passage d'une méthode d'extraction liquide-liquide au dichlorométhane, à une extraction en phase solide avant analyse sur le spectromètre de masse Quattromicro. Seconde validation avec la même extraction SPE et un passage sur le spectromètre 5500Q-trap.
- Dosage du cortisol salivaire : passage d'une méthode RIA avec extraction liquide-liquide à une méthode identique à celle nouvellement adaptée pour le CLU (extraction SPE et passage sur le 5500Q-trap).
- Dosage des androgènes : passage d'une technique d'immunodosage avec marqueur radioactif à une méthode de dosage par spectrométrie de masse (extraction SPE et passage sur le 5500Qtrap).

3. Détermination des critères de performance et des limites d'acceptabilité à respecter

Selon les recommandations du SH GTA 04 nous avons procédé aux validations suivantes :

	Cortisol urinaire	Cortisol salivaire	Androgènes
Répétabilité	x	x	x
Reproductibilité	x	x	x
Justesse	0	Pas d'EEQ existant	En cours
Linéarité	x	x	En cours
Limite de détection	x	0	0
Limites de quantification	x	x	x
Spécificité	X Revue bibliographique + analytique		Revue bibliographique

Contamination	Test à partir du CLU sur plaque, et sur les 2 systèmes analytiques		
Stabilité des réactifs	x	0	0
Comparaison de méthodes	x	x	x
Tests spécifiques : Coef d'extraction, effet matrice	x	x	x
Stabilité avant analyse	x	x	0

Concernant la définition des limites acceptables : Pour la testostérone, le 11-désoxycortisol, et la 17-hydroxyprogesterone il existe les données suivantes fournies par RICOS. Cependant, ces données sont très contraignantes et même dans nos techniques RIA nous n'avons pas de tels CV. Des spécifications plus souples ont été fixées.

Pour les autres paramètres il n'existe pas de spécifications définies par les sociétés savantes (Ricos ou SFBC). S'agissant d'une technique maison il n'existe pas non plus de spécifications du fournisseur. Nous avons donc procédé à une revue bibliographique. Concernant le cortisol urinaire, nous avons estimé que notre technique devait au minimum être conforme aux spécifications des fournisseurs pour les autres techniques de dosage. Nous avons donc comparé les différentes fiches techniques des dosages du CLU existants et pris comme CV de répétabilité et de reproductibilité, les CV les plus exigeants, en tenant compte de l'intérêt clinique de ces exigences par niveau de concentration de l'analyte. Les spécifications relatives aux autres dosages ont été déterminées de la même manière.

4. Dosages du cortisol libre urinaire sur le Quattro-micro

4.1. Mode opératoire

Protocole d'extraction :

1. Préparation de la plaque (de type HLB) : dépôt de 400µL de MeOH (méthanol) par puits → puis aspiration et rejet
2. Lavage de la plaque : dépôt de 400µL de H₂O par puits → puis aspiration et rejet
3. Dépôt des échantillons incluant 10% de MeOH (total=300µL) et de l'EI (50µL) par puits → puis aspiration et rejet
4. Lavage de la plaque → dépôt de 400µL d'un mélange MeOH/H₂O (10/90) → puis aspiration et rejet
5. Elution récupération des échantillons par 150 µL d'ACN (acétonitrile) par puits → puis aspiration et récupération pour passage sur le Quattro-micro.

Préparation de la gamme d'étalonnage, de l'étalon interne et des contrôles

La gamme d'étalonnage est préparée extemporanément par dilution au 1/10^{ème} dans de l'eau distillée d'une gamme mère préparée à partir de l'étalon interne et conservée au congélateur. Elle s'étend de 2,5 à 500 µg/L.

L'étalon interne est utilisé dilué à 100 µg/L Dans une solution d'eau (24mL) d'acide orthophosphorique (1mL) et d'albumine (10µL).

Les contrôles internes de qualité sont des contrôles lyophilisés de chez Biorad, reconstitués dans l'eau distillée et dilués selon le contrôle.

4.2. Evaluation de la répétabilité

Mode opératoire : Pour évaluer la répétabilité, nous avons déterminé le coefficient de variation (CV) de 10 répétitions de dosage (la même série) des échantillons de CIQ Biorad sur trois niveaux : niveau bas, niveau moyen et niveau haut.

Un choix de 10 répétitions a été retenu compte tenu du coût et de la lourdeur des manipulations. Par ailleurs, et de cette façon le laboratoire se place dans une condition défavorable quant à ce calcul, la dispersion des valeurs ne pouvant être

minimisée par le nombre de répétitions. La validité de cet essai de répétabilité pourra par ailleurs être confortée par celle de l'essai de reproductibilité suivant.

Echantillons	Nombre (N)	Moyenne (µg/L)	Ecart-type	CV (%)	CV (%) fournisseur	CV (%) limite (hors fournisseurs)	Conclusion
Echantillon niveau 1 ¹	10	3.46	0.32	9	NA	10	acceptable
Echantillon niveau 2	9 ²	6.39	0.58	9	NA	10	acceptable
Echantillon niveau 3	10	119.08	6.28	5	NA	10	acceptable

¹ niveau moyen dilué au 1/2

² point supprimé pour cause de double pipetage (erreur technique)

Interprétation : les CV de répétabilité des différents kits fournisseurs existants (*Abbott, Beckman Coulter, Dia metra, IBL*) sur le marché ont été comparés, toutes techniques confondues (RIA, ELISA) et un CV de 10% a été retenu pour les 3 niveaux testés. Ainsi la répétabilité de notre méthode est acceptable selon les spécifications que nous nous sommes fixées.

4.3. Evaluation de la fidélité intermédiaire (reproductibilité)

Mode opératoire : Nous avons calculé le CV sur 7 valeurs de dosage pour 2 niveaux de CIQ Biorad, en faisant varier les paramètres suivants : opérateurs, dates de réalisation, lots réactifs. Ces CIQ étaient passés à chaque série effectuée pour cette validation de méthode.

Echantillons	Nombre (N)	Moyenne (µg/L)	Ecart-type	CV (%)	CV (%) fournisseur	CV (%) limite défini	Conclusion
Echantillon niveau 1	7	9.91	1.14	11	NA	13	acceptable
Echantillon niveau 2	7	125.26	7.09	6	NA	13	acceptable

Interprétation : Les performances en termes de reproductibilité sont conformes aux spécifications que nous nous sommes fixées. (*Rappel : CV reproductibilité = 1.3*CV répétabilité*)

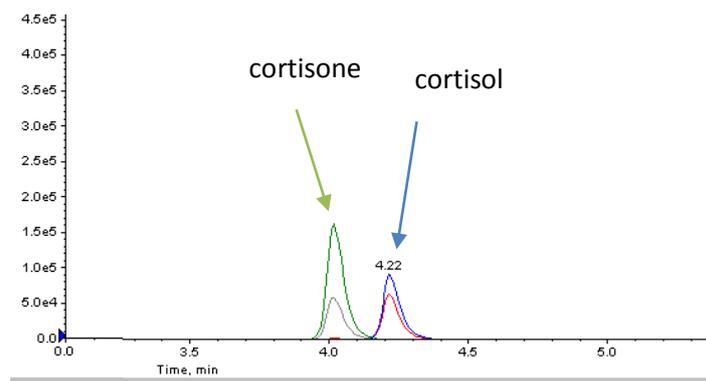
4.4. Evaluation de la justesse

Mode opératoire : l'inexactitude sera calculée grâce aux résultats des EEQ du programme probiocal. Ceux de l'année 2013 seront repassés sur le Quattro micro avec l'extraction de type SPE.

4.5. Evaluation de la spécificité vis-à-vis des métabolites urinaires du cortisol

Mode opératoire : Nous avons évalué l'ASC du cortisol d'une solution méthanolique contenant la cortisone, le tétrahydrocortisol, allo- tétrahydrocortisol, tétrahydrocortisone, l'alpha-cortol, le beta- cortol, l'alpha-cortolone, la beta-cortolone, l'aldostérone (métabolites physiologiques du cortisol), la méthylprednisone (glucocorticoïde de synthèse), elle-même dépourvue de cortisol¹¹.

Résultats : On constate une faible surestimation du dosage du cortisol urinaire évaluée à environ 3%. Ceci est dû au fait qu'une faible quantité de cortisone présente le même poids moléculaire que le cortisol³⁹. En effet, un isotope naturel de l'oxygène O¹⁸ (contrairement à l'isotope majoritaire O¹⁶) y est présent à environ 3%³⁹. Ainsi 3% de la cortisone, de poids moléculaire 360 g/mol, a en réalité un poids moléculaire de 362 g/mol et ne peut donc être séparée du cortisol en LC-MS/MS classique (transition identique et temps de rétention identique)¹⁷. En revanche le nouveau spectromètre de masse le 5500Qtrap dont a fait acquisition le laboratoire, est doté d'un système UPLC qui lui permet de séparer cette cortisone comme présenté ci-dessous. Nous avons estimé que la cortisone étant présente à des concentrations similaires au cortisol dans les urines, cette très faible surestimation (<3%) n'avait aucun impact clinique.



Légende : représentation graphique des pics d'intégration des 2 composés sur le 5500Q-trap de AB-sciex

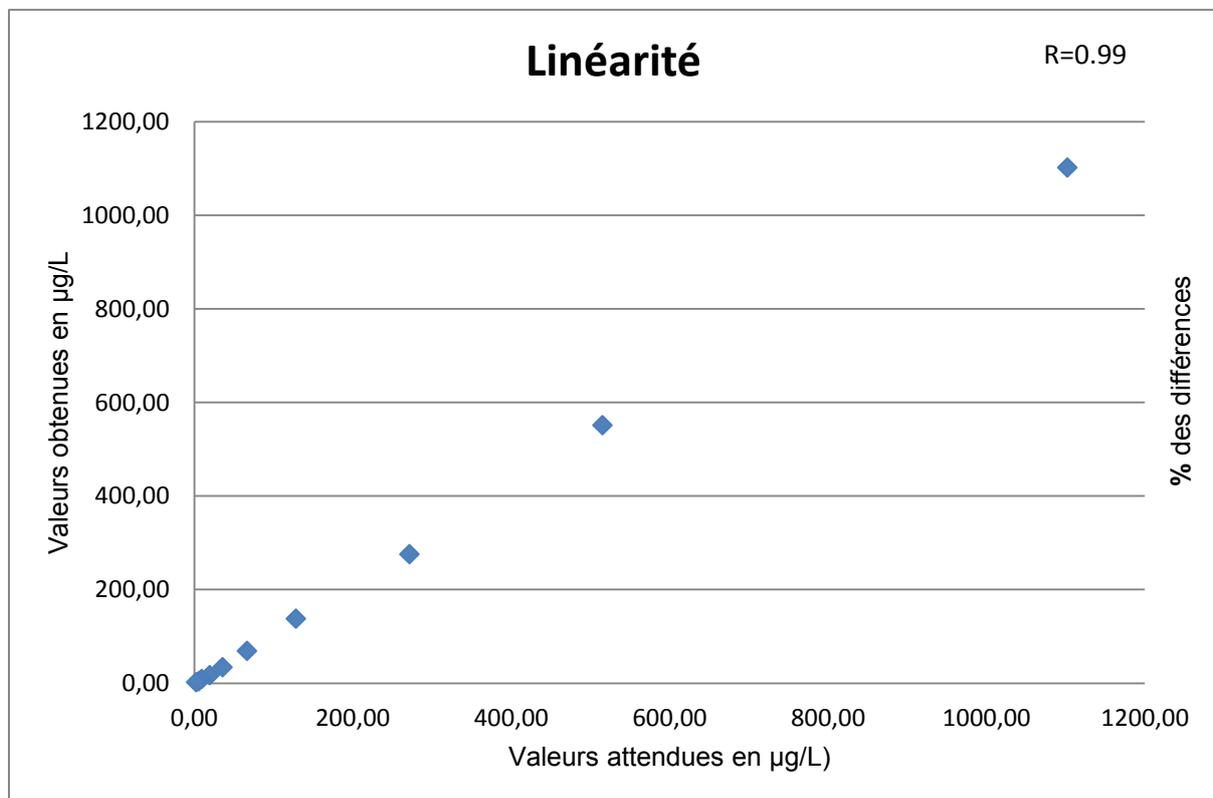
4.6. Evaluation de la linéarité

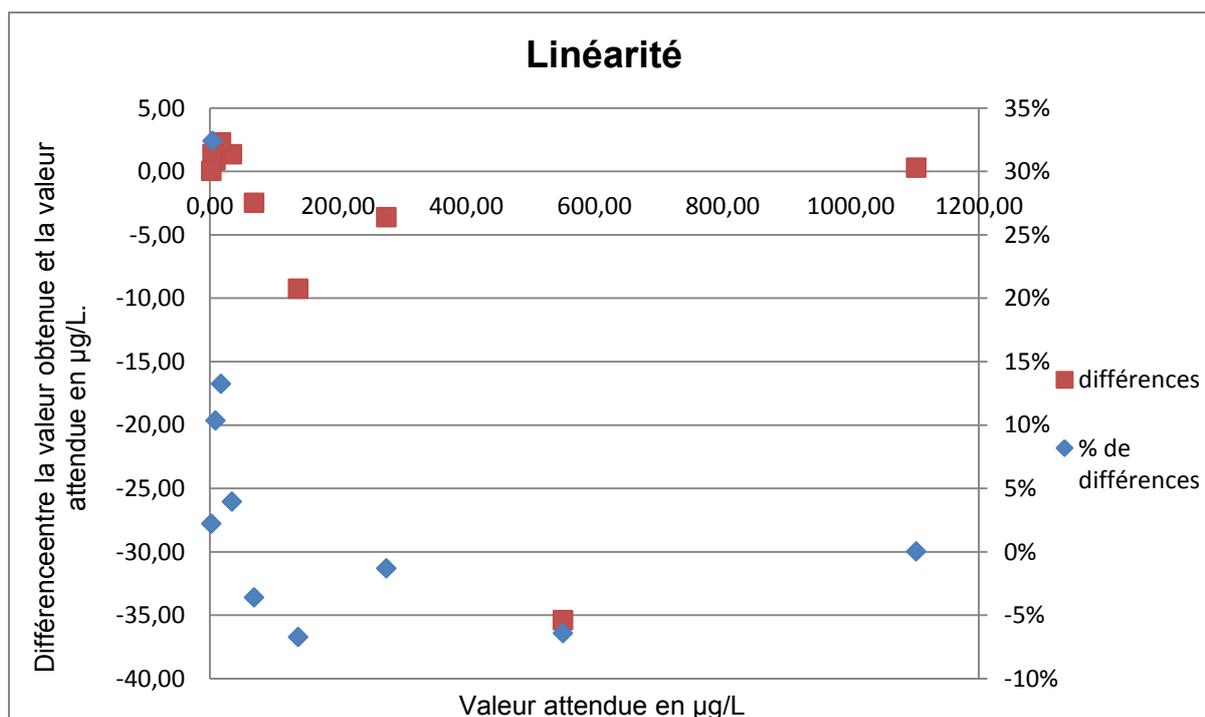
Mode opératoire : Un pool d'urines de patients ayant une concentration élevée en cortisol (environ 300 µg/L) a été surchargé en cortisol (par ajout d'un faible volume d'échantillon constituant le dernier point de la gamme d'étalonnage à une concentration C mesurée égale à 1102,3 µg/L). Cet aliquote a ensuite été dilué de 2 en 2 sur tout le domaine de mesure du dosage. Une courbe avec en abscisse la valeur attendue du dosage et en ordonnée la valeur réellement obtenue a été tracée afin d'apprécier le coefficient de corrélation obtenu. Le diagramme des différences a été établi afin d'affiner l'interprétation de cet essai.

Le dosage de chacun des points de dilution a été réalisé en simple pour les mêmes raisons précédemment citées.

Le point le plus haut qui a été évalué pour cette étude est situé donc aux alentours de 500 µg/L (première dilution au demi). Ainsi, n'ayant pu étudier la linéarité de la méthode sur un domaine plus étendu, tout échantillon dont le dosage donnera une valeur supérieure à ce point devra être dilué afin de revenir dans un domaine de linéarité connu et validé.

Facteur de dilution	Pur	1/2	1/4	1/8	1/16	1/32	1/64	1/128	1/256	1/512	1/1024
Valeur théorique (µg/L)	1102,30	551,15	275,58	137,79	68,89	34,45	17,22	8,61	4,31	2,14	2,5
Valeur mesurée (µg/L)	1102,3	515,6	271,9	128,5	66,4	35,8	19,5	9,5	5,7	2,2	1,07
Ecart mesuré (%)	0	-6	-1	-7	-4	4	13	10	32	2	132





Interprétation : Le dosage offre une bonne linéarité sur l'ensemble du domaine étudié (coefficient de corrélation proche de 1). L'écart mesuré entre la valeur mesurée et celle attendue est proportionnellement plus important pour le point de dosage à 1,07 µg/L. Cette variation peut sembler grande mais le dosage du CLU n'a pas d'intérêt diagnostique dans les basses concentrations (intérêt dans le diagnostic des hypercorticismes, confère paragraphe 4.1.1.1 partie I). Par ailleurs, cette concentration est inférieure à celle du dernier point de la gamme d'étalonnage, et devra être évaluée dans l'essai sur la limite de quantification. Sur le diagramme des différences on remarque une différence plus prononcée dans les valeurs hautes du dosage. Cette différence est minime compte tenu du domaine de concentration étudié (à 550µg/L on trouve 6,4% de différence entre la valeur mesurée et la valeur attendue). Elle est de plus en partie due à la « qualité » de la dilution effectuée.

Enfin, la valeur haute du domaine de référence (60 µg/L) est située dans le domaine de linéarité étudié.

Conclusion : la linéarité de cette méthode peut être validée pour le domaine étudié [2,2 ; 500 µg/L].

4.7. Evaluation de la contamination

Mode opératoire : Deux possibilités de contamination ont été identifiées : l'une liée à une contamination des échantillons *via* l'aiguille de pipetage, l'autre liée à la proximité des deux échantillons sur la plaque d'extraction (contamination potentielle pouvant avoir lieu lors de l'élution des échantillons par aspiration).

Conformément à ce qui est recommandé dans le SH GTA 04, un échantillon ayant une concentration en analyte élevée (dernier point de gamme) est analysé 3 fois consécutivement suivi d'un échantillon de concentration basse (premier point mesurable de la gamme) également analysé 3 fois. Cette séquence a été répétée plusieurs fois (3 fois) afin d'établir la moyenne des passages de niveau bas et la moyenne des passages de niveau haut.

1) Pour la contamination liée au pipetage dans l'automate, deux échantillons (H étant le point le plus haut de la gamme d'étalonnage, et B le point le plus bas) ont été extraits dans des puits distants l'un de l'autre sur la plaque d'extraction. Ces échantillons ont ensuite été pipetés alternativement comme expliqué ci-avant. Les résultats sont les suivants :

Série 1	H1	1084,6	B1	1,5	
	H2	1031,5		B2	1,8
	H3	1040,5		B3	1,2
Série 2	H1	1122,6	B1	1,4	
	H2	1175,1	B2	1,4	
	H3	1216,3	B3	1,4	

Moyenne B1 (mB1)=1.45

Moyenne B3 (mB3)=1.30

Moyenne H (mH)=1111,77

Contamination = $(mB1 - mB3) / mBH * 100 = 1,35\%$

2) Pour la contamination entre deux échantillons à proximité sur la plaque d'extraction, les échantillons ont été déposés comme ceci sur la plaque

d'extraction (en veillant à ne pas mettre d'autre échantillon dans les puits situés autour de cet essai):

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	H1	H2	H3	B1	B2	B3						
B	H1	H2	H3	B1	B2	B3						
C	H1	H2	H3	B1	B2	B3						
D												
E												
F												
G												
H												

Ligne A	H1	1095,5	B1	1,4
	H2	1026,6	B2	1,4
	H3	1087,6	B3	1,1
Ligne B	H1	1207,6	B1	1,8
	H2	1261,8	B2	1,3
	H3	1094,9	B3	1,9
Ligne C	H1	1108,1	B1	1,5
	H2	985,4	B2	1,8
	H3	1166,2	B3	1,6

Moyenne B1 (mB1)= 1.57

Moyenne B3 (mB3)= 1.53

Moyenne H (mH)= 1114.86

Contamination = $(mB1-mB3)/mBH * 100 = 0,30\%$

Interprétation : La contamination inter-échantillons est non significative.

4.8. Détermination de la limite de détection

Mode opératoire : Elle a été évaluée comme précisée par le COFRAC 10xécart-type du blanc réactif. Le blanc réactif a été obtenu grâce au point 0 de la gamme d'étalonnage, composé uniquement d'eau, qui a été traité comme l'ensemble des autres échantillons sur la colonne d'extraction et récupéré par élution à l'acétonitrile puis injecté dans l'analyseur. Le dosage de ce blanc réactif a été répété 10 fois.

Un pic a été intégré dans le bruit de fond détecté par l'analyseur, au niveau du temps de rétention correspondant à celui du cortisol ($t=2,43-2,50$).

Interprétation : Ce pic étant minime, aucune ASC n'a pu être déduite de cette expérience. La limite de détection est donc très faible et n'a pu être déterminée de cette façon. Avoir une bonne détection dans les valeurs très basses de CLU n'a pas d'intérêt comme expliqué ci-avant (cf infra §4.1.1.1 partie I), nous n'avons donc pas poussé les investigations plus loin.

4.9. Détermination de la limite de quantification

Mode opératoire : Pour cette détermination, trois urines ayant des valeurs de cortisol *a priori* proches de la valeur du 1^{er} point de gamme (2,5 µg/L) ont été analysées huit fois dans une même série de dosage (selon les mêmes arguments de coût, et de manipulations). Le CV des 8 dosages a été déterminé pour chaque niveau. La valeur du niveau dosé donnant un CV supérieur à 20% a été définie comme étant la limite de quantification.

Analyte	Moyenne	Ecart-type	CV%
Cortisol urinaire	1,51	0,25	17,10
	3,16	0,32	10,13
	4,36	0,56	12,90

Interprétation : les CV de ces répétitions restent inférieurs à 20% pour les 3 niveaux testés. Cette technique offre donc une limite de quantification basse, jusqu'au

dernier point de concentration testé. Cependant dans un tel dosage il n'y a pas d'intérêt clinique à avoir une limite de quantification très basse (confère infra paragraphe 4.1.1 partie I). Il a donc été décidé de garder comme limite de détection, la valeur du dernier point de gamme soit 2,5µg/L.

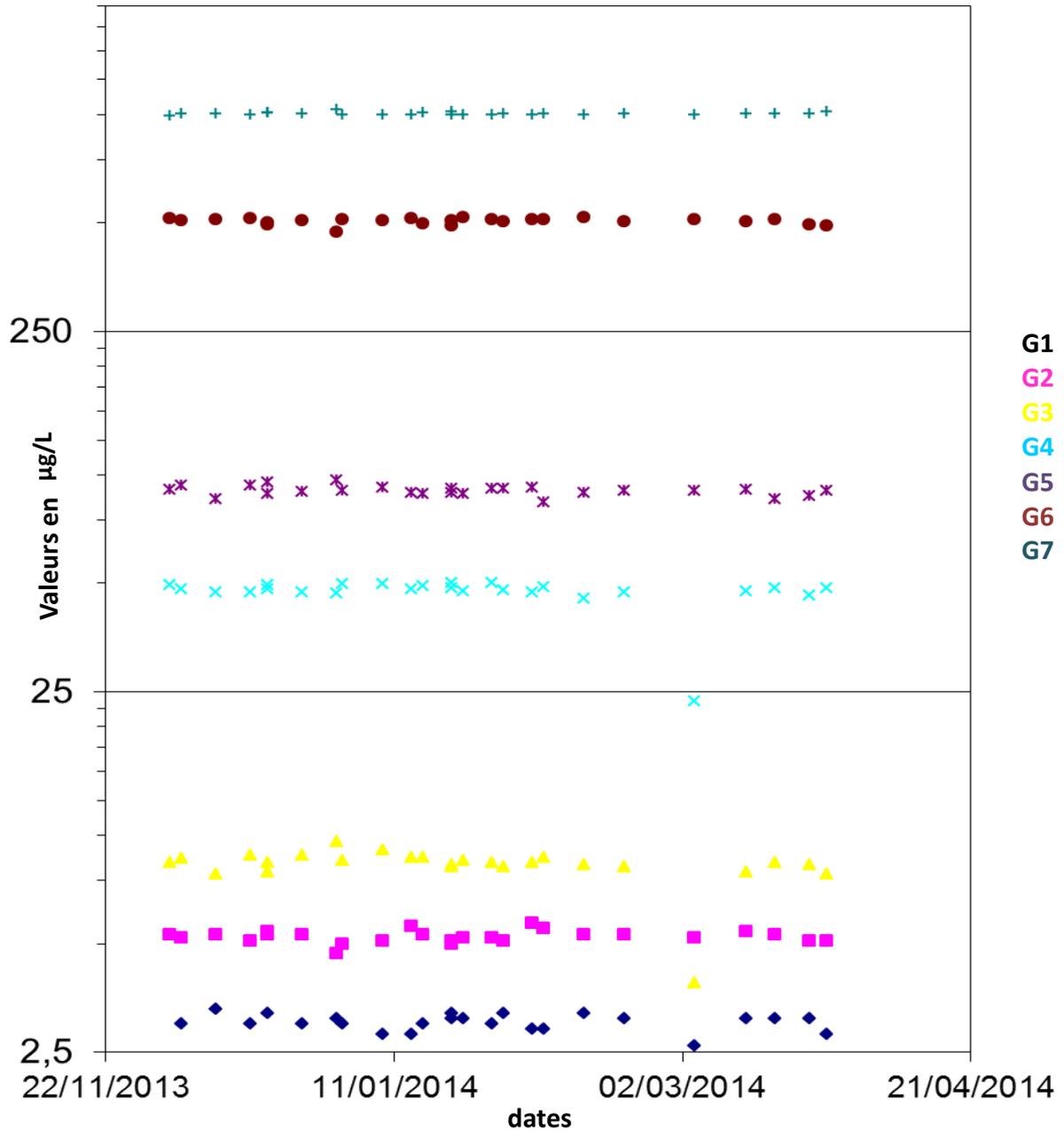
Conclusion : La limite de quantification a été validée à 2,5 µg/L. Tout résultat d'un échantillon donnant une concentration inférieure au dernier point de gamme sera rendu comme inférieur à 2,5 µg/L.

4.10. Evaluation de la stabilité des réactifs

Mode opératoire : Une évaluation rétrospective sur les 6 derniers mois des aires sous courbe (ASC) des points de la gamme et du standard interne deutéré obtenue par LC-MSMS a été effectuée pour cette détermination. Les moyennes, écarts-types, et coefficients de variation ont ensuite été calculés pour chaque point (G1→G7).

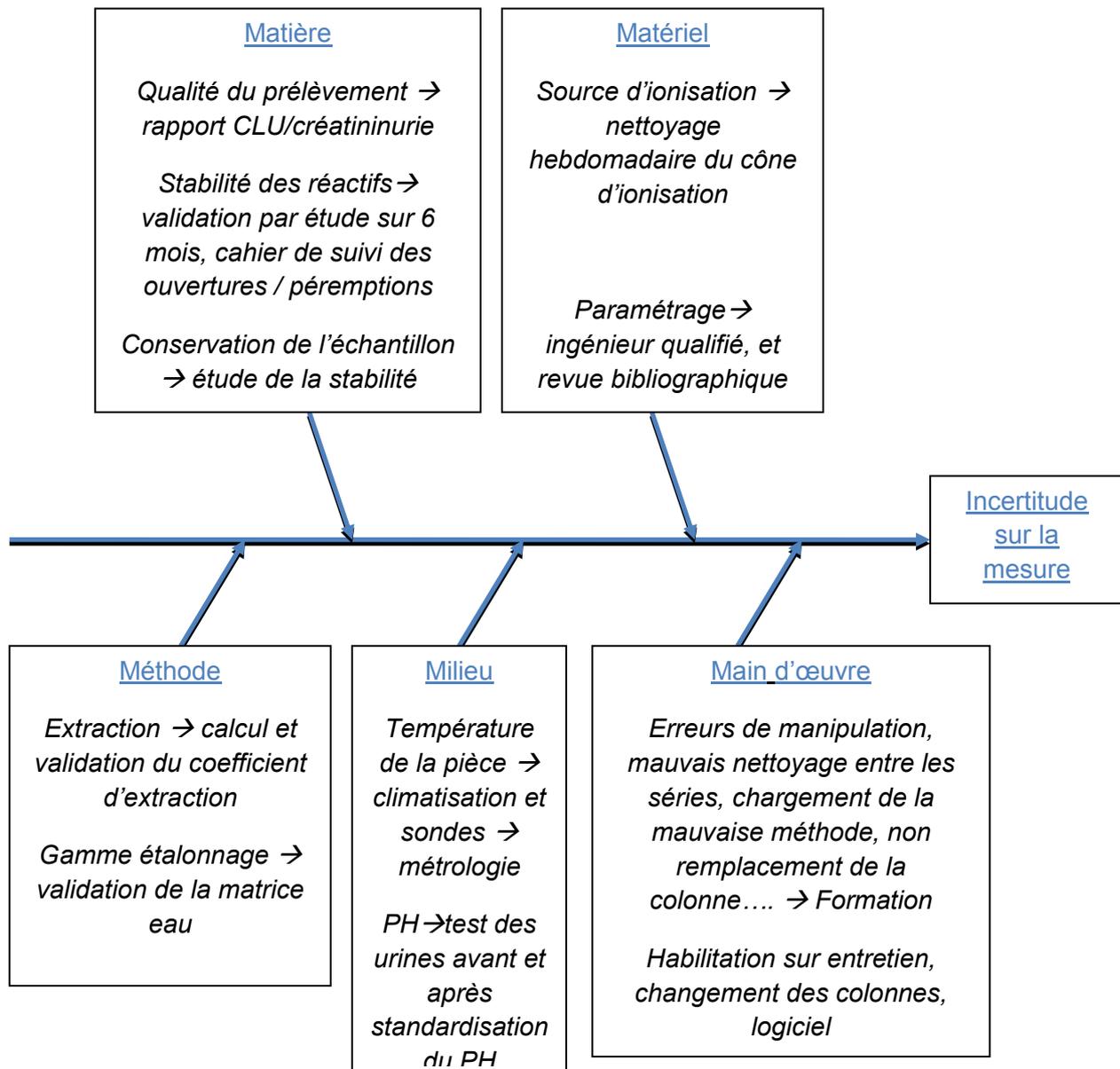
C	m	ET	CV%
G1	3,03	0,16	5,36
G2	5,23	0,20	3,86
G3	8,26	0,97	11,79
G4	47,22	4,97	10,53
G5	90,21	2,81	3,12
G6	505,61	10,22	2,02
G7	1006,13	9,33	0,93

Suivi des points de gamme G1 à G7 sur 6 mois



Interprétation : Les CV calculés sont assez faibles, et chacun des points est situé de part et d'autre de la moyenne sans dérive visible. Il ne semble donc pas y avoir d'altération significative des propriétés physico-chimiques des réactifs qui pourrait influencer sur les résultats des dosages. La stabilité des réactifs est donc validée.

4.11. Détermination des incertitudes

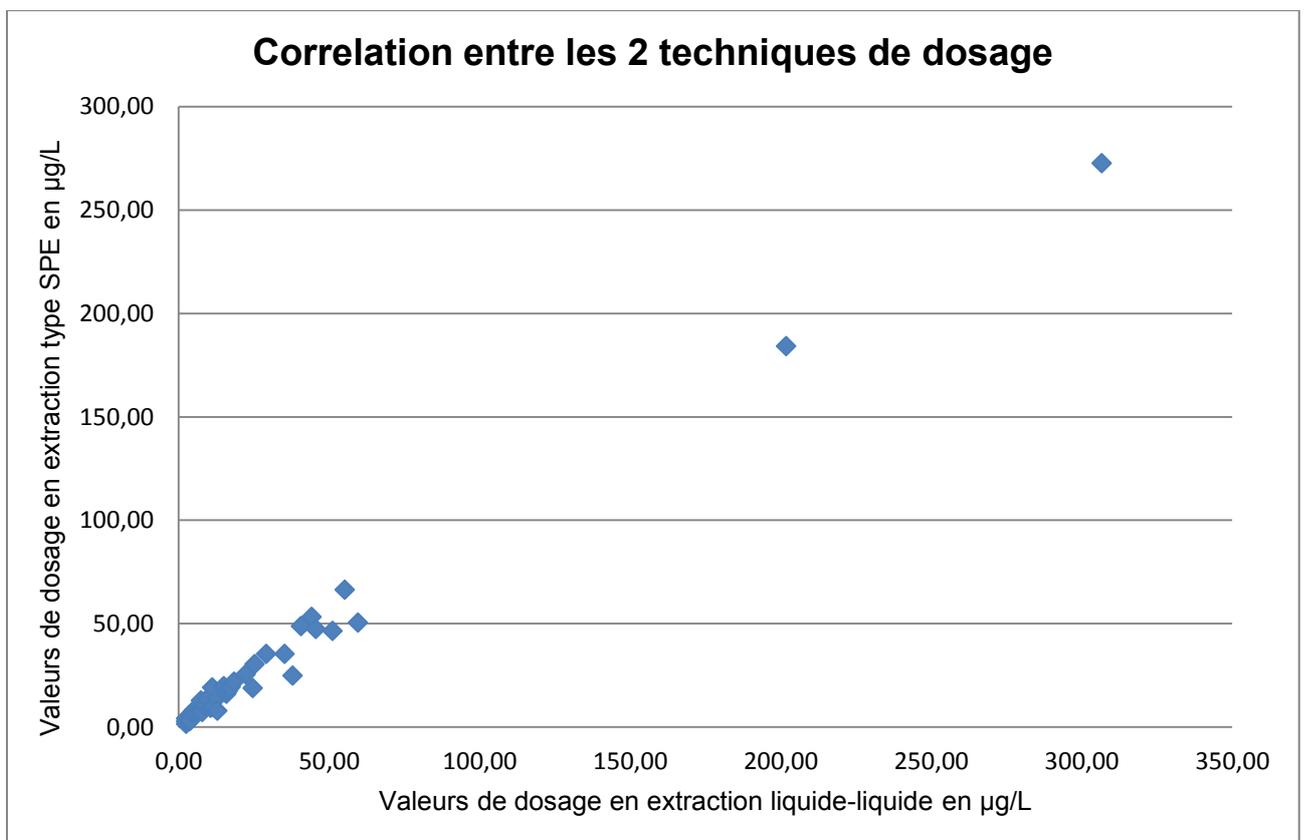


Commentaire : seule l'analyse de risque a été réalisée ici afin de déterminer les éléments qui pourraient augmenter l'incertitude sur le résultat, et vérifier par la suite s'ils sont bien maîtrisés. Le calcul de cette incertitude est en cours et sera réalisé quand nous aurons passé les EEQ de 2013 sur le Quattro après extraction de type SPE.

4.12. Comparaison de méthode

Mode opératoire: Plusieurs corrélations ont été réalisées. Les échantillons de patients (N=44) ont été analysés sur le Quattro-micro avec la méthode d'extraction au dichlorométhane (technique A), puis ils ont été analysés avec la méthode d'extraction à valider (technique B), sur le Quattro-micro. Ainsi, une corrélation des 2 séries réalisées sur le Quattro-micro a permis d'apprécier les éventuelles variations liées à la méthode d'extraction.

Coefficient de corrélation (r) = 0.991



Interprétation : Les deux techniques semblent bien corrélées, il n'y pas de surestimation d'une technique par rapport à l'autre puisque les pourcentages des différences sont aléatoirement situés de part et d'autre du zéro sur le diagramme. Ces pourcentages de différences observés sont à relativiser, des écarts de l'ordre de 20% sont observés autour de la valeur haute du domaine de référence, la différence observée est en réalité peu significative (exemple : 18% de différence, pour des valeurs à 55,20 et 66,30 µg/L en extraction liquide/liquide et en SPE respectivement). En effet le diagnostic de Cushing est posé selon un faisceau d'arguments (cycles du cortisol sanguin, cortisol salivaire, et cortisol urinaire...) et les dosages sont souvent répétés afin de conclure à la pathologie. Par ailleurs, dans la plus part des cas, l'excès de cortisol se voit de manière très significative sur le cortisol urinaire, avec des valeurs de dosage très élevées. L'essai de corrélation est donc validé.

4.13. Essais spécifiques à la méthode

4.13.1. Détermination du coefficient d'extraction

Mode opératoire : Pour le calculer nous avons surchargé des urines à 2 niveaux de concentration avec du standard interne deutéré. Ce standard interne deutéré a par ailleurs été dilué à 2 niveaux de concentration dans l'acétonitrile. Les concentrations de ces surcharges dans l'acétonitrile ont été calculées de façon à représenter un 100% d'extraction théorique. Les urines surchargées ont été extraites selon la méthode mise en place, et éluées par l'acétonitrile. Chaque niveau a été extrait 3 fois. Les aires sous courbe (ASC) de chacun de ces niveaux de surcharge dans l'urine ont été comparées aux aires sous courbes des références (100% théoriques) préparées. Ce pourcentage nous a permis de calculer le coefficient d'extraction.

Surcharge		ASC Eau extrait	ASC Référence Non extrait		Coefficients d'extraction
10		616	20	728	
10		598	20	731	
10		442	20	631	
Moyenne		552	Moyenne	696,67	
					79,23%

100	3708	200	4362	90,41%
100	4150	200	4330	
100	3993	200	4416	
Moyenne	3950,33	Moyenne	4369,33	

Interprétation : le coefficient moyen d'extraction est d'environ 85% ce qui correspond au coefficient obtenu avec la technique d'extraction précédente. Ce coefficient d'extraction correspond aux spécifications souhaitées par le laboratoire.

4.13.2. Détermination de l'effet matrice

Principe : L'effet matrice peut être défini comme « l'influence du milieu sur l'élément dosé ». Ainsi à chaque niveau du système analytique. La matrice peut elle aussi réagir, il en résulte une sorte de « bruit » qui peut « noyer » le signal du composé étudié et ainsi diminuer son intensité c'est-à-dire ici de l'ASC (aire sous courbe) mesurée. Cet effet doit être évalué afin de ne pas engendrer de sous-estimation des dosages.

Mode opératoire : 1) Ici, nous avons utilisé du cortisol D4 afin de s'affranchir de la présence physiologique du cortisol dans l'urine utilisée pour ce test. Nous avons évalué la différence d'ASC du cortisol D4 d'urines extraites après surcharge à 3 niveaux de concentration et celle de volumes d'eau équivalents extraits après surcharge aux 3 mêmes niveaux de concentration¹⁸.

Surcharges dans l'eau

	ASC
10	616
10	598
10	442

100	3708
100	4150
100	3993

Surcharges dans l'urine

	ASC
10	188
10	181
10	179

100	1493
100	1319
100	1504

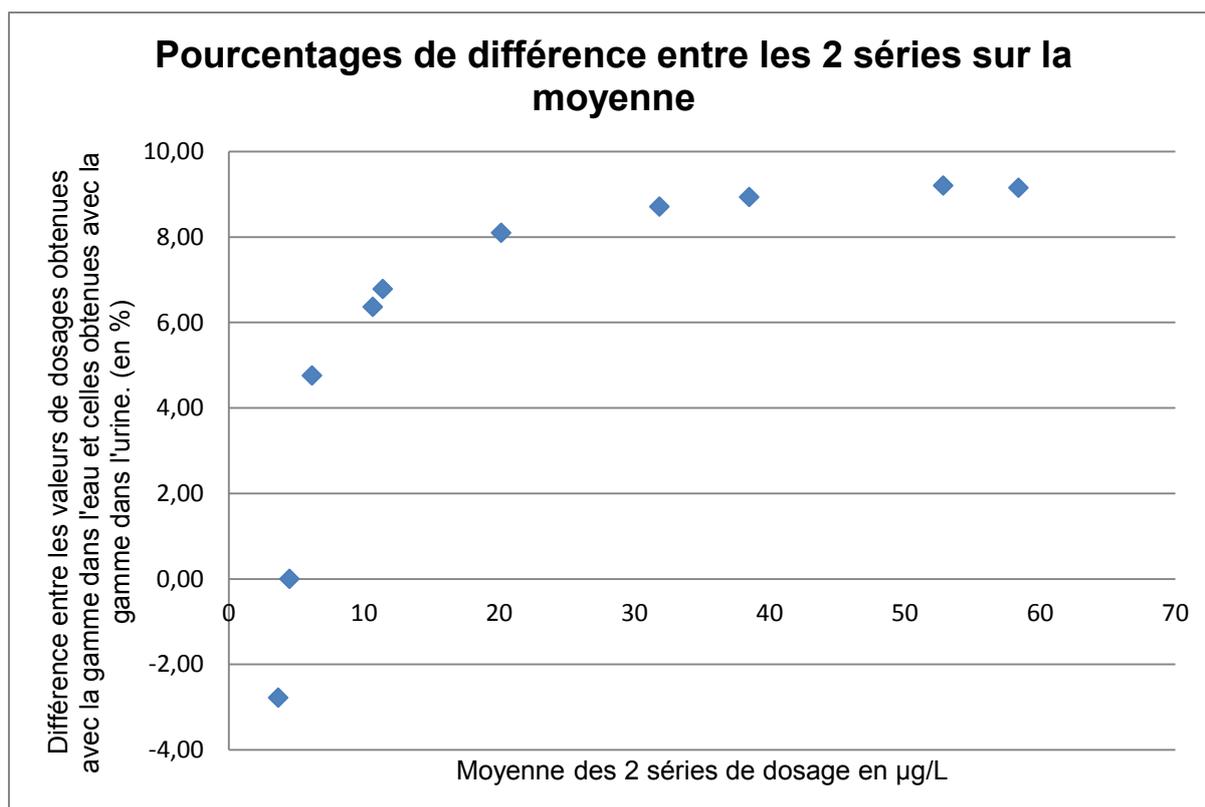
1000	20643
1000	21966
1000	20851

1000	11438
1000	10992
1000	10712

Interprétation : On constate qu'il existe un effet matrice important qui entraîne une diminution de l'ASC du CLU dans les urines par augmentation du bruit de fond.

2) Nous avons par ailleurs comparé des résultats de dosage de 10 urines obtenus avec une gamme diluée dans l'eau et ceux obtenus avec une gamme diluée dans une matrice urinaire afin d'évaluer l'effet matrice par la méthode des ajouts dosés.

gamme urine en µg/L	gamme eau en µg/L	%delta=
3,6	3,7	-2,78
4,5	4,5	0,00
6,3	6	4,76
11	10,3	6,36
11,8	11	6,78
21	19,3	8,10
33,3	30,4	8,71
40,3	36,7	8,93
55,4	50,3	9,21
61,2	55,6	9,15



Interprétation : On constate ici que, quel que soit la matrice de la gamme d'étalonnage qui a permis la détermination des concentrations en CLU, il n'y a pas de différence significative dans les résultats des patients qui serait susceptible d'entraîner un défaut d'interprétation. Ce delta, bien que faible (environ 5%) est le plus souvent de signe positif, c'est-à-dire que la valeur du dosage obtenue avec la gamme dans l'eau est quasi-systématiquement inférieure à celle obtenue avec la gamme dans l'urine. Ce qui corrobore bien la présence d'un effet matrice comme démontré précédemment. Cependant cet effet matrice est largement rattrapé grâce à l'ajout de l'étalon interne puisque l'on passe de 65% en ASC à 5% en concentration calculée chez les patients. Par ailleurs, il semblerait que l'effet matrice est d'autant plus important que la concentration en analyte à doser augmente, mais celui-ci n'excède pas 10%.

Conclusion : L'effet matrice existe, mais il a une très faible influence sur les résultats des dosages des échantillons patients. Ainsi, la gamme d'étalonnage du CLU sera diluée dans l'eau afin de faciliter la réalisation de la technique.

4.14. Essais concernant les paramètres de la phase préanalytique et pouvant influencer la phase analytique

4.14.1. Essais stabilité des échantillons

Principe : Cet essai n'entre pas dans la validation de méthode à proprement parler puisqu'il s'agit d'une évaluation de la phase pré-analytique. Mais les conditions de conservation des échantillons avant analyse doivent être déterminées car elles influencent fortement la phase analytique. Pour ce faire, nous avons évalué la stabilité du cortisol après conservation d'urines surchargées à plusieurs niveaux de concentration (2 niveaux, surcharge effectuée avec le niveau haut de la gamme d'étalonnage) :

- dans la matrice urinaire
 - 24h (j1) à température ambiante (sur paillasse) et 24h à 4°C (→ pouvant correspondre aux conditions de conservations réalisées chez le patient)
 - 4 jours (j4) à 4°C et à température ambiante (→ pouvant correspondre aux conditions de conservation avant analyse, au laboratoire ou chez le patient)
 - 3 semaines (m1) à -20°C et après 2 cycles de congélation décongélation (→ permettant d'évaluer l'influence des cycles gel-dégel lors des reprises de dosages au laboratoire)
- dans l'extrait repris dans la phase organique
 - 24h à température ambiante (en vial) (→ permettant d'envisager le cas où une série de dosages resterait inachevée suite à une panne de l'analyseur par exemple)
 - une semaine à 4°C (→ de même dans le cas où la panne aurait lieu un vendredi soir.)

Niveau 1 Valeur des concentrations en µg/L

j0	j1	
182,6	4°C	186
180,9	4°C	194,5
	4°C	188,5
	paillasse	189,6
	paillasse	185,1
	paillasse	184,3
	J0 vial	172
	J0 vial	167
	J0 vial	175,8
	J0 vial	178,8

j4	
4°C	184,1
4°C	193,4
4°C	183,8
paillasse	192,6
paillasse	165,6

M1	
congelé -20°C	
congelé -20°C	170,7
congelé -20°C	168,6
cycle congélation-décongélation	178,6
cycle congélation-décongélation	163,9
cycle congélation-décongélation	150,7

m=	178,68
et=	11,67
cv=	6,53

Niveau 2

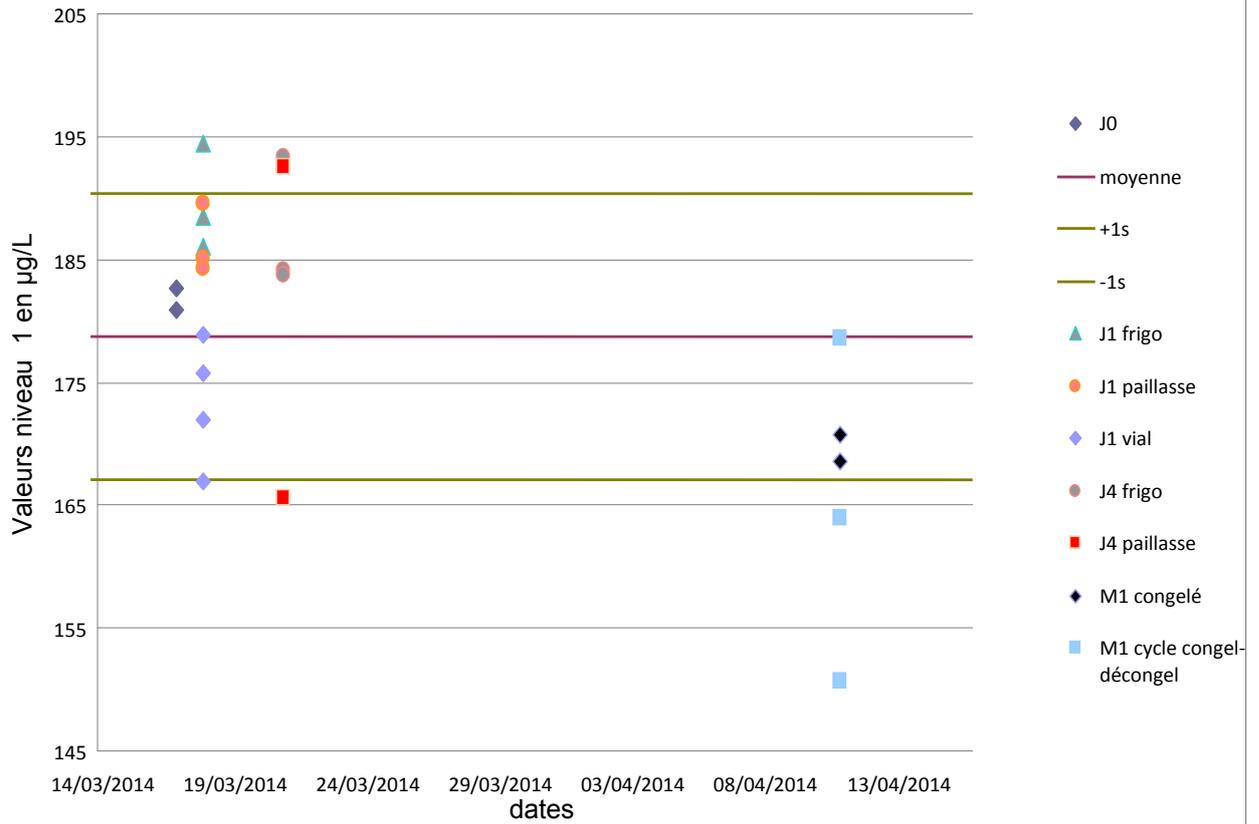
1729,3	4°C	1627,4
1547,1	4°C	1732,1
	4°C	1689,7
	paillasse	1678,9
	paillasse	1740,7
	paillasse	1738,3
	J0 vial	1662,1
	J0 vial	1669
	J0 vial	1507,2
	J0 vial	1475

4°C	1700,8
4°C	1644,4
4°C	1593,4
paillasse	1557,7
paillasse	1689,6

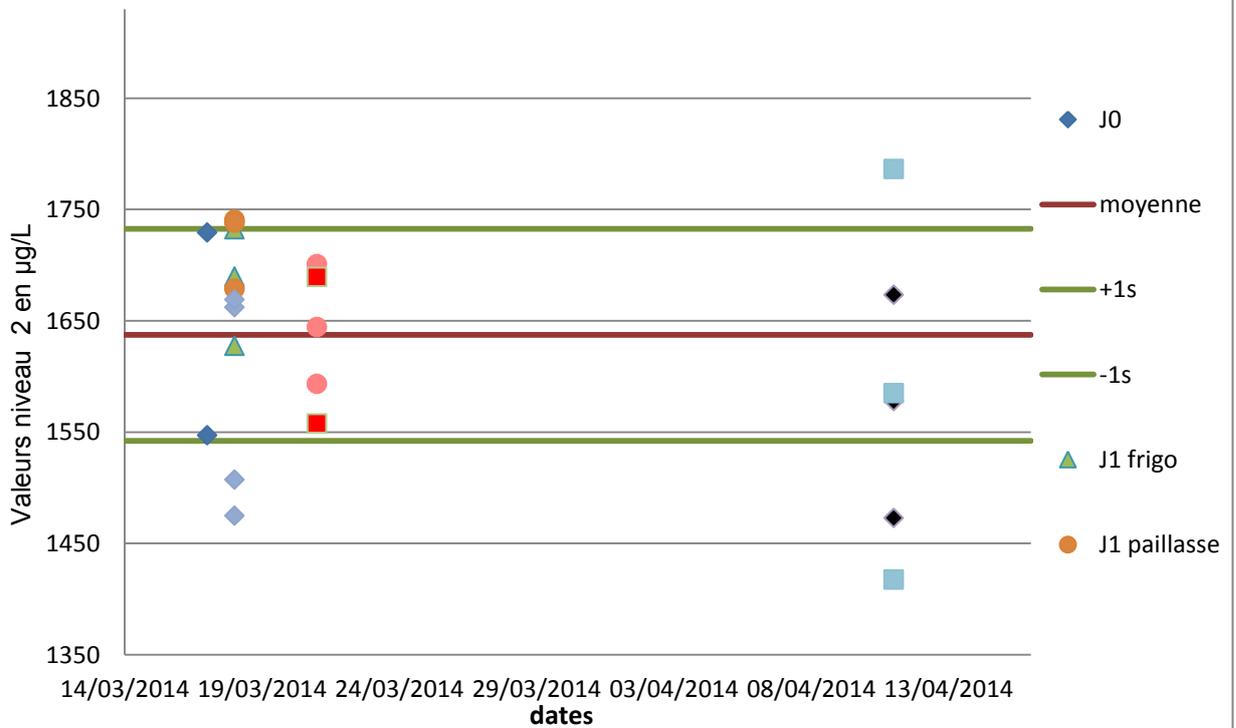
congelé -20°C	1472,9
congelé -20°C	1577,8
congelé -20°C	1673,3
cycle congélation-décongélation	1417,6
cycle congélation-décongélation	1584,9
cycle congélation-décongélation	1786,3

m=	1630,24
et=	94,64
cv=	5,81

Stabilité de l'échantillon selon les conditions de conservation



Stabilité de l'échantillon selon les conditions de conservation



Interprétation : On constate que pour les 2 niveaux testés, les CV obtenus dans les différentes conditions de conservation sont faibles (aux alentours de 10%). Par ailleurs sur les courbes de suivi des valeurs dans ces différentes conditions, on ne visualise pas de dérive majeure pour le niveau haut. On observe une petite diminution de la concentration testée pour le niveau bas dans des conditions de congélation pendant un mois avec deux cycles de congélation/décongélation. On peut se poser la question de la significativité de cette diminution, aussi imputable aux variations liées à l'aliquotage, et soumise aux mêmes variations que pour l'essai de reproductibilité (plaque d'extraction, opérateurs différents).

En conclusion, le cortisol urinaire est effectivement stable dans les conditions de conservation sus-citées. Ceci est en accord avec les données publiées dans la littérature^{6,18,19}. Les analyses sur les urines congelées ne doivent être réalisées qu'exceptionnellement, en vue d'un contrôle, ou à titre de comparaison avec le premier dosage.

4.14.2. Evaluation de l'influence du PH sur la qualité de l'extraction.

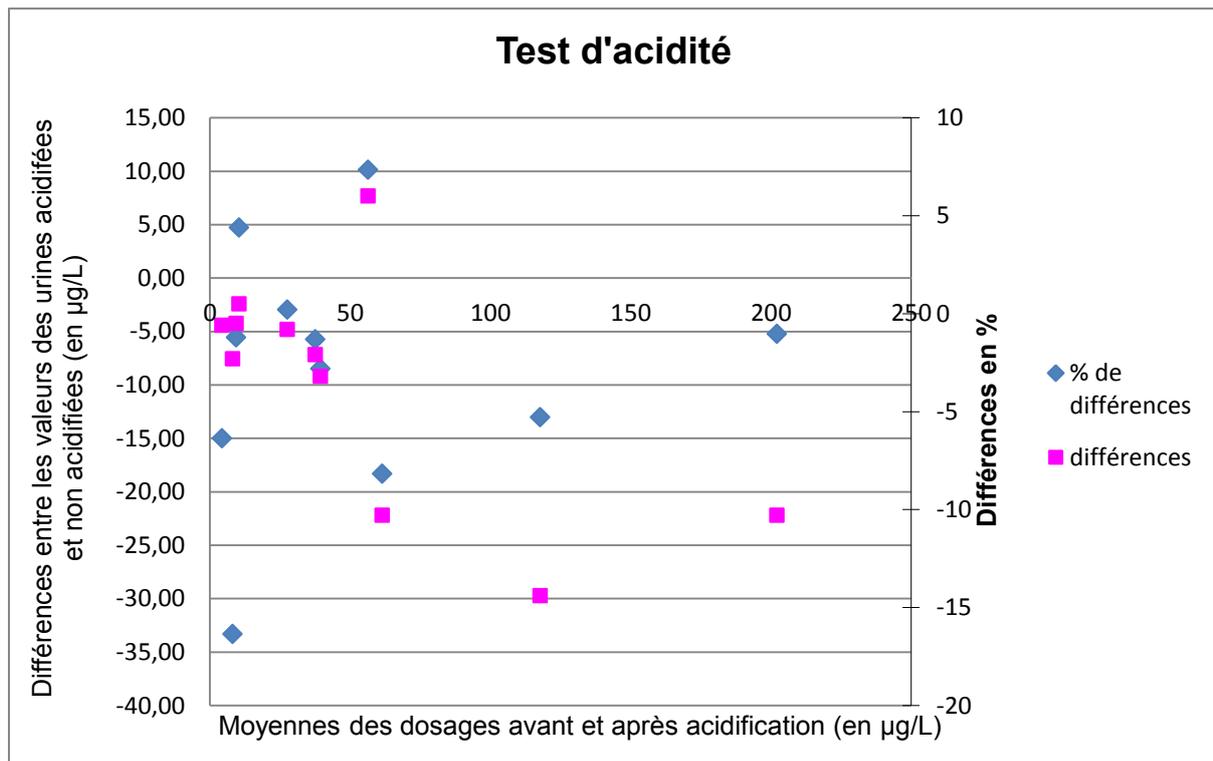
Principe : L'extraction d'un composé polaire depuis sa matrice (qu'il s'agisse d'une extraction liquide-liquide ou de type SPE) est fortement influencée par le pH de celle-ci. En effet, la présence d'ion H^+ dans le milieu conditionne le niveau d'ionisation de la molécule et fait ainsi varier sa solubilité et donc son coefficient de partage. Ainsi, pour certaines extractions depuis des matrices biologiques comme l'urine, dont le pH est relativement variable, il est parfois nécessaire de les acidifier (comme recommandé pour d'autres analyses urinaires). Cet effet est moindre pour les molécules faiblement ionisées comme le cortisol, mais il reste indispensable de vérifier son influence afin de déterminer si oui ou non un prétraitement des urines par acidification est nécessaire.

Mode opératoire : le cortisol des urines de 12 patients a été dosé avant et après acidification avec de l'acide chlorhydrique très concentré afin de ne pas (ou très peu) les diluer. Les pH de ces urines ont ainsi été ramenés dans un intervalle de 2,5 à 4,5 de pH. Les différences entre les valeurs obtenues ont ainsi pu être étudiées.

urines acidifiées (concentration en µg/L)	PH
2	3,44
4	3,55
9,2	4,88
10,6	4,25
9	2,59
27,1	2,87
36,5	3,19
37,7	3,2
59,3	3,4
56,2	2,85
110,5	2,84
197	3,35

urines non acidifiées (concentration en µg/L)	PH
0,5	7,28
4,6	5,7
6,9	9,6
10,1	7,52
9,5	6,6
27,9	5,35
38,6	5,3
40,9	5,5
53,3	6,45
66,5	6,65
124,9	5,23
207,3	5,95

%delta=	d	m
75,00	1,5	1,25
-15,00	-0,6	4,3
-33,33	-2,3	8,05
4,72	0,5	10,35
-5,56	-0,5	9,25
-2,95	-0,8	27,5
-5,75	-2,1	37,55
-8,49	-3,2	39,3
10,12	6	56,3
-18,33	-10,3	61,35
-13,03	-14,4	117,7
-5,23	-10,3	202,15



Interprétation: les urines dosées après acidification donnent en moyenne des valeurs inférieures. Cette différence étant cependant minime, il a été décidé de ne pas refuser les urines acidifiées pour conservation des métabolites urinaires.

4.15. Conclusions

	Conclusions de la validation de méthode
Répétabilité	Acceptable
Reproductibilité	Acceptable
Justesse	en cours
Linéarité	Linéaire jusqu'à 500 µg/L
Limite de détection	Ininterprétable
Limites de quantification	<2.5 µg/L
Spécificité	Bonne, 3% de cortisone interférant, liée à l'isotope naturel O ¹⁸
Contamination	Acceptable
Stabilité des réactifs	Acceptable
Incertitudes	Calcul non réalisé
Corrélation	Acceptable
Coefficient d'extraction	85% acceptable
Effet matrice	Présent mais diminué par l'étalon interne = acceptable
Effet du pH	Légère diminution des concentrations en analyte, mais non significatif = acceptable
Stabilité avant analyse	Acceptable 4 jours à 4°C, exceptionnellement à température ambiante, et à -20°C 3 semaines
Conclusion finale :	Passage en routine possible

5. Dosage du cortisol urinaire sur le 5500-Qtrap

Pour ce dosage, seul l'analyseur change, la technique d'extraction, le mode opératoire, la gamme et les contrôles restent les mêmes que pour le dosage du cortisol urinaire sur le Quattro-micro.

Ainsi, la validation de méthode a été reprise à minima. N'ont pas été réévalués les paramètres qui ne dépendaient pas de l'analyseur, comme : la stabilité de l'échantillon, l'influence du pH sur la phase d'extraction, la contamination liée à l'extraction sur plaque, le coefficient d'extraction, et l'effet matrice. De plus la contamination liée au pipetage étant évaluée sur le Q-trap dans la validation du cortisol salivaire, elle n'a pas été refaite. Enfin, la limite de détection étant jugée non nécessaire (et non réalisable) pour ce dosage, nous ne l'avons pas évaluée.

Ont été testées : la répétabilité, la reproductibilité, la linéarité, la limite de quantification, la corrélation 5500-Qtrap versus Quattro-micro, et la contamination au sein de l'automate. La méthodologie de ces essais étant identique à celle utilisée précédemment, elle n'est pas re-décrite ci-après. Seuls les traitements statistiques et les interprétations y figurent.

5.1. Répétabilité et reproductibilité

Echantillons	Nombre (N)	Moyenne en µg/L	Ecart-type	CV (%)	CV (%) limite (hors fournisseurs)	Conclusion
Echantillon niveau 1	10	8,43	0.41	5%	10	acceptable
Echantillon niveau 2	10	121.7	9.33	8%	10	acceptable
Echantillon niveau 3	10	139.1	2.60	2%	10	acceptable

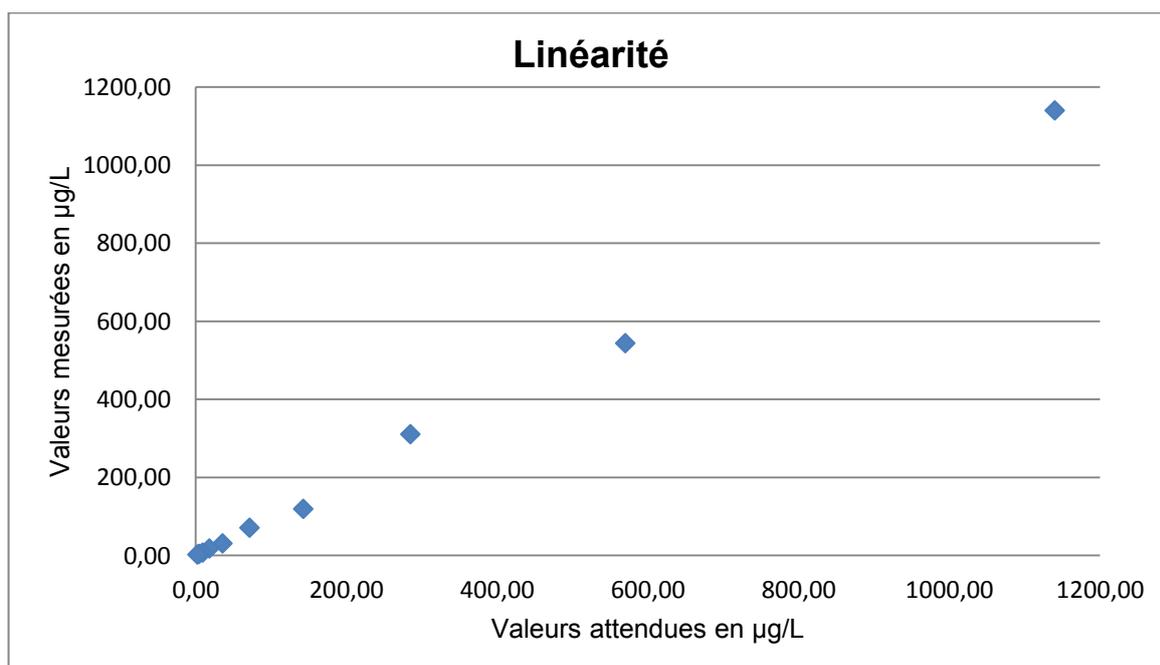
Interprétation : les coefficients de variation obtenus sont inférieurs au seuil de 10% que nous nous sommes fixé, la technique est donc répétable selon nos critères.

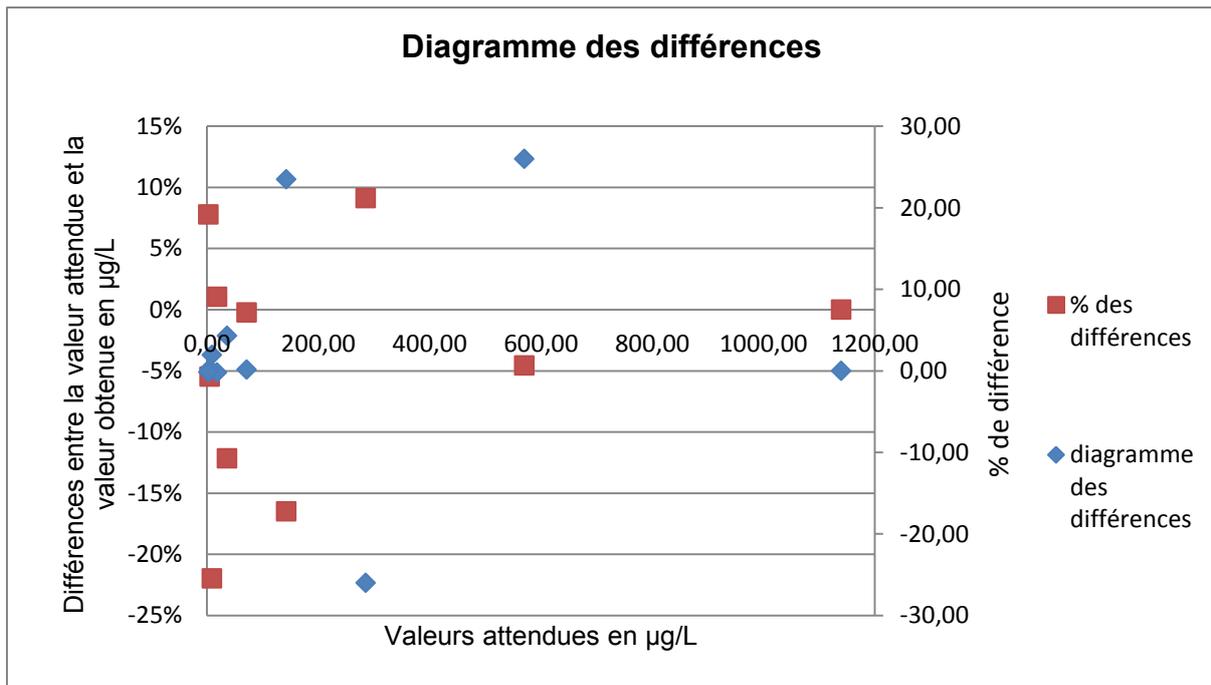
Echantillons	Nombre (N)	Moyenne en µg/L	Ecart-type	CV (%)	CV (%) limite défini	Conclusion
Echantillon niveau 1	5	9,98	1.33	13%	13%	acceptable
Echantillon niveau 2	5	142.0	14.28	10%	13%	acceptable

Interprétation : L'étude de reproductibilité est en cours, plus de valeurs sont nécessaires pour obtenir une significativité statistique suffisante. Par ailleurs l'augmentation du nombre de valeurs pour cet essai devrait nous donner des CV inférieurs à ceux que nous avons actuellement, et ainsi être conforme à nos spécifications.

5.2. Linéarité

Facteur de dilution	Pur	1/2	1/4	1/8	1/16	1/32	1/64	1/128	1/256	1/512
Valeur théorique en µg/L	1140	570	285	142.5	71.25	35.63	17.81	8.91	4.453	2.227
Valeur mesurée en µg/L	1140	544	311	119	71.1	31.30	18	6.95	4.21	2.40
Pourcentage de recouvrement (%)	100	105	91	116	100	112	99	122	105	92





Interprétation : Le dosage offre une bonne linéarité sur l'ensemble du domaine étudié (coefficient de corrélation proche de 1), et les différences observées sont minimales. Les pourcentages de différence sont plus élevés dans les valeurs basses du dosage (ce qui est inhérent au calcul d'un pourcentage).

Enfin, le point le plus haut de la gamme d'étalonnage (500 µg/L) est situé dans le domaine de linéarité étudié.

Conclusion : la linéarité de cette méthode peut être validée pour le domaine étudié jusqu'à 500 µg/L.

5.3. Limite de quantification

Analyte	Moyenne (en µg/L)	Ecart-type	CV%
Cortisol urinaire	3,47	0,41	12%
	2,09	0,37	18%
	0,47	0,30	64%

Interprétation : si l'on se fixe un CV limite 20% comme dans l'évaluation de la LOQ du CLU sur le Quattro-micro, on obtient une limite quantification 2,09 µg/L. Ceci est tout à fait correct puisque, comme expliqué antérieurement (confère paragraphe

4.1.1.1 partie I) il n'est pas nécessaire d'avoir une LOQ très basse pour le cortisol urinaire. Nous nous fixons donc à nouveau comme limite de quantification le dernier point de la gamme d'étalonnage, à 2,5 µg/L.

5.4. Justesse

Comme pour le dosage du CLU sur le Quattro micro, les EEQ de l'année 2013-2014 seront passés sur le Qtrap pour comparaison avec nos pairs.

5.5. Spécificité

Confère paragraphe 4.5 partie III. La spécificité de cette technique est meilleure que sur le Quattro-micro, ceci est dû à une meilleure séparation chromatographique des composés (UPLC).

5.6. Conclusions

	Conclusions de la validation de méthode
Répétabilité	Acceptable
Reproductibilité	Plus de valeurs nécessaires
Justesse	en cours
Linéarité	Linéaire jusqu'à 500 µg/L
Limite de détection	Identique au cortisol urinaire sur le Quattro micro
Limites de quantification	2,5 µg/L
Spécificité	Bonne, meilleure que sur le Quattro-micro
Contamination	Acceptable
Stabilité des réactifs	Acceptable
Incertitudes	Calcul non réalisé
Corrélation	Acceptable
Influence du pH, Effet matrice, coefficient d'extraction....	Confère tests effectués sur le Quattro micro
Conclusion finale :	Passage en routine possible

6. Dosage du cortisol salivaire

6.1. Mode opératoire

Protocole d'extraction :

0. Etape de prétraitement des échantillons de salive avec du « digesteur » (Dithiothreitol ayant un pouvoir réducteur sur les ponts disulfure) afin de fluidifier les échantillons (5µL pour chaque échantillon et pour la gamme, puis passage à 37°C à l'étuve).
1. Préparation de la plaque : dépôt de 400µL de MeOH (méthanol) par puits → puis aspiration et rejet.
2. Lavage de la plaque : dépôt de 400µL de H₂O par puits → puis aspiration et rejet
3. Dépôt des échantillons incluant 10% de MeOH (total=250µL) et de l'EI (25µL) par puits → puis aspiration et rejet.
4. Lavage de la plaque → dépôt de 400µL d'un mélange MeOH/H₂O (10/90) par puits → puis aspiration et rejet.
5. Elution récupération des échantillons par 125 µL de MeOH par puits → puis aspiration et récupération pour passage sur le 5500 Q-trap.

Préparation de la gamme d'étalonnage de l'étalon interne et des contrôles

La gamme d'étalonnage est préparée extemporanément par dilution au 1/10^{ème} dans de l'eau distillée d'une gamme mère préparée à partir de l'étalon interne et conservée au congélateur. Elle s'étend de 0,05 à 10 ng/mL (soit 0,14 à 27,54 nmol/L).

L'étalon interne est utilisé à une concentration de 10 ng/mL dans une solution d'eau (24 mL) d'acide orthophosphorique (1 mL) et d'albumine (10 µL).

Les contrôles internes de qualité sont des contrôles lyophilisés de chez biorad, reconstitués dans l'eau distillée, et dilués selon le contrôle. Le CIQ niveau 1 est dilué au 1/10^{ème}, au 1/30^{ème} et au 1/100^{ème} de façon à avoir 3 points de contrôle par gamme.

6.2. Evaluation de la répétabilité

Mode opératoire : Pour évaluer la répétabilité, nous avons déterminé le coefficient de variation (CV) de 10 répétitions de dosage (la même série) des échantillons de CIQ Biorad sur trois niveaux : CIQ 1/10^{ème}, CIQ 1/30^{ème}, CIQ 1/100^{ème}.

Un choix de 10 répétitions a été retenu pour les mêmes raisons que précédemment.

Echantillons	Nombre (N)	Moyenne en nmol/L	Ecart-type	CV (%)	CV (%) limite fixé	Conclusion
CIQ 1/100 ^{ème}	10	0,94	0,07	9%	10	acceptable
CIQ 1/30 ^{ème}	8	2,66	0,14	5%	10	acceptable
CIQ 1/10 ^{ème}	8	7,44	0,23	3%	10	acceptable

Remarque : les différents niveaux n'ayant pas été testés dans les mêmes séries de dosage, nous n'avons pas forcément le même nombre de répétitions par niveau.

Conclusion : notre dosage est répétable selon nos critères.

6.3. Evaluation de la fidélité intermédiaire (reproductibilité)

Mode opératoire : l'évaluation de la répétabilité a été faite de la même façon que pour le cortisol urinaire, sur 3 niveaux du CIQ, avec un minimum de 10 répétitions.

Echantillons	Nombre (N)	Moyenne en nmol/L	Ecart-type	CV (%)	CV (%) limite défini	Conclusion
CIQ 1/100 ^{ème}	12	0,78	0,14	18%	15	acceptable
CIQ 1/30 ^{ème}	11	2,23	0,28	13%	15	acceptable
CIQ 1/10 ^{ème}	11	7,16	0,87	12%	15	acceptable

Remarque : le même nombre de passages par niveau est différent, car tous les contrôles n'ont pas été systématiquement passés à chaque série de dosage.

Conclusions : Le coefficient de variation obtenu avec le niveau bas est supérieur aux spécifications que nous nous sommes fixées, mais ce point se situe à la limite de quantification que nous avons définie paragraphe 6.9 partie III. Les performances en termes de reproductibilité sont conformes à nos attentes.

6.4. Evaluation de la justesse

Mode opératoire : l'inexactitude ne peut être calculée pour l'instant. En effet il n'existe pas d'EEQ pour cette analyse. Un programme de CIL est en cours d'élaboration avec d'autres CHU (CHU de Tours, Anger, Nantes, Orléans).

6.5. Evaluation de la spécificité⁴

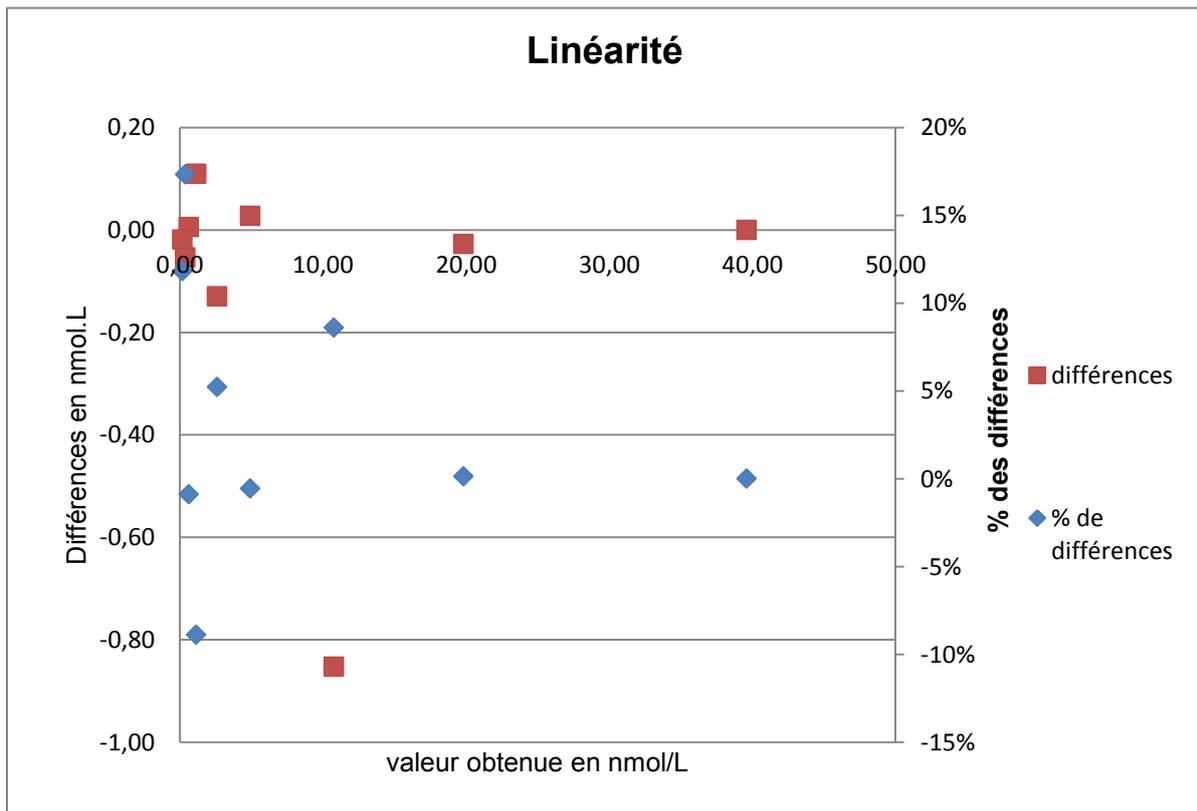
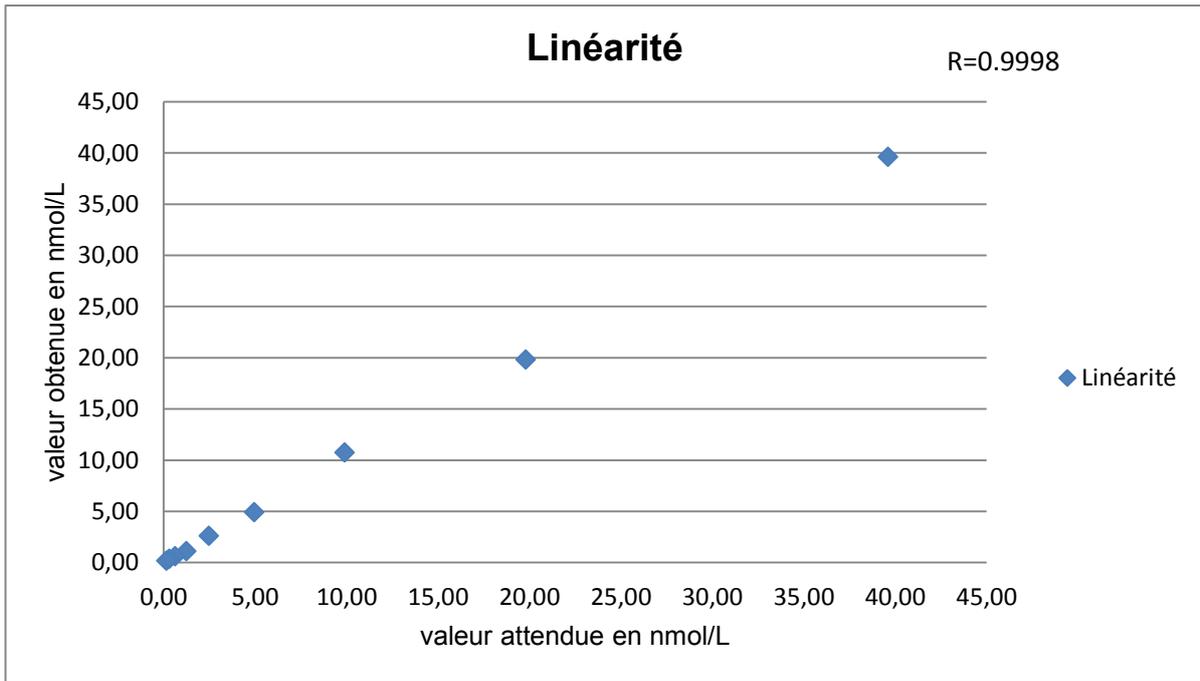
Confère paragraphe 4.5 partie III.

6.6. Evaluation de la linéarité

Mode opératoire : Elle a été évaluée de la même manière que pour le dosage du cortisol urinaire. Un grand volume de salive a été surchargé en cortisol (par ajout d'un faible volume de solution mère à 50 ng/mL (137,5 nmol/L) servant à l'établissement de la gamme d'étalonnage) de façon à obtenir une concentration d'environ 15 ng/mL (41,25 nmol/L). Cette solution a ensuite été diluée de 2 en 2 sur tout le domaine de mesure.

Le point le plus haut qui a été évalué pour cette étude est situé donc aux alentours de 7 ng/mL (environ 20 nmol/L correspondant à la première dilution au demi). Ainsi, n'ayant pu étudier la linéarité de la méthode sur un domaine plus étendu, tout échantillon dont le dosage donnera une valeur supérieure à ce point devra être dilué afin de revenir dans un domaine de linéarité connu et validé.

Facteur de dilution	Pur	1/2	1/4	1/8	1/16	1/32	1/64	1/128	1/256
Valeur théorique en nmol/L	39,60	19,80	9,90	4,95	2,48	1,24	0,62	0,31	0,15
Valeur mesurée en nmol/L	39,60	19,83	10,75	4,92	2,60	1,13	0,61	0,36	0,17
Pourcentage de recouvrement	100%	100%	91%	101%	95%	109%	101%	83%	89%



Interprétation : Le dosage offre une bonne linéarité sur l'ensemble du domaine étudié (coefficient de corrélation proche de 1), et les différences observées sont minimales.

Conclusion : la linéarité de cette méthode peut être validée jusqu'à une valeur de 20 nmol/L, tout dosage donnant une valeur supérieure à ce seuil devra être répété après dilution de l'échantillon pour entrer dans le domaine de linéarité testé. Le dernier point de notre gamme d'étalonnage est situé à une valeur de 27,5 nmol/L et n'entre pas dans le domaine de linéarité testé. Ce point est très haut compte tenu des valeurs de références définies (paragraphe 6.13 partie III), et n'apporte pas d'information supplémentaire pour notre dosage, il est donc envisagé de le supprimer.

6.7. Evaluation de la contamination

Mode opératoire : Les mêmes risques de contamination que pour le cortisol urinaire ont été identifiés (liées au pipetage dans l'automate ou à l'extraction sur plaque.

Ainsi l'étude de la contamination a été réalisée de la même manière. Les résultats sont les suivants :

1) Contamination liée au pipetage dans l'automate :

Série 1 (nmol/L)	H1	28,52	B1	0,17	
	H2	29,37		B2	0,11
	H3	28,46		B3	0,17
Série 2 (nmol/L)	H1	24,97	B1	0,17	
	H2	27,06	B2	0,17	
	H3	24,81	B3	0,17	
Série 3 (nmol/L)	H1	27,36	B1	0,17	
	H2	26,92	B2	0,06	
	H3	24,81	B3	0,08	

Moyenne B1 (mB1)=0,17

Moyenne B3 (mB3)=0,14

Moyenne H (mH)=26,92

Contamination = $(mB1 - mB3) / mBH * 100 = 10,22\%$

Ce pourcentage a été jugé non significatif.

2) Concernant la contamination entre deux échantillons à proximité sur la plaque d'extraction, il n'a pas été jugé nécessaire de la réévaluer. Celle-ci a déjà été étudiée pour le cortisol urinaire et nous utilisons les mêmes plaques d'extraction.

6.8. Détermination de la limite de détection

La LOD n'a pas été réévaluée ici. S'agissant du même type d'analyse (exploitation des données à partir d'aire sous courbe) les résultats auraient été inexploitable comme dans le cas du cortisol urinaire sur le Quattro-micro (confère paragraphe 4.8 partie III).

6.9. Détermination de la limite de quantification

Mode opératoire : pour cette détermination le protocole mis en œuvre est le même que pour le cortisol urinaire. Trois salives ayant des valeurs de cortisol *a priori* proches de la valeur de la limite de détection de notre ancienne technique (1nmol/L) ont été dosées huit fois dans une même série de dosage. Le CV des 8 dosages a été déterminé pour chaque niveau. La valeur du niveau dosé donnant un CV supérieur à 20% a été définie comme étant la limite de quantification.

Analyte	Moyenne en nmol/L	Ecart-type	CV%
Cortisol salivaire	0,33	0,06	17%
	0,28	0,05	19%
	1,00	0,15	15%

Interprétation : les CV de ces répétitions restent inférieurs à 20% pour les 3 niveaux testés. Cette technique offre donc une limite de quantification basse⁴⁰, jusqu'au dernier point de concentration testé. Il a donc été décidé de garder comme limite de détection, la valeur de l'avant dernier point de notre gamme d'étalonnage 0,28 nmol/L.

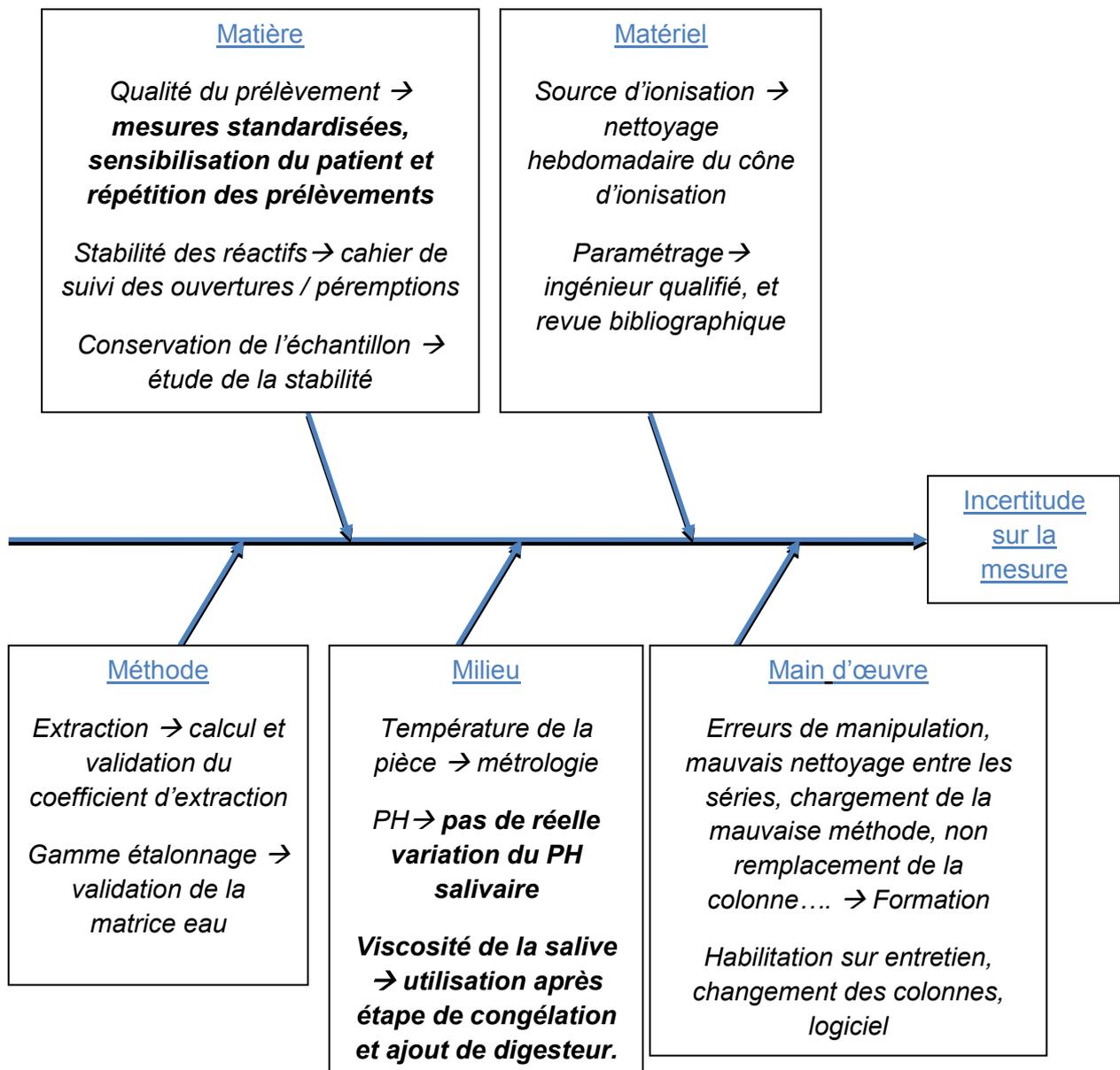
Conclusion : La limite de quantification a été validée à 0,28 nmol/L. Tout résultat d'un échantillon donnant une concentration inférieure au dernier point de gamme sera rendu comme inférieur à 0,28 nmol/L.

6.10. Evaluation de la stabilité des réactifs

Mode opératoire : Cette évaluation est en cours de réalisation compte tenu de l'acquisition récente du 5500Q-trap.

6.11. Détermination des incertitudes

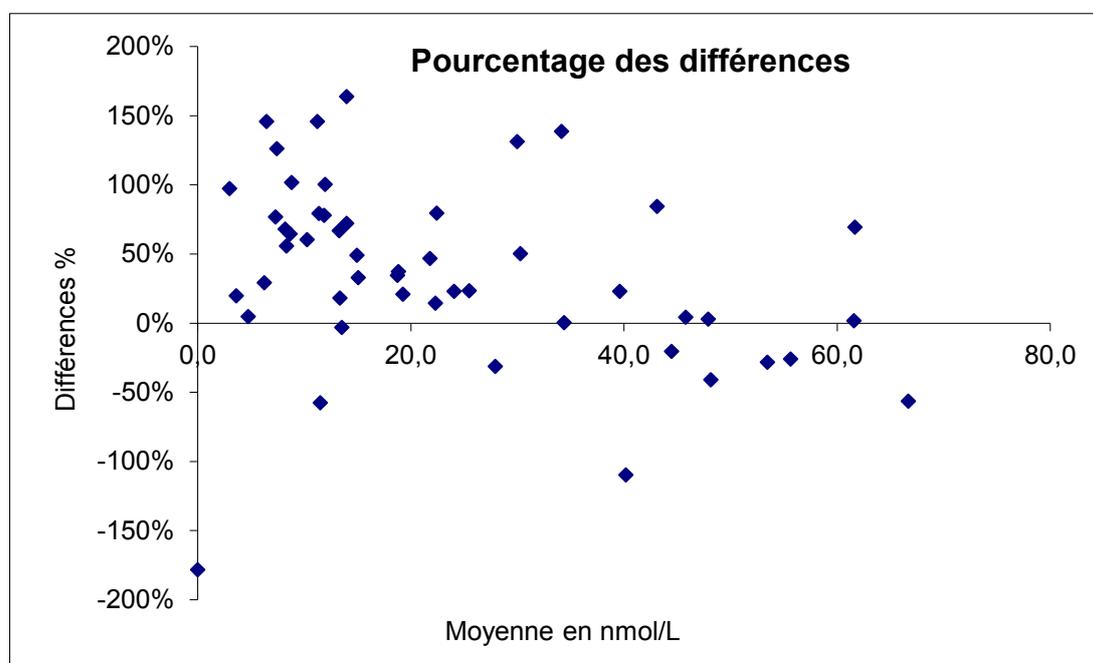
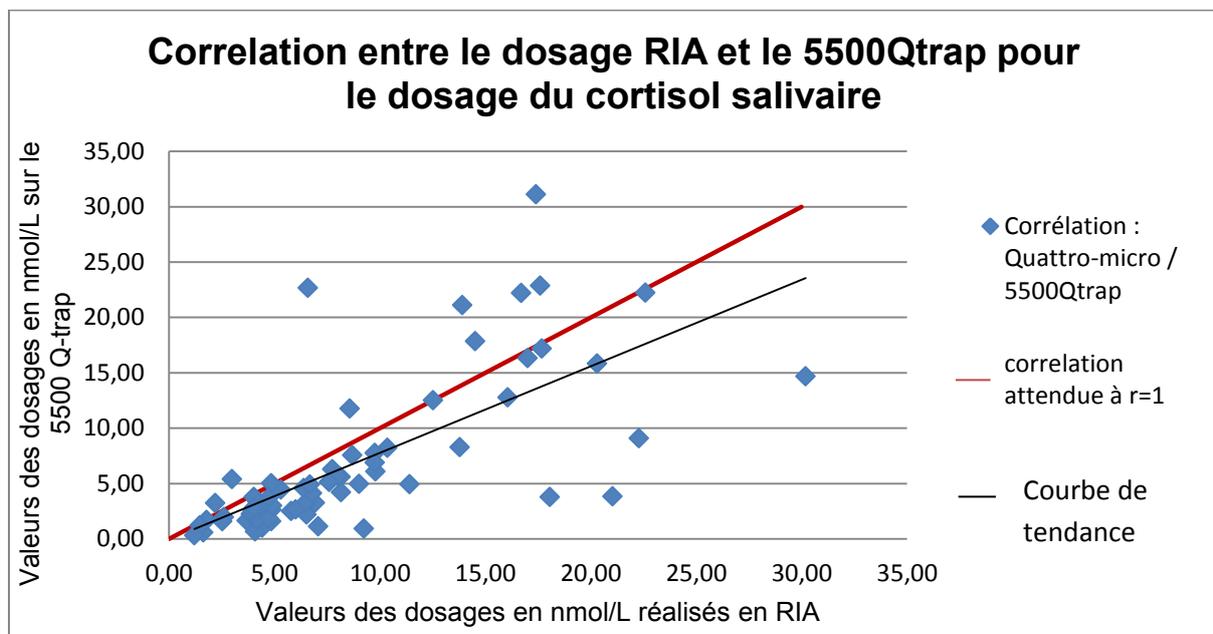
Commentaire : Pour le calcul de l'incertitude de mesure, il est nécessaire d'utiliser un EEQ. Il n'existe pas de programme de qualité pour le cortisol salivaire. Le calcul de l'incertitude ne sera donc réalisé qu'après mise en place du programme de contrôle inter-laboratoire (CIL) actuellement en cours d'élaboration. C'est pourquoi seule une analyse de risque « à minima » a été réalisée afin de mettre en avant les paramètres à maîtriser.



6.12. Comparaison de méthode

Mode opératoire : Les échantillons de patients (70) ont été analysés en technique RIA (technique A), puis ils ont été analysés sur le 5500Q-trap avec la technique d'extraction de type SPE (technique B).

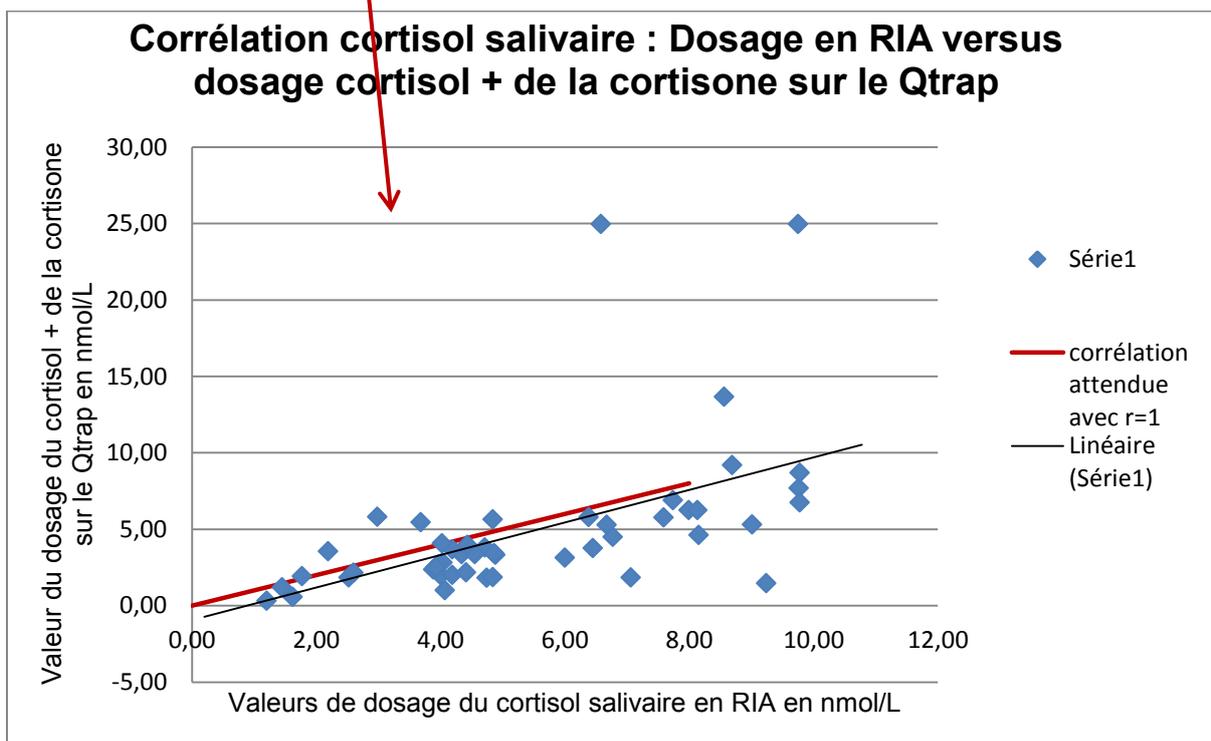
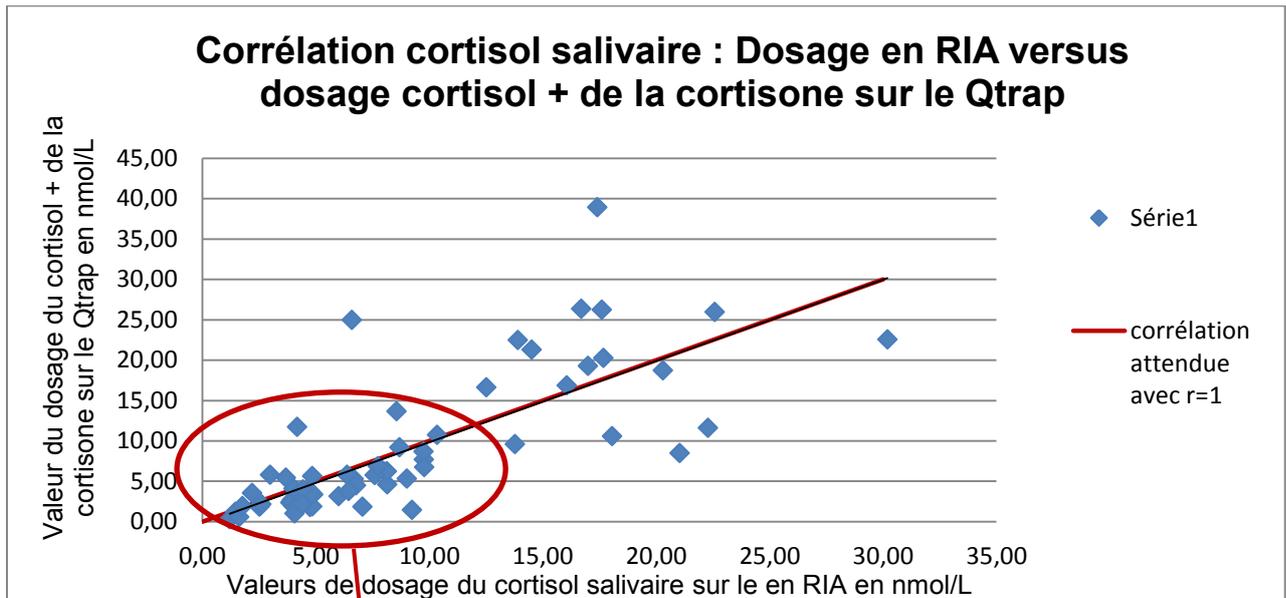
Coefficient de corrélation (r) = 0,71



Interprétation : Le coefficient de corrélation entre les 2 techniques n'est pas très satisfaisant, le nuage de points est relativement dispersé et les pourcentages de

différences assez variables. Nous avons donc voulu vérifier si cette mauvaise corrélation n'était pas liée au dosage de la cortisone qui interfère en technique RIA et qui est par contre bien séparée sur le 5500 Q-trap. Pour cela, nous avons refait une corrélation entre le dosage du cortisol salivaire en RIA, et le dosage de la cortisone + du cortisol salivaire sur le 5500Qtrap. Les résultats sont représentés ci-dessous, après rejets des valeurs aberrantes.

Coefficient de corrélation : $r = 0,760$



Conclusion : On constate que le coefficient de corrélation est sensiblement meilleur, et que la courbe de tendance se rapproche de la droite idéale attendue (1 pour 1) quand on ajoute la valeur de la cortisone à celle du cortisol sur le Qtrap. La mauvaise corrélation entre les 2 techniques pourrait donc s'expliquer par la différence de spécificité de ces 2 dosages. Cependant les dispersions entre les 2 techniques restent importantes, et la technique de dosage sur le Qtrap donne des valeurs plus basses qu'en RIA^{12,4} (confère paragraphe suivant). Cette mauvaise corrélation n'est donc pas totalement élucidée.

6.13. Détermination des valeurs de référence :

La corrélation entre les 2 techniques n'étant pas optimale il a fallu redéfinir les valeurs de référence.

Mode opératoire : Les valeurs de références du cortisol salivaire à minuit dans les conditions de dosage décrites partie I, paragraphe 4.1.2.2 ont été déterminées de 2 façons:

- 1) La première suivant les recommandations du COFRAC (SH GTA 04)³⁴ : les salives d'une quarantaine de personnes ont été dosées sur le 5500Qtrap. La moyenne et l'écart-type de cette série ont été calculés, permettant ainsi d'écartier les valeurs statistiquement « aberrantes » situées au-delà de l'intervalle $[m \pm 2s]$. Après avoir écarté ses valeurs, une moyenne tronquée ainsi que son écart type ont été calculés. Ainsi, l'intervalle de référence suivant a pu être déduit $[m_t \pm 2s_t]$, il comprend ainsi 95% des valeurs dites normales pour une population saine, à minuit.

Nombre de valeurs	Moyenne (m) des dosages en nmol/L	Ecart type (s) en nmol/L	m+ 2s
54	1,24	1,49	4,21

Nombre de valeurs	Moyenne (m _t) tronquée en nmol/L	Ecart type (s _t) tronqué en nmol/L	m _t +2s _t en nmol/L
53	1,13	1,29	3,7

Résultats : l'intervalle de référence pour le dosage du cortisol salivaire à minuit pour notre technique est donc le suivant : [0 nmol/L ; 3.7 nmol/L].

- 2) La seconde consiste à utiliser la médiane et les 0.05^{ème} et 95^{ème} percentiles de notre série de données.

Nombre de valeurs	Médiane des dosages en nmol/L	Centile 0.05 en nmol/L	Centile 0.95
54	0,6	0,2	4,1

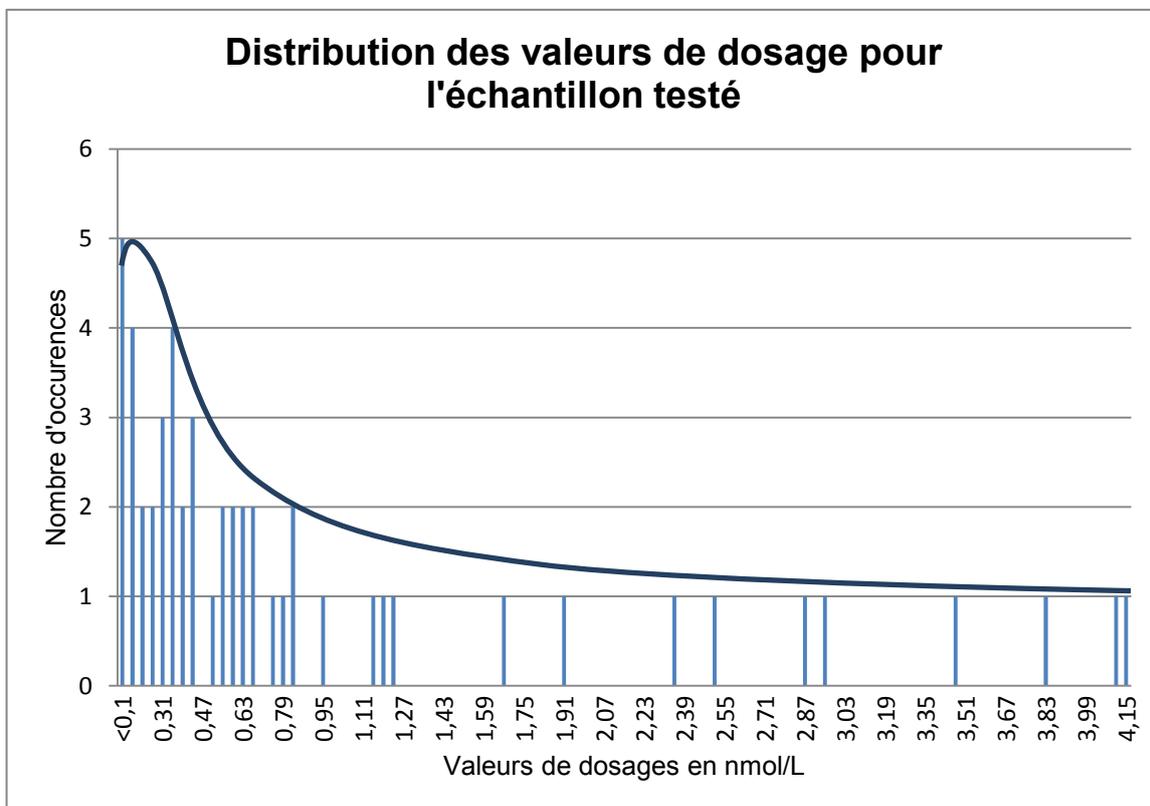
Résultats : avec cette méthode de calcul l'intervalle de référence pour le dosage du cortisol salivaire à minuit pour notre technique est donc le suivant : [0 nmol/L ; 4,1 nmol/L]¹².

Interprétation : les 2 méthodes de calculs sont discutables. Premièrement, ces méthodes sont toutes les deux utilisables en pratique courante^{41,42,43}, mais dans les 2 cas il est recommandé d'utiliser un minimum de 120 valeurs de dosages⁴⁴ pour que l'incertitude de calcul sur les bornes de l'intervalle soit la plus faible possible. Ceci n'a pas pu être réalisé car il est difficile en pratique courante d'obtenir un tel échantillon. La première méthode énoncée par le COFRAC propose l'utilisation de la moyenne pour la détermination de cet intervalle, hors celle-ci est possible uniquement quand les valeurs de dosages de l'analyte dans la population se distribue de façon Gaussienne, ce qui est rarement le cas en biologie médicale (et cela ne l'est pas non plus dans notre cas, confère histogramme ci-dessous). La seconde proposée par le CLSI (Clinical Laboratory of Standards Institute) et le IFCC (International Federation of Clinical Chemistry) s'applique dans les cas où la moyenne est non utilisable, et fait appel à l'utilisation de la médiane, il s'agit d'une méthode non paramétrique. Dans les 2 cas, les individus constituant la population de référence sont sélectionnés, (ici à priori). Et des valeurs considérées comme aberrantes sont supprimées après une première détermination de cet intervalle, qui est ensuite recalculé.

Il existe donc d'abord un biais d'échantillonnage. Par ailleurs dans cet échantillon, nous disposons de plusieurs valeurs, correspondant à celles d'un même patient (sain pour cette pathologie, mais ayant eu des prélèvements à des dates différentes,

il ne s'agit donc pas réellement de patients différents). Ne disposant pas d'un nombre de valeurs suffisant cette détermination devra être affinée par rajout à postériori d'autres dosages.

Une autre technique consisterait à déterminer le seuil décisionnel pour le diagnostic de Cushing, qui offrirait le meilleur couple sensibilité spécificité, grâce à l'établissement d'une courbe ROC (receiver operating characteristic). En pratique, cette détermination est très complexe, puisqu'elle suppose de tester des serums utilisés lors du diagnostic (avant traitement) et surtout de connaître le diagnostic final posé pour ces patients et donc procéder au recueil des renseignements cliniques sur un nombre important de diagnostics posés...



Conclusion : nous avons donc décidé de garder la seconde estimation du fait de la distribution non gaussienne et du faible nombre de valeurs. Les valeurs de référence du cortisol salivaire sont inférieures en spectrométrie de masse aux données obtenues en RIA. Ces données sont en accord avec celles retrouvées dans la littérature^{12,40}.

6.14. Essais spécifiques à la méthode

6.14.1. Détermination du coefficient d'extraction

Mode opératoire : Pour le calculer nous avons surchargé de la salive à 3 niveaux de concentration avec du standard interne deutéré. Ce standard interne deutéré a par ailleurs été dilué à 2 niveaux de concentration dans le méthanol. Les concentrations de ces surcharges dans le méthanol ont été calculées de façon à représenter un 100% d'extraction théorique. Les salives surchargées ont été extraites selon la méthode mise en place, et éluées par le méthanol. Chaque niveau a été extrait 3 fois. Les aires sous courbe (ASC) de chacun de ces niveaux de surcharge dans la salive ont été comparées aux aires sous courbes des références (100% théoriques) préparées. Ce pourcentage nous a permis de calculer le coefficient d'extraction.

Surcharge nmol/L	ASC salive extrait		ASC Référence Non extrait	Coefficients d'extraction
1	59650	2	68630	85,7
1	57120	2		
1	59680	2		
Moyenne	58817	Moyenne		
5	290600	10	354400	82,04
5	283700	10		
5	298000	10		
Moyenne		Moyenne		

Interprétation : le coefficient moyen d'extraction est d'environ 83% ce qui correspond au coefficient obtenu avec la technique de dosage précédente. Ce coefficient d'extraction correspond aux spécifications souhaitées par le laboratoire.

6.14.2. Détermination de l'effet matrice

Principe : confère paragraphe 4.13.2 partie III

Mode opératoire : 1) Ici, nous avons procédé de la même façon que pour le cortisol urinaire, confère paragraphe 4.13.2.

Surcharges dans l'eau

nmol/L	ASC
0,1	5063
0,1	5336
0,1	5049

1	59650
1	57120
1	59680

5	290600
5	283700
5	298000

Surcharges dans la salive

nmol/L	ASC
0,1	3415
0,1	3681
0,1	2548

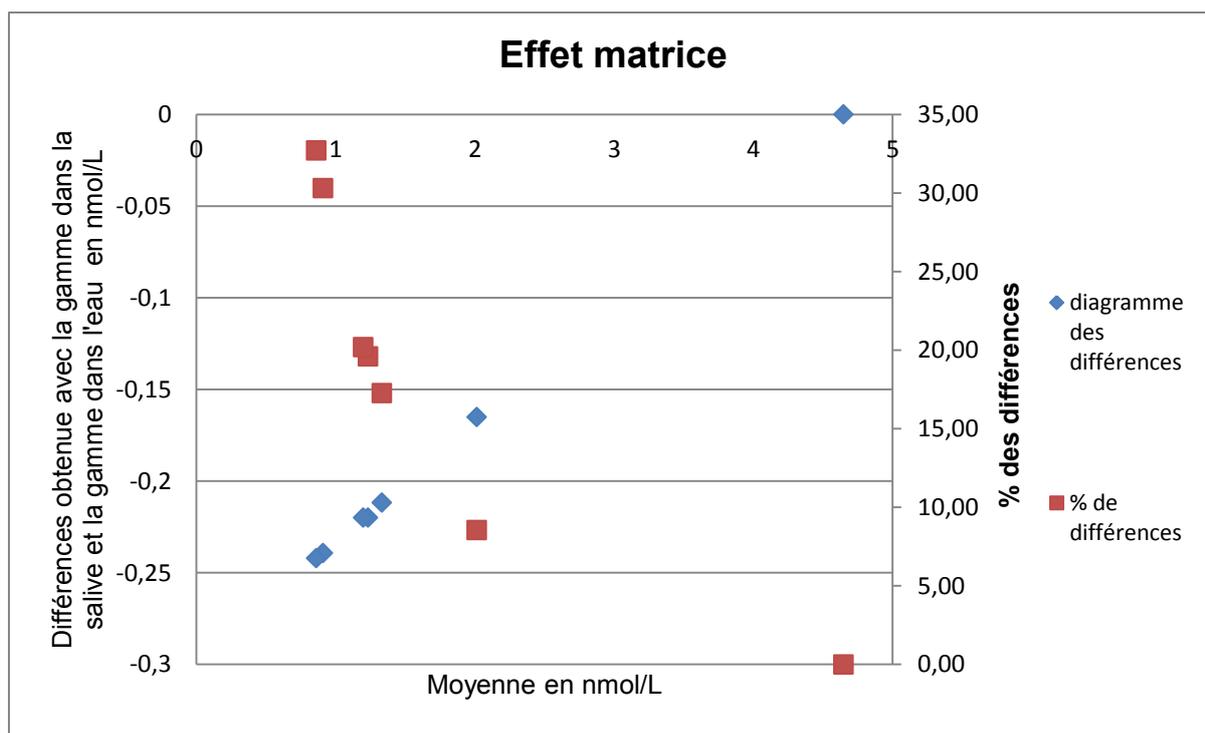
1	26960
1	25360
1	26430

5	129400
5	132700
5	130100

Interprétation : On constate, comme dans le cas de la matrice urinaire, qu'il existe un effet matrice important qui entraîne une diminution de l'ASC du cortisol dans la salive par augmentation du bruit de fond.

Nous avons ensuite, comme précédemment, comparé des résultats de dosage de 8 salives obtenus avec une gamme diluée dans l'eau et ceux obtenus avec une gamme diluée dans une matrice salivaire afin d'en évaluer l'impact sur le résultat.

gamme dans la salive valeurs en nmol/L	gamme dans l'eau valeurs en nmol/L	%delta=
0,35	0,62	77,17
1,12	1,34	19,61
1,23	1,44	17,26
0,79	1,03	30,31
0,74	0,98	32,71
1,93	2,10	8,55
4,65	4,65	0,00
1,09	1,31	20,20



Interprétations : Le premier dosage effectué a été rejeté car il se trouvait en dehors de la limite de quantification définie auparavant (paragraphe 6.9 partie III). On constate que les valeurs des dosages obtenues avec la gamme dans l'eau donnent des valeurs supérieures à celles obtenues avec la gamme dans la salive. Mais que ces différences diminuent quand la concentration en cortisol augmente. Dans ce dosage, nous nous intéressons aux valeurs hautes du cortisol salivaire pour le diagnostic des syndromes de Cushing (confère paragraphe 4.1.2.1 Partie I). Ainsi, pour des valeurs de dosage supérieure à 2 nmol/L le pourcentage de différence induit par l'effet matrice n'est plus que de 10%. Par ailleurs, en termes de valeurs, ces différences sont minimales et ont peu d'influence sur le résultat final. Cet effet a donc été jugé non significatif pour notre dosage. Ainsi, la gamme d'étalonnage de notre technique pourra être diluée dans l'eau.

6.15. Essais concernant les paramètres de la phase préanalytique et pouvant influencer la phase analytique

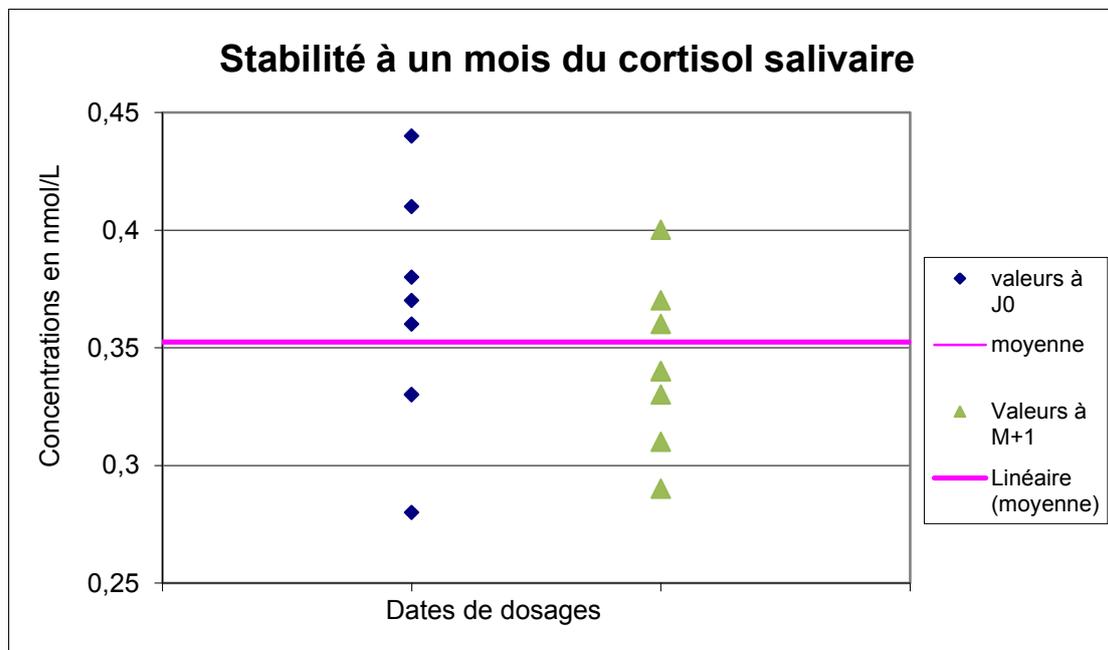
6.15.1. Essais stabilité des échantillons

Principe : La stabilité du cortisol a déjà été évaluée dans la matrice urinaire (confère paragraphe 4.14.1 partie III). Pour cette raison et du fait de l'existence de publications scientifiques^{6,21,20} relatant sa stabilité, une étude de la stabilité à minima

a été réalisée, en se plaçant dans les conditions les plus défavorables c'est-à-dire l'analyse après congélation (à -20°C) pendant trois mois. Pour obtenir un significativité statistique suffisante, le nombre d'échantillons testés a été porté à 8.

Valeurs de dosages en nmol/L

	J0	M+3
	0,41	0,31
	0,28	0,36
	0,33	0,33
	0,37	0,34
	0,38	0,29
	0,33	0,37
	0,44	0,4
moyenne	0,36	0,34



Interprétation : On constate que les valeurs à trois mois sont distribuées de part et d'autre de la moyenne, aucune dérive n'est notée, et les valeurs sont situées dans l'intervalle [0,26 ;0,46 nmol/L] correspondant à la moyenne du dosage à J0+/-2 écarts-types. L'échantillon est donc stable dans les conditions de conservation sus-citées, comme cela a été décrit dans la littérature^{6,12,20}.

6.16. Conclusions

	Conclusions de la validation de méthode
Répétabilité	Acceptable
Reproductibilité	Acceptable
Justesse	en cours
Linéarité	Linéaire jusqu'à 20 nmol/L
Limites de quantification	0.28 nmol/L
Spécificité	Bonne, cortisone bien séparée du cortisol par comparaison avec le dosage réalisé pour le cortisol urinaire sur le quattromicro
Contamination	Acceptable
Incertitudes	Calcul non réalisé
Corrélation	Acceptable
Coefficient d'extraction	83%
Effet matrice	Présent, mais non significatif, gamme diluée dans l'eau.
Stabilité avant analyse	Acceptable
Conclusion finale :	Passage en routine possible

7. Dosage des androgènes

La mise en place d'une méthode de dosage est une étape complexe. Durant nos essais, nous avons été confrontés à un problème d'encrassement et de bouchage de la colonne de chromatographie. Les ions présents dans le mix d'extraction étaient responsables d'une précipitation des protéines de notre échantillon à l'origine de cet encrassement. Pour pallier à ce problème nous avons été contraints de diminuer la concentration en ions du mix d'extraction. Cette diminution a entraîné une baisse significative de nos coefficients d'extractions. Ce paramètre impacte directement sur nos résultats (limite de quantification, répétabilité, reproductibilité, effet matrice...).

La mise en place de ce dosage n'étant pas encore terminée, il ne sera présenté ici que des résultats partiels. Ont été testés : répétabilité, reproductibilité, limite de quantification, et effet matrice.

7.1. Mode opératoire

La plaque d'extraction utilisée ici est de type TECAN, proche du principe d'extraction décrit au paragraphe 1.2 partie II. La phase solide n'est pas un filtre mais tapisse la paroi d'un puits.

Protocole d'extraction :

1. Dépôt de 100µL d'échantillon + 100µL d'un mix d'extraction* (incluant des ions LiCl, de l'acide formique et de formiate d'ammonium) + de l'EI (dilué dans l'acétonitrile) par puits → puis aspiration et rejet.
2. Lavage de la plaque → dépôt de 200µL d'un mélange (10/90) MeOH/H₂O à 4% d'acide formique par puits → puis aspiration et rejet.
3. Elution/récupération des échantillons par 100µL d'un mélange (75/25) MeOH/H₂O par puits → puis aspiration et récupération pour passage sur le 5500 Q-trap.

Préparation de la gamme d'étalonnage et des contrôles

La gamme d'étalonnage est préparée extemporanément par dilution au 1/10^{ème} dans du sérum déstéroïdé d'une gamme mère préparée à partir du standard interne et conservée au congélateur. Elle s'étend de 0,025 ng/mL à 10 ng/mL.

L'étalon interne, qui comprend des dérivés deutérés de chacun des androgènes dosés, est utilisé à une concentration finale de 5 ng/mL.

Les contrôles internes de qualité sont des contrôles lyophilisés de chez Biorad (BIO1 BIO2 BIO3) et de chez Probiocal (ID BAS, IDHAUT), reconstitués dans l'eau distillée.

* confère paragraphe 7 partie III.

7.2. Evaluation de la répétabilité

Pour évaluer la répétabilité, les 5 niveaux de contrôle utilisés en routine ont été répétés 8 fois dans la même série. Ensuite les niveaux de contrôle retenus pour l'analyse en routine de la série (ceux encadrant au mieux le domaine de dosage) ont été exploités pour chaque type d'androgènes. Les résultats obtenus (en ng/mL) sont les suivants :

	Analyte	Bas	Moyen	Haut
Effectif		8	8	8
Moyenne	Delta 4	0,28	0,75	2,05
CV		24%	4%	2%
Moyenne	Testostérone	1,15	2,43	5,72
CV		4%	3%	3%
Moyenne	17OHP	0,37	1,98	5,37
CV		20%	9%	3%
Moyenne	Composé S	0,17	0,39	
CV		17%	16%	
Moyenne	DHEA	0,29	1,80	4,35
CV		34%	10%	8%

Interprétation : Pour un coefficient de variation limite fixé à 10%, on constate que le dosage n'est pas répétable pour les niveaux de contrôle dont les cases sont surlignées en rouge. Ainsi le dosage de la testostérone est répétable sur tous les niveaux testés. Pour les autres androgènes, on observe une rupture de cette répétabilité dans les valeurs basses, ce seuil de cassure nous permet d'apprécier la limite de quantification qui sera détaillée paragraphe 7.4 partie III. Le composé S

offre une mauvaise répétabilité mais les niveaux testés ont tous des valeurs proches, d'autres niveaux devront être analysés.

En pratique pour ces dosages, les valeurs hautes sont celles qui ont un intérêt clinique (hormis pour la testostérone et notamment chez l'enfant et la femme adulte⁵), ces données ne sont donc pas « dramatiques » et pourraient être acceptées, mais dans la mesure où il s'agit d'une technique de dosage qui pourrait offrir de bien meilleures performances⁴⁵, les résultats de la répétabilité ont été jugés insuffisants. Ceux-ci devraient être améliorés si on parvient à obtenir un meilleur coefficient d'extraction.

7.3. Evaluation de la reproductibilité

Cette évaluation est en cours, les différents niveaux de contrôle étant analysés lors de chaque série de dosage. Les résultats partiels sont présentés ci-dessous, l'interprétation finale ne sera faite qu'après obtention d'au moins 7 valeurs par niveau testé.

	Analyte	Bas	Moyen	Haut
Effectif		2-3	2-3	2-3
Moyenne	Delta 4	0,24	0,86	2,10
CV		23%	21%	7%
Moyenne	Testostérone	1,31	2,50	
CV		15%	7%	
Moyenne	17OHP	0,41	2,19	5,11
CV		25%	14%	2%
Moyenne	Composé S	0,20	0,42	
CV		13%	7%	
Moyenne	DHEA	0,48	1,94	4,47
CV		29%	20%	12%

Interprétation : Le peu de valeurs obtenues pour l'instant ne nous permet pas d'interpréter statistiquement les résultats de cette reproductibilité. Cependant, il semble se dégager la même tendance que pour l'essai de répétabilité, avec un coefficient de variation limite fixé à 15%.

7.4. Limite de quantification

La limite de détection est définie de la même façon que pour les précédents analytes, comme étant la dernière valeur offrant un coefficient de variation inférieur à 20% sur une répétition de 8 valeurs. Ici elle a été interprétée sur les résultats de répétabilité obtenus paragraphe 7.2 partie III, en analysant les 5 niveaux de contrôle (BIO1, BIO2, BIO3, IDHAUT, IDBAS) et non ceux uniquement retenus en routine. Les limites suivantes ont pu être déterminées :

Analyte	Limite de quantification obtenue
Delta 4	Située entre 0,75 et 0,28 ng/mL → à affiner
Testosterone	Inférieure à 0,12 ng/mL → à affiner
17OHP	Inférieure à 0,37 ng/mL → à affiner
Composé S	Inférieure à 0,17 ng/mL → à affiner
DHEA	Située entre 1,34 et 0,29 ng/mL → à affiner

Interprétation : Les limites de quantification ont pu être approchées mais elles seront à affiner après amélioration de l'extraction utilisée (confère paragraphe 7 partie III).

7.5. Effet matrice

Concernant l'effet matrice, nous n'avons pas la problématique du milieu à étudier puisque la gamme d'étalonnage utilisée est diluée dans du sérum déstéroïdé. En revanche comme pour toute matrice sérique il est important d'étudier les variations sur les résultats qui pourraient être dues à : l'hémolyse et à la lipémie.

Pour ce faire, nous avons surchargé 4 matrices différentes (sérum patient, sérum déstéroïdé, sérum hémolysé et sérum lipémique) en molécule deutérée à deux niveaux de concentration, et nous avons analysé les ASC des 3 répétitions pour chacun de ces dosages. Les résultats sont les suivants (seules les moyennes pour

chaque niveau sont représentées et les ASC les plus hautes sont surlignées en rose foncé, et les plus basses en rose clair) :

		ASC moyennes mesurées			
	Niveau de surcharge	sérum hémolysé	sérum lipémique	sérum déstéroïdé	sérum patient
DELTA4	1 ng/mL	7995	15073	19786	9521
	5ng/mL	49953	33803	87456	42050
Testostérone	1 ng/mL	16253	22730	22893	16900
	5ng/mL	100720	95150	97523	90820
17OHP	1 ng/mL	12310	17250	17900	17070
	5ng/mL	73236	68183	74193	67050
DHEA	1 ng/mL	3154	3549	2845	3150
	5ng/mL	6611	6318	7220	6083
Composé S	1 ng/mL	4296	5813	4635	6078
	5ng/mL	26283	25226	24973	23416

Interprétation : Il existe une différence avec les valeurs observées pour la delta4androstènedione dans le sérum déstéroïdé par rapport aux autres matrices. Nous n'avons pas trouvé d'explication quant à cette importante variation. Il ne semble pas que cette variation soit liée à un effet matrice car les autres paramètres ne sont pas touchés de façon significative. Il ne se dégage pas de réelle tendance dans ces résultats, les ASC dans un milieu ne sont pas systématiquement supérieures ou inférieures à celles obtenues dans les autres milieux. Mais devant ces résultats nous ne pouvons pas écarter l'éventualité d'un effet matrice. Cette validation devra être reprise.

7.6. Comparaison de méthode

Cette détermination est en cours, mais certaines données de la littérature^{46,45} concluent à une bonne corrélation entre RIA et LC-MS/MS pour les androgènes sériques. Une première tentative a été effectuée sur la testostérone. Les résultats sont satisfaisants, on observe une bonne corrélation ($r^2= 0.9$) et un biais faible. L'équation de la courbe est la suivante $y=0.91x + 0.86$, « y » étant le résultat du dosage en spectrométrie de masse et « x » le résultat obtenu en RIA.

7.7. Coefficient d'extraction

Cette détermination est en cours. Les résultats préliminaires montrent pour l'instant un coefficient d'extraction bas pour l'ensemble des androgènes (<50%). Ce coefficient est insatisfaisant (pour les raisons expliquées paragraphe 7 partie III) et devra être amélioré.

7.8. Spécificité

La spécificité de ces dosages sur notre analyseur est bonne²⁹ mais il existe le même phénomène entre la delta4androstènedione et la DHEA³⁵ que celui rencontré entre la cortisone et le cortisol (confère paragraphe 4.5 partie III). En effet 2% de la delta4androstènedione présente le même poids moléculaire que la DHEA (PM respectifs 286 et 288 g/mol). Le 5500Q-trap disposant d'un système UPLC permet de s'affranchir de cette interférence qui peut être retrouvée sur d'autres systèmes analytiques.

7.9. Exactitude

Cette détermination est en cours puisqu'un échange de contrôles entre les laboratoires des CHU de Strasbourg, Rennes, Bordeaux et Tours a été mis en place. Les premiers résultats obtenus pour le composé S sont les suivants :

	11 Desoxycortisol nmol/l	
Villes	Pool faible	Pool fort
Labo 1	5,5	33,8
Bordeaux ext1	5,5	23,4
Bordeaux ext2	5,2	26,8
Labo 3	3,3	16,5
Labo 4	4,4	25,1
Labo 5	4,5	25,9
n	6	6
moyenne	4,7	25,3
écartype	0,86	5,58
CV%	18,1	22,1
moy-2DS	3,0	14,1
moy+2DS	6,5	36,4

Conclusion : les valeurs obtenues par notre laboratoire sont en accords avec celles mesurées par les autres laboratoires. Cependant d'autres tests seront nécessaires pour conclure à l'exactitude de notre méthode, d'autant que les autres paramètres ne sont pas satisfaisants et que le mode opératoire doit être revu.

7.10. Stabilité des échantillons

La stabilité des échantillons n'a pas été démontrée, puisque les fournisseurs industriels l'ont déjà étudiée pour leurs dosages. Ainsi les recommandations fournies par Biomnis et les fournisseurs sont les suivantes : conservation du sérum décanté (centrifugé) à 4°C jusqu'à analyse, et conservation à -20°C, 6mois à 1an.

7.11. Conclusions

Globalement le mode opératoire de l'extraction doit être repris afin d'obtenir un meilleur coefficient d'extraction, ce qui devrait permettre d'améliorer la qualité du dosage et sa robustesse.

Conclusions, perspectives, avenir :

Le premier intérêt de ce travail était d'éliminer l'utilisation de la radioactivité au laboratoire tout en gardant une qualité de dosage équivalente. En effet la spectrométrie de masse couplée à la chromatographie liquide offre une bonne spécificité et aujourd'hui une bonne sensibilité analytique. Cette amélioration récente de la sensibilité concerne pour l'instant le dosage des androgènes et du cortisol, mais on peut penser qu'elle s'étendra un jour au dosage des autres stéroïdes et des catécholamines. Le second intérêt était de diminuer l'utilisation de solvants et le nombre d'interventions manuelles potentiellement source d'erreurs. L'automatisation de la phase de prétraitement des échantillons a permis de diminuer la lourdeur des manipulations, grâce à l'utilisation de microplaques de purification ou d'extraction manipulées sur des automates spécifiques comme ceux optimisés par le groupe TECAN. A l'heure actuelle peu de laboratoires d'analyses effectuent les dosages du cortisol salivaire et des androgènes en spectrométrie de masse, il existe donc peu de références sur lesquelles nous avons pu nous baser durant la mise en place de ce dosage. Nous avons donc été confrontés à de nombreuses difficultés techniques, notamment la viscosité des salives qui entraînait des variations importantes entre les dosages et pour laquelle il a fallu rajouter du « digesteur », la précipitation des protéines sériques liée à la concentration en ions du mix utilisé pour l'extraction et pour laquelle il a donc fallu diminuer la concentration de ces derniers, diminuant le rendement d'extraction de la technique. Ces deux problèmes entraînaient l'encrassement de la colonne de chromatographie, et ont retardé l'application de ces techniques.

Le dosage des androgènes est encore en cours d'amélioration. On comprend ici, avec cet exemple, l'intérêt de procéder à une validation de méthode attentive du dosage avant de pouvoir valider un mode opératoire et de l'utiliser en pratique courante. La validation des techniques de dosages doit donc être envisagée comme une étape nécessaire pour vérifier les performances de sa méthode et s'assurer du bon rendu des résultats, plutôt que comme une obligation légale de la Norme ISO15189.

Le dosage en LC-MS/MS est donc une méthode performante mais dont la mise en place est délicate et nécessite du personnel expérimenté. De plus le dosage d'un

seul point (échantillon, point de gamme ou contrôle) prend plusieurs minutes, ainsi la série de tests à effectuer, comprenant en moyenne une trentaine de dosages, peut prendre plusieurs heures. La validation de tels dosages est donc plus lourde qu'une vérification sur une chaîne de chimie classique. En revanche, une fois mise en place et validée, cette méthode présente de nombreux avantages comparée à la RIA.

En conclusion, je dirais qu'il s'agit d'un outil puissant, en plein progrès, et qui au même titre que les chaînes de chimie ou que la PCR il y a quelques années se trouve au cœur de l'innovation et finira très probablement par se démocratiser. Ainsi la technique LC-MS/MS tend aujourd'hui à s'imposer comme le Gold Standard dans le dosage des stéroïdes (androgènes et glucocorticoïdes pour l'instant), et finira peut-être par supplanter les techniques manuelles de dosage des stéroïdes en RIA.

Table des illustrations

- Figure 1** : Voie de synthèse des stéroïdes de la corticosurrénale. Fulla, Y., Guignat, L., Dugué, M.-A., Assié, G. & Bertagna, X. Exploration biologique de la fonction corticotrope. *Rev. Francoph. Lab.* **2009**, 35–48 (2009). 19
- Figure 2** : Voies de synthèse des hormones stéroïdes au niveau ovarien. N.Chabbert-Buffet, M.Dechaux & A.Gompel. *Exploration de la fonction de reproduction. Versant féminin.* (2004).. 19
- Figure 3** : Mécanisme d'action des récepteurs nucléaires. Exemple de la testostérone. J.Tostain, D.Rossi & P.M.Martin. Physiologie des androgènes chez l'homme adulte. *Progès en urologie.* 639–660 (2004).. 21
- Figure 4** : Illustration du syndrome de Cushing. Ontjes, D. A. in *Médecine interne de Netter* 354–361 (Elsevier, 2011). Disponible sur : <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B978229470951700044X>> 24
- Figure 5** : Illustration d'un défaut de cortisol. Ontjes, D. A. in *Médecine interne de Netter* 354–361 (Elsevier, 2011). Disponible sur : <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B978229470951700044X>> 26
- Figure 6** : spectomètre de masse et système chromatographique du Quattro micro de WATERS.. 34
- Figure 7** : Technique de d'immunodosage compétitive. Sapin, R. Interférences dans les immunodosages : mécanismes et conséquences en endocrinologie. *Ann. Endocrinol.* **69**, 415–425 (2008). 35
- Figure 8** : Principe de l'extraction SPE. Humbert, L. Extraction en phase solide (SPE) : théorie et applications. *Ann. Toxicol. Anal.* **22**, 61–68 (2010)..... 36
- Figure 9** : Plaque SPE 96 puits et système d'aspiration de chez Waters. 37
- Figure 10** : Composants d'un appareil de chromatographie liquide. http://www4.ac-nancy-metz.fr/physique/CHIM/Jumber/HPLC/Chromatographie_en_phase_liquide_fichiers/hplc_fichiers/Image1.gif..... 38
- Figure 11** : Principe de l'électrospray. Power point de formation. AB SCIEX QTRAP® 5500 et 4500 LC/MS/MS. Formation Initiale et Fondamentaux.. 39
- Figure 12** : Principe de l'APCI. Power point de formation. AB SCIEX QTRAP® 5500 et 4500 LC/MS/MS. Formation Initiale et Fondamentaux.. 40

Figure 13 : Principe de du filtre quadripolaire. CNRS. Centre de biophysique moléculaire- UPR4301. Quadripole. Principe de fonctionnement. at <<http://cbm.cnrs-orleans.fr/spip.php?rubrique94>..... 41

Figure 14 : Schéma du spectromètre de masse Quattro micro de chez WATERS. Image fournie par Waters.41

Figure 15 : 5500 Qtrap de AB-Sciex. Power point de formation. AB SCIEX QTRAP® 5500 et 4500 LC/MS/MS. Formation Initiale et Fondamentaux.44

Références bibliographiques

1. Fulla, Y., Guignat, L., Dugué, M.-A., Assié, G. & Bertagna, X. Exploration biologique de la fonction corticotrope. *Rev. Francoph. Lab.* **2009**, 35–48 (2009).
2. N.Chabbert-Buffet, M.Dechaux & A.Gompel. *Exploration de la fonction de reproduction. Versant féminin.* (2004).
3. M.Albert, J.Auer & J.Auger. *Exploration de la fonction de reproduction. Versant masculin.* (2009).
4. Gatti, R. *et al.* Cortisol assays and diagnostic laboratory procedures in human biological fluids. *Clin. Biochem.* **42**, 1205–1217 (2009).
5. Guéchet, J. & Fiet, J. Dosage de la testostérone plasmatique: difficultés méthodologiques et intérêt physiopathologique. *Rev. Francoph. Lab.* **2009**, 51–56 (2009).
6. Szymanowicz, A. Caractéristiques immunoanalytiques du cortisol. *Immuno-Anal. Biol. Spéc.* **26**, 147–157 (2011).
7. J.Tostain, D.Rossi & P.M.Martin. Physiologie des androgènes chez l'homme adulte. *Progès en urologie.* 639–660 (2004).
8. Ontjes, D. A. in *Médecine interne de Netter* 354–361 (Elsevier, 2011). at <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B978229470951700044X>>
9. Reimondo, G. *et al.* Laboratory differentiation of Cushing's syndrome. *Clin. Chim. Acta* **388**, 5–14 (2008).
10. M. Gröschl. Données actuelles sur l'analyse hormonale salivaire. **67**, 493–504 (2009).
11. Perogamvros, I. *et al.* Simultaneous measurement of cortisol and cortisone in human saliva using liquid chromatography–tandem mass spectrometry:

- Application in basal and stimulated conditions. *J. Chromatogr. B* **877**, 3771–3775 (2009).
12. Baid, S. K., Sinaii, N., Wade, M., Rubino, D. & Nieman, L. K. Radioimmunoassay and Tandem Mass Spectrometry Measurement of Bedtime Salivary Cortisol Levels: A Comparison of Assays to Establish Hypercortisolism. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **92**, 3102–3107 (2007).
 13. Drouin, A. & Nahoul, K. Actualité des investigations biologiques pour le diagnostic du syndrome de Cushing. *Immuno-Anal. Biol. Spéc.* **20**, 86–91 (2005).
 14. Bounaud, M. P. À propos de l'exploration fonctionnelle des corticosurrénales. *Immuno-Anal. Biol. Spéc.* **18**, 25–27 (2003).
 15. J Young & CEEDMM. *Endocrinologie diabétologie et maladies métaboliques*. (2007).
 16. Peigné, M., Villers-Capelle, A., Robin, G. & Dewailly, D. Hyperandrogénie féminine. *Presse Médicale* **42**, 1487–1499 (2013).
 17. Fiet, J., Giton, F. & Guéchet, J. Application de la spectrométrie de masse en exploration hormonale. *Rev. Francoph. Lab.* **2011**, 73–86 (2011).
 18. Brau, M., Banse, V., Dupret, P., Ledant, T. & Boudry, P. Dosage du cortisol libre urinaire par chromatographie liquide. *Immuno-Anal. Biol. Spéc.* **20**, 186–190 (2005).
 19. Doggui, R. Dosage du cortisol urinaire: considérations analytiques et pré-analytiques. *Rev. Francoph. Lab.* **2013**, 57–61 (2013).
 20. De Palo, E. F., Antonelli, G., Benetazzo, A., Prearo, M. & Gatti, R. Human saliva cortisone and cortisol simultaneous analysis using reverse phase HPLC technique. *Clin. Chim. Acta* **405**, 60–65 (2009).

21. Gröschl, M., Wagner, R., Rauh, M. & Dörr, H. G. Stability of salivary steroids: the influences of storage, food and dental care. *Steroids* **66**, 737–741 (2001).
22. Schlienger, J. L., Perrin, A. E. & Goichot, B. DHEA: célèbre et méconnue. *Rev. Médecine Interne* **23**, 436–446 (2002).
23. Richard Cohen. Immunodosages avec marqueurs. *Elsevier* (2005). at <http://www.em-consulte.com/article/61466/immunodosages-avec-marqueurs>
24. Sapin, R. Interférences dans les immunodosages: mécanismes et conséquences en endocrinologie. *Ann. Endocrinol.* **69**, 415–425 (2008).
25. Humbert, L. Extraction en phase solide (SPE): théorie et applications. *Ann. Toxicol. Anal.* **22**, 61–68 (2010).
26. Menet, M.-C. Principes de la spectrométrie de masse. *Rev. Francoph. Lab.* **2011**, 41–53 (2011).
27. ATEM Chimie. Université de Lille 1. Electropray- Spectromètre de masse. at <http://atechimie.univ-lille1.fr/Chromatographie-Phase-Liquide/Detecteurs/Electrospray-Spectrometre+de+masse/>
28. CNRS. Centre de biophysique moléculaire- UPR4301. Quadripole. Principe de fonctionnement. at <http://cbm.cnrs-orleans.fr/spip.php?rubrique94>
29. Van den Ouweland, J. M. W. & Kema, I. P. The role of liquid chromatography–tandem mass spectrometry in the clinical laboratory. *J. Chromatogr. B* **883-884**, 18–32 (2012).
30. ISO/IEC 17043. Exigences générales concernant la compétence des laboratoires d'étalonnage et d'essais.
31. AFNOR. *NF EN ISO 15189. Laboratoires de biologie médicale - Exigences concernant la qualité et la compétence - Laboratoires d'analyses de biologie médicale.* (2012).

32. LOI n° 2009-879 du 21 juillet 2009 portant réforme de l'hôpital et relative aux patients, à la santé et aux territoires. 2009-879 (2009).
33. AFNOR. NF EN ISO/CEI 17025:2005 : Norme laboratoire étalonnage - Afnor Editions. (2005). at <<http://www.boutique.afnor.org/norme/nf-en-iso-cei-17025/exigences-generales-concernant-la-competence-des-laboratoires-d-etalonnages-et-d-essais/article/694883/fa120232>>
34. COFRAC. SH GTA 04. Guide technique d'accréditation de vérification (portée A) / validation (portée B) des méthodes de biologie médicale. (2011).
35. COFRAC. SH REF 02. RECUEIL DES EXIGENCES SPECIFIQUES POUR L'ACCREDITATION DES LABORATOIRES DE BIOLOGIE MEDICALE SELON LA NORME NF EN ISO 15189 : 2012. (2013). at <http://www.cofrac.fr/fr/documentation/index.php?fol_id=60>
36. COFRAC. SH GTA 14. Guide technique d'accréditation pour l'évaluation des incertitudes de mesure en biologie médicale. (2011). at <http://www.cofrac.fr/fr/documentation/index.php?fol_id=63>
37. C.Ricos. Biological variation database, and quality specifications for imprecision, bias and total error (desirable and minimum). The 2012 update. *Biologic Variation Database, the 2012 update - Westgard QC* (2012). at <<http://www.westgard.com/biodatabase-2012-update.htm>>
38. A vassault, D. Grafnever & J. de Graeve. Analyses de biologie médicale : spécifications et normes d'acceptabilité à l'usage de la validation de techniques. 685–695 (1999).
39. Scientific Instrument services. at <<http://www.sisweb.com/>>
40. Turpeinen, U. & Hämäläinen, E. Determination of cortisol in serum, saliva and urine. *Best Pract. Res. Clin. Endocrinol. Metab.* **27**, 795–801 (2013).

41. Reference interval. *MedCalc* at
<<http://www.medcalc.org/manual/referenceinterval.php>>
42. Gian Cesare Guidi & Gian Lua Salviagno. Reference intervals as a tool for total quality management.
43. Solberg, H. E. The IFCC recommendation on estimation of reference intervals. The RefVal Program. *Clin. Chem. Lab. Med.* **42**, (2004).
44. Henny, J. Determining and verifying reference intervals in clinical laboratories. *Ann. Biol. Clin. (Paris)* 229–237 (20113-4). doi:10.1684/abc.2011.0537
45. Janse, F. *et al.* Assessment of androgen concentration in women: liquid chromatography-tandem mass spectrometry and extraction RIA show comparable results. *Eur. J. Endocrinol.* **165**, 925–933 (2011).
46. Dorgan, J. F. *et al.* Measurement of steroid sex hormones in serum: a comparison of radioimmunoassay and mass spectrometry. *Steroids* **67**, 151–158 (2002).

SERMENT DE GALIEN

Je jure en présence de mes Maîtres de la Faculté et de mes condisciples :

- d'honorer ceux qui m'ont instruit dans les préceptes de mon art et de leur témoigner ma reconnaissance en restant fidèle à leur enseignement ;
- d'exercer, dans l'intérêt de la santé publique, ma profession avec conscience et de respecter non seulement la législation en vigueur, mais aussi les règles de l'honneur, de la probité et du désintéressement ;
- de ne jamais oublier ma responsabilité, mes devoirs envers le malade et sa dignité humaine, de respecter le secret professionnel.

En aucun cas, je ne consentirai à utiliser mes connaissances et mon état pour corrompre les mœurs et favoriser les actes criminels.

Que les hommes m'accordent leur estime si je suis fidèle à mes promesses.

Que je sois couvert d'opprobre et méprisé de mes confrères, si j'y manque.



Résumé

Le dosage des hormones stéroïdiennes occupe une place importante dans le diagnostic des pathologies endocriniennes touchant l'axe hypothalamus-hypophyse-glandes surrénales. Par exemple dans le diagnostic des syndromes de Cushing, des hyper-androgénies, et de l'hypogonadisme. Ces dosages sont difficiles du fait des structures très proches de ces molécules. Les dosages RIA sont largement utilisés et offrent un couple sensibilité-spécificité satisfaisant, cependant ces techniques souffrent de leur lourdeur technique (gestion de la radioactivité, déchets, protection et suivi du personnel). Les techniques de dosage HPLC-MS/MS constituent aujourd'hui une alternative intéressante. Dans ce travail il a été question de mettre en place et de valider le dosage du cortisol libre urinaire, du cortisol salivaire, et des androgènes selon cette méthode sur deux appareils (le 5500 Qtrap de ABSciex et le Quattromicro de la société Waters). Une étape d'extraction en milieu solide (SPE) a aussi été développée afin de diminuer l'utilisation des solvants au laboratoire et d'automatiser les étapes de prétraitement nécessaires au dosage sur un système Tecan. Les résultats et conclusions de ces validations sont exposés dans ce mémoire.

Mots clés : validation de méthode, portée B, Radio-immuno-analyse (RIA), spectrométrie de masse, electrospray ionisation (ESI), atmospheric pressure chemical ionisation (APCI), chromatographie liquide haute performance (HPLC), chromatographie liquide ultra haute performance (UPLC), solid phase extraction (SPE), HPLC-MS/MS, hormonologie, cortisol libre urinaire, cortisol salivaire, androgènes, glucocorticoïdes, syndrome de Cushing, hyper-androgénie.

