



**HAL**  
open science

## Mesure de la concentration plasmatique en 4-androstènedione par chromatographie en phase liquide à très haute performance couplée à la spectrométrie de masse en mode tandem

Lilia Bestaoui, Théodora Chiriac, Jacqueline Ji, Vincent Gibert, Fidéline Bonnet-Serrano, Emmanuel Curis, Marie-Claude Menet, Ioannis Nicolis

### ► To cite this version:

Lilia Bestaoui, Théodora Chiriac, Jacqueline Ji, Vincent Gibert, Fidéline Bonnet-Serrano, et al.. Mesure de la concentration plasmatique en 4-androstènedione par chromatographie en phase liquide à très haute performance couplée à la spectrométrie de masse en mode tandem. *Acta discipulorum academiae medicamentariae artis*, 2021, UMR 9 Cas pratiques d'analyses de données expérimentales, 4, pp.19-26. hal-04314191

**HAL Id: hal-04314191**

**<https://u-paris.hal.science/hal-04314191>**

Submitted on 29 Nov 2023

**HAL** is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

# Mesure de la concentration plasmatique en 4-androstènedione par chromatographie en phase liquide à très haute performance couplée à la spectrométrie de masse en mode tandem

Lilia BESTAOU, Théodora CHIRIAC, Jacqueline JI, Vincent GIBERT  
Fidéline BONNET, Emmanuel CURIS, Marie-Claude MENET, Ioannis NICOLIS

## Résumé

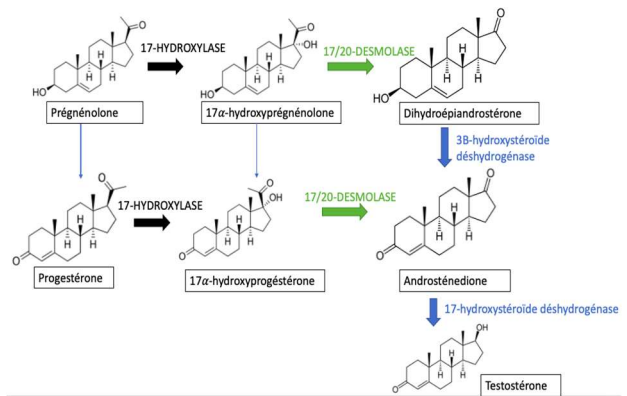
L'androstènedione ou 4-androstènedione est un stéroïde androgène dont la concentration augmente lors de certaines pathologies, innées ou acquises. En s'appuyant sur le référentiel des examens Biomnis, le dosage de l'androstènedione présente un intérêt clinique. Le but de cette étude est de vérifier la répétabilité et la fidélité intermédiaire de la méthode de dosage de l'androstènedione par CLUHP-SM-SM, en suivant les recommandations du comité français d'accréditation, puis de la comparer avec une méthode de référence, la radioimmunoanalyse. Le coefficient de variation est de 3,6 % de la moyenne pour le *pool* faible, 2,4 % pour le *pool* moyen et 4,3 % pour le *pool* fort tandis que celui de la fidélité intermédiaire est de 10,1 % de la moyenne pour le *pool* faible, 6,9 % pour le *pool* moyen, 7,8 % pour le *pool* fort. L'indépendance de liaison entre la mesure et le jour pour les *pools* moyen et faible reflète la reproductibilité intra-laboratoire de la méthode de dosage par CLUHP-SM-SM. Le coefficient de concordance de Lin permet d'apprécier la concordance entre deux méthodes. Il vaut ici 0,820. Ce résultat a été comparé à la valeur attendue lorsque les deux méthodes étaient concordantes, soit 0,999 : nos deux méthodes ne sont pas concordantes. Le graphique de Bland-Altman suggère qu'apparaît une discordance au-delà de 5 nM. Cette différence est expliquée par un manque de spécificité de la radioimmunoanalyse.

*Mots-clés* : androstènedione, radioimmunoanalyse, CLUHP-SM-SM, validation de méthode

## Introduction

L'androstènedione (ou 4-androstènedione) fait partie des hormones synthétisées dans les glandes surrénales, au niveau de la zone corticale [1]. Cette hormone est le principal androgène des surrénales, ce qui lui confère un intérêt clinique dans certaines pathologies. Elle est également synthétisée par les gonades (ovaires et testicules) ainsi que par les tissus périphériques, dans lesquels elle joue le rôle de précurseur de la testostérone [2]. L'androstènedione peut également être aromatisée en œstrone au niveau des ovaires, dans le foie et dans les tissus adipeux. Comme les autres androgènes, elle est synthétisée à partir de la molécule du cholestérol, qui est transporté par la protéine StAR (*Steroidogenesis Acute Regulatory*) dans la mitochondrie où il est converti en prégnénolone. La prégnénolone peut ensuite emprunter deux voies (figure 1 [3]) : la voie  $\Delta 4$  conduisant à la progestérone et la voie  $\Delta 5$  conduisant à la  $17\alpha$ -hydroxyprégnénolone. Ces deux voies mènent à la synthèse de l'androstènedione [1].

Les valeurs de référence des concentrations en androstènedione (annexe) sont comparables chez l'homme (1,4 à 5,2 nM) et la femme en activité



**Figure 1 : Principe de la biosynthèse de l'androstènedione dans la zone corticale [3]**

ovarienne (1 à 7 nM). Le dosage de cette hormone se fait principalement chez la femme et ne présente un intérêt chez l'homme qu'en cas de pathologie surrénalienne. Les variations pathologiques de l'androstènedione, correspondant à une augmentation ou à une diminution de sa concentration par rapport aux valeurs normales établies, dépendant de l'âge et du sexe,

	Niveau élevé d'androstènedione	Niveau bas d'androstènedione
<i>Chez la femme</i>	Hyperandrogénie clinique (hirsutisme) Syndrome des ovaires polykystiques Tumeurs ovariennes androgéno-sécrétantes	Insuffisance ovarienne
<i>Dans les deux sexes</i>	Hyperplasie congénitale des surrénales (déficit en 21-hydroxylase) Syndrome de Cushing ACTH-dépendant Tumeurs surrénaliennes malignes (corticosurrénalomes) Causes médicamenteuses (clomifène, cyprotérone acétate, levonorgestrel metyrapone)	Insuffisance surrénalienne (périphérique) ou corticotrope (centrale, secondaire à une corticothérapie prolongée) Déficit en $17\alpha$ -hydroxylase (rare) Anémie (notamment drépanocytose)
<i>Chez l'enfant</i>	Puberté prématuurée	

**Tableau 1 : Causes possibles d'une perturbation de la concentration en androstènedione [4]**

*Acta discipulorum pharmaceuticæ medicamentaria artis* peuvent être secondaires à différentes étiologies (tableau 1).

Le dosage de l'androstènedione est particulièrement indiqué au cours du bilan étiologique et du suivi d'une hyperandrogénie clinique (hirsutisme, alopecie, acné...) [4] chez la femme, en complément des dosages de la testostérone totale et de la SHBG (*Sex Hormon Binding Globulin*). Il est également indiqué dans le diagnostic et le suivi de l'hyperplasie congénitale des surrénales par déficit enzymatique (le plus fréquent étant le déficit en 21-hydroxylase). Ce déficit peut être complet — il est alors diagnostiqué précocement à quelques jours de vie — ou partiel, diagnostiqué beaucoup plus tardivement : à l'adolescence voire à l'âge adulte. Dans ce contexte, un profil stéroïdien plus complet inclut les dosages de 17-hydroxyprogestérone, du cortisol et de l'aldostérone [5][6].

La radioimmunoanalyse a été couramment utilisée pour doser l'androstènedione, précédée ou non d'une étape de purification [7]. Dans les tubes qui ont été préalablement imprégnés d'anticorps anti-androstènedione, l'androstènedione présente dans l'échantillon du patient se trouve en compétition par rapport aux sites de fixation des anticorps avec l'androstènedione radiomarquée du traceur (généralement à l'iode 125). Le signal mesuré correspondant à l'androstènedione radiomarquée liée aux anticorps fixés au fond des tubes est donc une fonction décroissante de la concentration d'androstènedione présente dans le sérum du patient. Bien que sensible, cette méthode présente un manque de spécificité [8]. En effet, les anticorps anti-androstènedione, n'ayant pas une spécificité absolue, sont à l'origine de réactions croisées avec des molécules ayant une structure similaire, comme la testostérone ou la dihydroépiandrostèrone (DHEA). Ce manque de spécificité a conduit au développement récent de dosages de stéroïdes et plus particulièrement au dosage de l'androstènedione par CLUHP-SM-SM qui présente une meilleure spécificité et est désormais la méthode de référence. Le laboratoire d'hormonologie de l'hôpital Cochin a donc voulu mettre en place une méthode de dosage de l'androstènedione par CLUHP-SM-SM pour remplacer le dosage préexistant en radioimmunoanalyse. Ce changement de méthode implique une validation maîtrisée. D'après le guide de validation de méthode bioanalytique de l'*European Medicines Agency* (EMA) [9] et le *Comité français d'accréditation* (COFRAC) [10], la validation d'une méthode dépend en effet de nombreux paramètres dont principalement la sélectivité, la spécificité, la sensibilité, la justesse et la précision, le recouvrement et la répétabilité.

L'objectif de cette étude est de vérifier la validation de la méthode de dosage de l'androstènedione par CLUHP-SM-SM en explorant la répétabilité et la fidélité intermédiaire dans un premier temps, puis, dans un second temps, d'évaluer la concordance entre la méthode initiale de dosage par radioimmunoanalyse et la méthode par CLUHP-SM-SM.

## Matériel et méthodes

Toutes les analyses statistiques ont été réalisées grâce au logiciel R version 4.0.3.

### Radioimmunoanalyse

Le dosage de l'androstènedione par radioimmunoanalyse a été réalisé avec le kit *Active® Androstenedione RIA* (Ref. DSL3800, Beckman coulter, CA). Le kit contient 100 tubes revêtus d'anticorps anti-androstènedione, 6 calibrateurs de concentration comprise entre 0 et 34,92 nM, un traceur d'androstènedione marqué à l'iode 125 dans un tampon à base de protéines avec de l'azide de sodium (< 0,1 %) de 55 mL et 2 flacons contrôle (1 et 2) contenant de l'androstènedione dans du sérum humain avec de l'azide de sodium à reconstituer avec de l'eau déionisée. Les calibrateurs ont été validés sur un standard interne de référence.

Après reconstitution des calibrateurs et des échantillons de contrôle 1 et 2, 50 µL de calibrants contrôles et échantillons-patients ont été répartis individuellement dans un tube revêtu d'anticorps anti-androstènedione. 500 µL de traceur ont été ajoutés dans chaque tube. Après le mélange de chaque tube, l'ensemble a été placé au bain marie à 37°C pendant 1 heure. Les tubes sont ensuite passés dans le compteur de radioactivité après aspiration du liquide pour éliminer les résidus. Ainsi, les complexes formés par l'androstènedione radiomarquée et les anticorps fixés sur les tubes ont été détectés et le signal mesuré correspondant a été exprimé quantitativement en coup par minute (cpm) grâce au compteur gamma calibré pour l'iode 125.

### Extraction des stéroïdes préalable au dosage en CLUHP-SM-SM

Une extraction liquide-liquide à l'éther diéthylique (Merck, France) a été réalisée : 100 µL de sérum de patient, de calibrateur ou d'échantillon contrôle, dans lesquels 20 µL d'étalon interne à 10 ng/mL (issu d'une solution d'androstène-3,17-dione-2,3,4-<sup>13</sup>C<sub>3</sub>, en solution dans l'acétonitrile à 100 µg/mL, Merck et dilué dans un mélange équivolume d'eau et de méthanol) et 1,5 mL d'éther diéthylique (Merck) ont été ajoutés, ont été vortexés 3 fois 1 minute. Après un temps de repos de 10 minutes, les échantillons ont ensuite été placés à -80°C pendant 8 minutes. La phase étherée encore liquide a ensuite été transvasée dans un tube secondaire et évaporée à sec à 37 °C sous flux d'azote. Le résidu sec obtenu a ensuite été repris dans 100 µL d'un mélange de méthanol/eau (55/45 ; V/V ; méthanol : Fischer Scientific, Illkirch, France ; eau pour HPLC, Merck).

### Chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse en tandem

Les calibrateurs proposés par Chromsystems (6 PLUS1 Multilevel Serum Calibrator Set MassChrom Steroids Panel 1&2) ont été utilisés et ont été repris

extemporanément par de l'eau distillée, ainsi que les contrôles qualité fournis par Probioqual.

La séparation chromatographique des composés a été obtenue en utilisant une colonne emplie de phase stationnaire à base de silice hydrophobe (Acquity HSS T3 1,8  $\mu\text{m}$ , 2,1 $\times$ 100 mm, Waters, France) et une phase mobile constituée d'un mélange de méthanol et d'eau auquel ont été ajoutés 0,1 % (V/V) d'acétate d'ammonium (Merck) 20 mM et 0,1 % (V/V) d'acide formique (Merck). L'ensemble du passage se déroulait à un débit de 0,513 mL/min, à une température de 40 °C sur 11 minutes. La détection a été réalisée par un spectromètre de masse de type triple quadripôle (Altis® de Thermo Scientific) en mode MRM (*Multiple Reactions Monitoring*) en utilisant l'électrospray en mode positif comme source d'ionisation [11]. Les paramètres de l'interface de l'électrospray sont optimisés à 4 kV pour le voltage du capillaire et 120 °C pour sa température, 350 °C pour la température de désolvatation, avec un débit de gaz à 900 L/h. Les transitions utilisées pour l'androstènedione étaient 287 $\rightarrow$ 97 et 287 $\rightarrow$ 109 ; les transitions pour l'étalon interne correspondant marqué au  $^{13}\text{C}$  étaient 290 $\rightarrow$ 100 et 290 $\rightarrow$ 112. Le recueil et l'intégration des données ont été effectués grâce au logiciel MassLync (version 4.1, SCN 805, Waters, Manchester, UK) puis l'analyse des pics et leur quantification ont été effectuées à l'aide de l'application QuantLynx (version 4.1, SCN 803, Waters).

#### Validation de la méthode

La performance de la méthode CLUHP-SM-SM a été caractérisée en accord avec les recommandations de Peitzsch et coll. [12], de Shah et coll. [13], de l'EMA (*Guideline on bioanalytical method validation*) [9] et selon les paramètres définis par le COFRAC pour la validation des méthodes en biologie médicale (*Guide technique d'accréditation de vérification/ validation des méthodes en biologie médicale*) [10] à partir de la norme ISO 15189 de 2012. La linéarité a été évaluée en utilisant 7 points de calibration (calibrateurs lyophilisés fournis par Chromsystems [Gräfelfing, Allemagne] et dissouts dans l'eau) aux concentrations de 0,209 nM et 34,92 nM. L'analyse des pics a été effectuée à l'aide d'une régression linéaire. Pour chacune des mesures de concentration, pour la gamme P<sub>1</sub> puis P<sub>2</sub>-P<sub>3</sub>,  $C_{\text{th},i} = \frac{1}{a} \left( \frac{\text{Aire}_i}{\text{Aire}_{\text{EI}}} - b \right)$  avec  $C_{\text{th},i}$  la concentration théorique de l'échantillon  $i$ , Aire <sub>$i$</sub>  l'aire sous la courbe de la mesure de cet échantillon  $i$ , Aire<sub>EI</sub> l'aire sous la courbe de l'étalon interne et  $a$  et  $b$ , respectivement, la pente et l'ordonnée à l'origine déterminées à partir de la gamme étalon.

La précision ou fidélité, qui est caractérisée par la variance, l'écart type et le coefficient de variation, mesure les erreurs aléatoires.

#### Répétabilité

La répétabilité est définie par la précision de la méthode lorsque la variabilité est minimale ; les essais sont donc effectués dans les mêmes conditions opératoires et dans un court intervalle de temps (même laboratoire, même opérateur, même équipement). Dans

Validation du dosage de l'androstènedione cette étude, trois *pools* de sérums de patients, de concentration différente, ont été utilisés : un *pool* faible (P1), un *pool* moyen (P2) et un *pool* fort (P3). L'analyse de la répétabilité a été effectuée sur 27 mesures pour le *pool* faible et sur 29 mesures pour les *pools* moyen et fort. La précision de la méthode a été estimée par le coefficient de variation (% CV) pour chaque *pool*. Les gammes d'étalonnage utilisées pour ces *pools* ont servi à l'étude de linéarité.

#### Fidélité intermédiaire

Selon la norme ISO 15189 de 2012, les mesures pour évaluer la précision inter-jours doivent être effectuées à des jours différents avec des réactifs différents, des bouteilles de contrôle qualité lyophilisées différentes (mais appartenant au même lot), des techniciens différents. Les dosages ont été effectués à différents jours, sur trois contrôles de qualité interne de concentration faible, moyenne et forte, CQ<sub>1</sub> à CQ<sub>3</sub> (Chromsystems) ; la comparaison des valeurs a été effectuée sur 36 jours durant 8 mois. Le coefficient de corrélation linéaire de Pearson permet d'évaluer la liaison entre les jours de manipulation et les concentrations obtenues par CLUHP-SM-SM.

#### Concordance des deux méthodes

Afin de mesurer la concordance des deux méthodes, des mesures ont été réalisées à partir des échantillons sanguins provenant de 80 patients de sexe masculin et féminin, prélevés entre février et août 2019 au Laboratoire d'hormonologie à Cochin. Ces échantillons ont été dosés par la méthode de radioimmunoanalyse et par la méthode CLUHP-SM-SM. Ces mesures sont quantitatives et continues. Pour évaluer la concordance entre ces deux séries de mesures, nous avons utilisé une méthode numérique, la détermination du coefficient de concordance de Lin [14], et une méthode graphique, celle de Bland-Altman.

De façon simple, le coefficient de concordance de Lin quantifie les écarts entre les points d'abscisse la valeur obtenue dans la série n°1 et d'ordonnée celle obtenue dans la série n°2 et la droite à 45° représentant une concordance parfaite. Pour interpréter ce coefficient, nous l'avons comparé à la valeur attendue si les deux méthodes étaient concordantes. Cette valeur est calculée par la moyenne des coefficients de Lin obtenus en simulant 1000 fois l'expérience réalisée au laboratoire. Nous supposons dans cette simulation que les deux méthodes ont la même répétabilité. Nous avons effectué un premier tirage de 80 valeurs suivant une loi uniforme, situées entre 0 et 30, intervalle dans lequel se trouvent les concentrations en androstènedione mesurées au laboratoire, notées  $a_i$  ( $i$  allant de 1 à 80). Ces valeurs correspondent à la « vraie » concentration en androstènedione chez les 80 patients prélevés. Un deuxième tirage de 80 valeurs, notées  $b_{1,i}$ , suivant une loi normale centrée et d'écart-type égal à celui du *pool* faible utilisé pour la répétabilité, est effectué. Ces valeurs correspondent au bruit qu'introduit la méthode de radioimmunoanalyse. Enfin, un troisième tirage de 80 valeurs, notées  $b_{2,i}$ ,

*Acta discipulorum pharmaceuticae medicamentaria artis* suivant une loi normale centrée et de même écart-type que pour le deuxième tirage est effectué. Ces valeurs correspondent au bruit qu'introduit la méthode de CLUHP-SM-SM. Nous obtenons ainsi  $c_{1,i} = a_i + b_{1,i}$  et  $c_{2,i} = a_i + b_{2,i}$  représentant respectivement les concentrations dosées par la radioimmunoanalyse et la CLUHP-SM-SM. Nous avons deux séries de mesures pour lesquelles nous pouvons calculer le coefficient de Lin. Nous répétons 1000 fois ces 3 tirages. Nous obtenons 1000 valeurs du coefficient de Lin, notées  $L_{k}$ ,  $k$  allant de 1 à 1000. Nous pouvons alors calculer un coefficient de Lin attendu moyen, valeur attendue du coefficient de concordance de Lin :  $\frac{\sum_{k=0}^n L_k}{n}$ , où  $L_k$  est le coefficient de Lin calculé à chaque expérience et  $n = 1000$ .

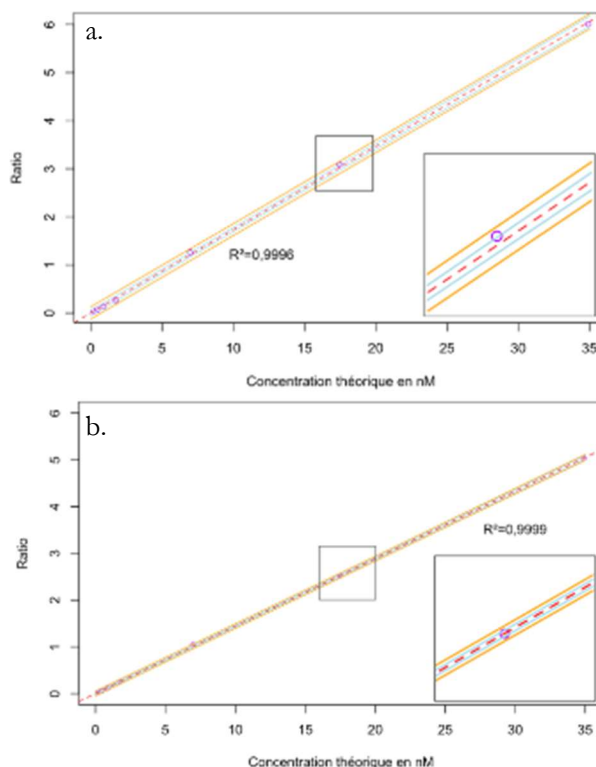
La méthode graphique de Bland et Altman repose sur la définition même de la concordance entre deux séries de mesures. Les deux séries sont concordantes si l'une ne surestime ou ne sous-estime pas l'autre de façon trop importante, et si les écarts entre les deux séries pour chaque individu mesuré ne sont pas trop importants [15]. Le graphique de Bland-Altman permet de représenter la différence de concentrations entre les deux méthodes en fonction de la moyenne des concentrations. Il peut ainsi nuancer, infirmer, ou bien au contraire confirmer le niveau de concordance quantifié par les méthodes numériques en s'affranchissant des statistiques [14].

## Résultats

### Linéarité

Toutes les concentrations — des *pools* de sérums utilisés pour l'étude de répétabilité, des contrôles qualité utilisés pour l'étude de la fidélité intermédiaire, des sérums de patients utilisés pour l'étude de la concordance des deux méthodes — ont été déterminées à partir des coefficients obtenus à partir de gammes d'étalonnage. Nous présentons ici plus précisément les gammes d'étalonnage utilisées pour le calcul des concentrations des *pools* P<sub>1</sub>, P<sub>2</sub>, P<sub>3</sub> utilisés dans l'étude de répétabilité (figure 2). À partir de régressions linéaires, les coefficients de détermination ont été obtenus avec  $R^2 = 0,9996$  pour la gamme P<sub>1</sub> et  $R^2 = 0,9999$  pour la gamme P<sub>2</sub>-P<sub>3</sub>.

Afin de préciser les valeurs obtenues à l'aide de la courbe d'étalonnage, un intervalle de prédiction a été construit [16]. Il permet d'établir une plage de valeurs susceptible de contenir, avec une confiance de 95 %, une future mesure du ratio pour une concentration donnée (figure 2). La largeur de l'intervalle permet d'apprécier la précision de la méthode. La méthode de dosage est d'autant plus précise à l'endroit où l'intervalle est le plus petit. Pour nos deux gammes, l'intervalle de prédiction est étroit et s'élargit légèrement aux extrémités, notamment pour la gamme P<sub>1</sub>. La mesure de concentration est donc plus précise pour les valeurs moyennes de la gamme.



**Figure 2 : Courbes d'étalonnages obtenues**

Deux gammes ont été étudiées : celle associée au dosage du pool P<sub>1</sub> (a.) et celle associée au dosage des deux autres pools (b.). Trait pointillé rouge : droite d'étalonnage obtenue ; trait cyan : intervalle de confiance à 95 % de la droite d'étalonnage ; trait continu orange : intervalle de prédiction à 95 % de la gamme d'étalonnage.

### Répétabilité

À la suite de l'observation de la linéarité du modèle des gammes d'étalonnage, la variance et le coefficient de variation ont été calculés pour l'ensemble des *pools* de sérum de patients (tableau 2). La variance de P<sub>3</sub> est 100 fois supérieure à celles de P<sub>1</sub> et P<sub>2</sub> tandis que le coefficient de variation est du même ordre de grandeur pour les trois *pools*.

Plus la variance est élevée, plus la dispersion des observations est importante ; elle est très sensible aux valeurs extrêmes. Ici, plus les concentrations sont élevées, plus la variance augmente et donc plus la dispersion des observations est importante.

### Fidélité intermédiaire

La fidélité intermédiaire a été étudiée en comparant les valeurs de concentration mesurées par CLUHP-SM-SM avec les valeurs annoncées pour

<i>Pool</i>	<i>n</i>	Variance (nM <sup>2</sup> )	CV (%)	Moyenne (nM)	Écart-type (nM)
P <sub>1</sub>	27	3,26×10 <sup>-3</sup>	3,6	1,58	0,0571
P <sub>2</sub>	29	9,44×10 <sup>-5</sup>	2,4	3,94	0,0954
P <sub>3</sub>	29	3,78×10 <sup>-5</sup>	4,3	19,1	0,826

**Tableau 2 : Résultats de répétabilité sur les pools de sérums de patients**

P<sub>1</sub> : *pool* bas ; P<sub>2</sub> : *pool* moyen ; P<sub>3</sub> : *pool* fort. CV : coefficient de variation.



chaque contrôle de qualité interne (CQI) par la société Chromsystems. Les concentrations du CQI faible devaient être comprises entre 0,697 et 1,29 nM, celles du CQI moyen devaient se situer entre 3,08 et 4,62 nM et celles du CQI fort, entre 25,5 et 38,3 nM. Ces valeurs définissent l'intervalle cible. Toutes les mesures des contrôles de qualité interne sont comprises dans l'intervalle cible (tableau 3). L'intervalle de confiance est bien compris dans l'intervalle cible comme indiqué dans la figure 3.

Contrôle de qualité interne			
	CQ <sub>1</sub>	CQ <sub>2</sub>	CQ <sub>3</sub>
Cible	[0,697 ; 1,29]	[3,08 ; 4,62]	[25,5 ; 38,3]
Moyenne	0,983	3,90	31,3
Écart-type	0,0991	0,269	2,43
CV (%)	10,1	6,9	7,8
IC 95	[0,962 ; 1,01]	[3,82 ; 3,97]	[30,7 ; 32,1]
<i>r</i>	-0,42	-0,22	-0,15
<i>t</i>	-2,73	-1,34	-0,91
Pente (nM/j)	-1,59×10 <sup>-6</sup>	-6,14×10 <sup>-6</sup>	-3,46×10 <sup>-4</sup>

**Tableau 3 : Résultats de fidélité intermédiaire**

Toutes les valeurs sont en nM, sauf précision contraire. Résultats obtenus sur 36 jours. CV : coefficient de variation ; IC 95 : intervalle de confiance à 95 % de la moyenne, *r* : coefficient de corrélation linéaire, *t* : valeur du critère de test de comparaison à 0 du coefficient de corrélation linéaire vrai (valeur attendue sous l'hypothèse de nullité : [-1,96 ; +1,96] au risque  $\alpha = 5 \%$ , dans l'approximation gaussienne).

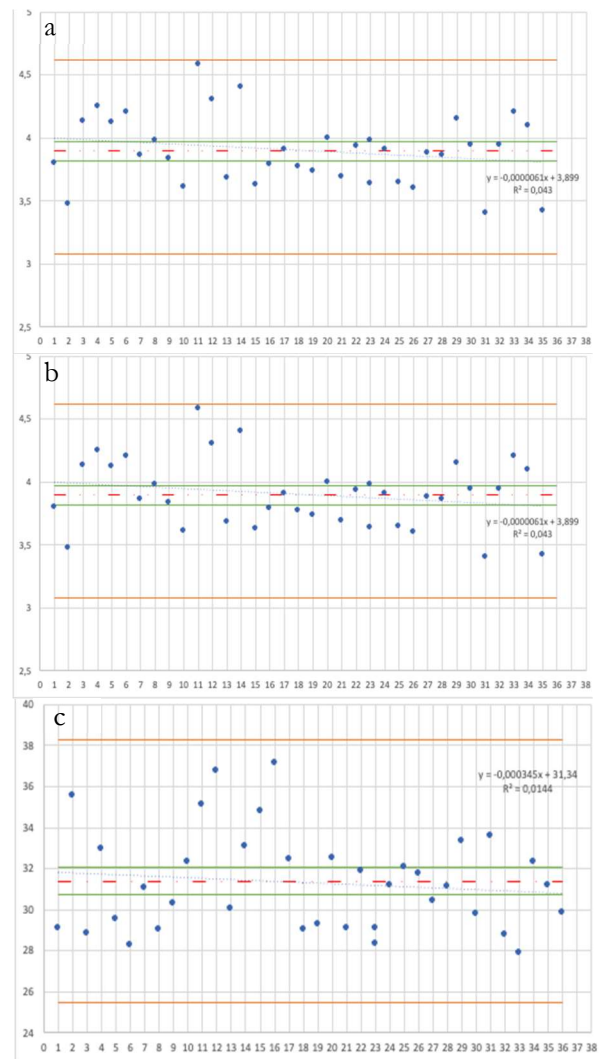
Les coefficients de corrélation de chaque contrôle qualité sont reportés dans le tableau 3. La valeur du critère de test de Pearson est comprise dans l'intervalle de non-rejet de l'hypothèse nulle pour CQ<sub>2</sub> et CQ<sub>3</sub> mais pas pour CQ<sub>1</sub>. Cela suggère une liaison entre le jour de dosage et les concentrations pour le *pool* faible, alors que les valeurs mesurées pour les *pools* moyen et fort semblent indépendantes du jour de dosage.

#### Concordance des méthodes

Pour la concordance des deux méthodes, le coefficient de concordance de Lin obtenu est de 0,820. La simulation de 1000 expériences similaires nous permet de calculer un coefficient moyen attendu, si les deux méthodes étaient concordantes, de 0,999.

Sur le graphique de Bland-Altman (figure 4a), pour des valeurs allant de 0 à 5 nM, les différences de concentrations se concentrent autour de 0, ce qui correspond au cas où les méthodes sont concordantes. Au-delà de 5 nM, les points sont répartis plus irrégulièrement et les différences de concentration augmentent. De plus, trois points correspondant à des mesures de concentrations élevées sortent de l'intervalle, ce qui suggère une discordance des deux méthodes.

La figure 4b permet de constater que la radioimmunoanalyse surestime la concentration mesurée. La première bissectrice représente le cas où les deux méthodes donnent la même valeur de concentration. Nous observons que pour l'intervalle de concentration [0 ; 5 nM] les points et la droite se superposent. Nos deux méthodes dosent alors la



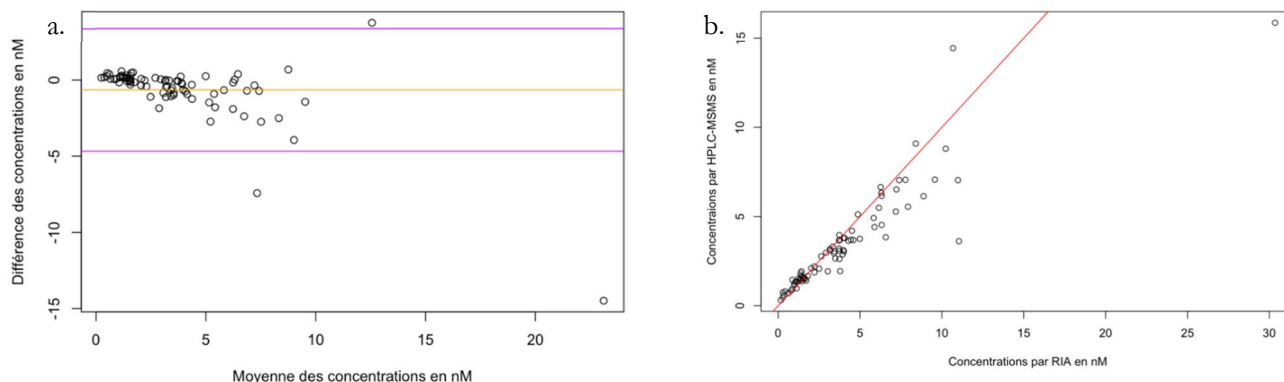
**Figure 3 : Valeurs mesurées pour chaque contrôle de qualité en fonction du jour**

Le jour est en abscisse, la concentration (en nM) en ordonnée ; a. : CQ<sub>1</sub>, b. : CQ<sub>2</sub>, c. : CQ<sub>3</sub>. Points bleus : résultats expérimentaux ; ligne tiretée rouge : moyenne des dosages ; lignes oranges : intervalle cible donné par le fournisseur ; lignes vertes continues : intervalle de confiance de la moyenne ; pointillé : droite de régression.

même quantité de 4-androstènedione dans un même échantillon. Pour des valeurs supérieures à 5 nM, la majorité des points se situe au-dessous de la droite. Cela correspond à une surestimation du dosage par la méthode de radioimmunoanalyse. Les deux méthodes ne fournissent alors pas la même valeur de concentration. Plus les concentrations sont élevées, plus les méthodes sont discordantes.

## Discussion

La droite d'étalonnage se construit à l'aide de la méthode des moindres carrés. La droite passant au plus près des points est celle qui minimise la somme (des carrés) des distances entre le *y* théorique et le *y* obtenu. Afin de vérifier si cette droite est la meilleure possible, plusieurs approches sont possibles. Le calcul du R<sup>2</sup> permet de juger l'alignement des points. Les valeurs du R<sup>2</sup> obtenues sont supérieures à 0,99 pour les



**Figure 4 : Résultats de l'étude de concordance entre les deux méthodes de dosage**

a. : diagramme de Bland & Altman (orange : biais moyen ; violet : intervalle de prédiction à 95 % approximatif du biais) ; b. : diagramme de concordance (rouge : droite d'identité,  $y = x$ ).

deux gammes, on peut donc valider la linéarité dans le cadre d'une bioanalyse. Cependant, l'appréciation par le  $R^2$  n'est pas suffisante puisque les  $R^2$  des deux gammes sont très proches de 1. Les valeurs ainsi obtenues par CLUHP-SM-SM pourraient ne pas correspondre aux valeurs exactes pour deux raisons : même si les points semblent alignés, la droite d'étalonnage n'est pas parfaite et les concentrations mesurées sont expérimentales donc incertaines [17]. Afin de vérifier la validité de la droite d'étalonnage, la précision des deux gammes a été confirmée à l'aide de leur intervalle de prédiction. La linéarité et la précision des deux gammes nous permettent donc d'estimer avec sûreté les concentrations de nos échantillons.

En ce qui concerne la répétabilité, on observe que la variance du *pool* fort diffère fortement de celles des *pools* faible et moyen. Les mesures effectuées sur le *pool* fort présentent la dispersion la plus élevée. La précision est représentée notamment par le coefficient de variation. Ainsi, les mesures effectuées par CLUHP-SM-SM sont moins précises pour des concentrations en stéroïdes appartenant au *pool* fort. Tous les coefficients de variation obtenus pour les trois *pools* sont inférieurs à 15 % [9]. La méthode possède donc une répétabilité conforme aux exigences de l'EMA dans le cadre des analyses biomédicales.

En ce qui concerne la fidélité intermédiaire, les coefficients de variations des contrôles de qualité sont inférieurs à 15 % [9]. La précision inter-jour de la méthode est donc valable dans le cadre de bioanalyses. L'étude de la liaison entre les jours de mesure et les concentrations obtenues a démontré une indépendance entre les deux variables pour les *pools* moyen et fort. Pour le *pool* faible, le critère de test nous permet de rejeter l'hypothèse d'indépendance entre les variables. La valeur du coefficient de corrélation est négative : lorsqu'une variable augmente l'autre diminue. Ainsi, la concentration des échantillons du *pool* faible diminue significativement au risque 5% au cours des jours. Ceci est probablement dû à une dégradation de l'hormone à faible concentration.

Le coefficient de Lin permet d'apprécier la concordance entre deux méthodes. Il varie de  $-1$  à  $1$ . Un coefficient égal à  $-1$  correspond à une discordance

parfaite. Lorsqu'il vaut 0, la concordance est nulle. Enfin, un coefficient de 1 témoigne d'une concordance parfaite. Le coefficient de concordance de Lin entre les méthodes de radioimmunoanalyse et de CLUHP-SM-SM est de 0,820. Nous pouvons comparer ce coefficient de concordance au coefficient de concordance de Lin attendu dans le cas où les deux méthodes étaient concordantes, valant 0,999. Au regard de ce coefficient nous comprenons que nos deux méthodes ne sont pas concordantes. Par ailleurs, d'après McBride [18], un coefficient de concordance de Lin pour des variables continues inférieur à 0,90 nous permet de conclure à une concordance « faible ».

La figure 4 nous conforte dans cette idée : elle nous indique que pour des concentrations comprises entre 0 et 5 nM, les méthodes sont concordantes. Au-delà de 5 nM, les deux méthodes ne fournissent pas la même valeur de concentration, avec une surestimation de cette valeur par la méthode de radioimmunoanalyse. Plus les concentrations sont élevées, plus les méthodes sont discordantes.

Cet intervalle de concentrations pour lesquelles les deux méthodes sont concordantes est à mettre en regard des valeurs usuelles en androstènedione obtenues par CLUHP-SM-SM (annexe). Chez la femme adulte, les concentrations en androstènedione peuvent s'élever jusqu'à 7 nM, concentration à laquelle les deux méthodes sont discordantes. Cela peut être problématique au niveau clinique notamment dans le cadre d'un bilan hormonal. Cependant, dans le cadre d'une hyperplasie surrénale congénitale, les taux d'androstènedione peuvent atteindre 5 à 10 fois la normale, et sont généralement bien au-dessus de 17,5 nM chez les patients atteints de tumeurs surrénaliennes bénignes. La discordance des méthodes ne constitue alors pas une perte de chance pour le patient.

Nous pouvons expliquer la différence de mesures par un manque de spécificité de la radioimmunoanalyse. Cette méthode repose sur la détection de la 4-androstènedione par des anticorps. Or, cette hormone a une structure proche de la testostérone et de la dihydroépiandrostérone (figure 1).

Afin de vérifier cette hypothèse, nous pourrions réaliser une expérience de dosage de plusieurs

échantillons par radioimmunoanalyse. Dans un premier temps, un dosage de la 4-androstènedione uniquement (de concentration connue) serait effectué par radioimmunoanalyse à l'aide d'anticorps dirigés contre la 4-androstènedione. Ensuite, un mélange de 4-androstènedione et un autre stéroïde de structure proche (progestérone, prégnénolone, testostérone, 17 $\alpha$ -hydroxyprégnénolone, 17 $\alpha$ -hydroxyprogestérone ou déhydropiandrosterone) et de concentration connue serait dosé. Enfin, un mélange plus complexe de 4-androstènedione et deux ou trois hormones pourrait également être dosé, afin de reproduire une situation plus proche de celle d'un sérum de sujet en situation physiologique. La différence de concentration entre la valeur théorique et la valeur obtenue permettrait d'établir le biais et donc la justesse de mesure du dosage par radioimmunoanalyse. Cette expérience permettrait ainsi d'apprécier la quantité de réactions croisées retrouvée dans les sérums.

Cependant, d'après F. Janse et coll. [17], une radioimmunoanalyse effectuée *a posteriori* d'une extraction liquide solide (ELS) qui permet d'extraire le maximum de 4-androstènedione serait aussi efficace que la CLUHP. Les limites de la méthode résident peut-être dans la méthode d'ELS qui n'est pas assez spécifique de la 4-androstènedione par rapport aux autres stéroïdes. Une ELS plus spécifique permettrait donc d'obtenir une meilleure concordance des deux méthodes et serait une solution moins coûteuse. Cependant, la radioimmunoanalyse couplée à cette ELS plus spécifique reste une méthode longue et

Validation du dosage de l'androstènedione difficile à mettre en œuvre. En clinique, les méthodes permettant d'analyser rapidement plusieurs métabolites à la fois comme le propose la CLUHP-SM-SM, grâce à une analyse en *multiplex* (jusqu'à 6 stéroïdes dans le laboratoire de notre étude), sont préférables bien que plus coûteuses.

Le dosage de la  $\Delta$ 4-androstènedione en CLUHP-SM-SM est applicable en clinique. Les concentrations des *pools* bas et moyen comme celles des contrôles qualités correspondent aux niveaux de concentration retrouvés chez la plupart des patients sans discrimination d'âge (annexe). Le *pool* fort correspond à des valeurs extrêmes qui peuvent être observées dans certaines pathologies : hyperplasie congénitale des surrénales, tumeurs surrénaliennes ou ovariennes androgéno-sécrétantes.

## Conclusion

La méthode de CLUHP-SM-SM peut être utilisée dans le cadre du dosage de l'androstènedione quel que soit le contexte. Elle présente l'avantage d'être plus spécifique que la radioimmunoanalyse, ce qui implique une adaptation des valeurs de référence. Cependant, le clinicien doit être vigilant lors du suivi des patients à ce que la même technique de dosage soit utilisée d'une fois à l'autre.

La méthode de dosage de la 4-androstènedione a été déposée auprès de l'organisme accréditeur COFRAC et a été accréditée.

## Bibliographie

- [1] B. LACOUR & J.-P. BELON. *Physiologie*, Elsevier Masson, 2015.
- [2] M.-M. SAMAMA, D. GERMAIN & P. KAMOUN. « Delta-4-Androstènedione », *Précis de Biopathologie: Analyses médicales spécialisées*, Biomnis, 2012. <https://www.eurofins-biomnis.com/referentiel/liendoc/precis/DELTA4-ANDROSTENEDIONE.pdf>.
- [3] Jean-Louis BEAUDEUX, Dominique BONNEFONT-ROUSSELOT, P. CHARPIOT & F.-X. MAQUART. *Explorations en biochimie médicale : interprétations et orientations diagnostiques*, Médecine Sciences Publications, 2019.
- [4] S. TAHERI, G. ZARARSIZ, S. KARABURGU, M. BORLU, M. T. OZGUN, Z. KARACA, F. TANRIVERDI, M. DUNDAR, F. KELESTIMUR & K. UNLUHIZARCI. « Is idiopathic hirsutism (IH) really idiopathic? mRNA expressions of skin steroidogenic enzymes in women with IH », *European Journal of Endocrinology*, 2015, vol. 173, p. 447–454. <https://doi.org/10.1530/EJE-15-0460>.
- [5] M. PEIGNÉ, A. VILLERS-CAPELLE, G. ROBIN, D. DEWAILLY. « Hyperandrogénie féminine », *La Presse Médicale*, 2013, vol. 42, p. 1487–1499. <https://doi.org/10.1016/j.lpm.2013.07.016>.
- [6] Beckman Coulter. *Androstenedione – Analyte information*, 2017, [http://immunotech.cz/Media/Default/MIB\\_Info\\_Lines/Reproduction/Androstenedione\\_analyte\\_info.pdf](http://immunotech.cz/Media/Default/MIB_Info_Lines/Reproduction/Androstenedione_analyte_info.pdf).
- [7] I. H. THORNEYCROFT, W. O. RIBEIRO, S. C. STONE & S. A. TILLSON. « A radioimmunoassay of androstenedione », *Steroids*, 1973, vol. 21 p. 111–122. [https://doi.org/10.1016/0039-128x\(73\)90024-x](https://doi.org/10.1016/0039-128x(73)90024-x).
- [8] S. J. BRUCE, F. REY, A. BÉGUIN, C. BERTHOD, D. WERNER & H. HENRY. « Discrepancy between radioimmunoassay and high performance liquid chromatography tandem-mass spectrometry for the analysis of androstenedione », *Analytical Biochemistry*, 2014, vol. 455 p. 20–25. <https://doi.org/10.1016/j.ab.2014.03.021>.
- [9] *European Medicines Agency, Guideline on bioanalytical method validation*, 2011. [https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-guideline/guideline-bioanalytical-method-validation\\_en.pdf](https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-guideline/guideline-bioanalytical-method-validation_en.pdf).
- [10] COFRAC, *Guide technique d'accréditation de vérification/validation des méthodes en biologie médicale*, <https://tools.cofrac.fr/documentation/SH-GTA-04>.
- [11] S. J. SOLDIN & O. P. SOLDIN. « Steroid Hormone Analysis by Tandem Mass Spectrometry », *Clinical Chemistry*; 2009, vol. 55 p. 1061–1066. <https://doi.org/10.1373/clinchem.2007.100008>.
- [12] M. PEITZSCH, T. DEKKERS, M. HAASE, F. C. G. J. SWEEP, I. QUACK, G. ANTOCH, G. SIEGERT, J. W. M. LENDERS, J. DEINUM, H. S. WILLENBERG & G. EISENHOFER. « An LC-MS/MS method for steroid profiling during adrenal venous



- sampling for investigation of primary aldosteronism », *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 2015, vol. 145 p. 75–84. <https://doi.org/10.1016/j.jsbmb.2014.10.006>.
- [13] V. P. SHAH. « The history of bioanalytical method validation and regulation: Evolution of a guidance document on bioanalytical methods validation », *AAPS J*, 2007, vol. 9 p. E43–E47. <https://doi.org/10.1208/aapsj0901005>.
- [14] P. QUÉTIN, J.-C. HUSTACHE, P. PERNEY & G. PAOLINI. *Analyse mathématique pour la comparaison des mesures de transparence de l'eau avec deux différents disques de Secchi*, 2020, p. 10.
- [15] L. DESQUILBET, *Guide pratique de validation statistique de méthodes de mesure: répétabilité, reproductibilité, et concordance* (2019), p. 48.
- [16] Emmanuel CURIS & Marie-Claude MENET « Détermination de la précision d'une concentration inconnue obtenue à partir d'une droite d'étalonnage », *L'Actualité chimique*, 2015, p. 45–49.
- [17] F. JANSE, M. J. C. EIJKEMANS, A. J. GOVERDE, E. G. W. M. LENTJES, A. HOEK, C. B. LAMBALK, T. E. HICKEY, B. C. J. M. FAUSER & R. J. NORMAN. « Assessment of androgen concentration in women: liquid chromatography-tandem mass spectrometry and extraction RIA show comparable results », *European Journal of Endocrinology*, 2011, vol. 165 p. 925–933. <https://doi.org/10.1530/EJE-11-0482>.
- [18] G. MCBRIDE. *A Proposal for Strength-of-Agreement Criteria for Lin's Concordance Correlation Coefficient*, National Institute of Water & Atmospheric Research Ltd, 2005. <https://www.medcalc.org/download/pdf/McBride2005.pdf>.
- [19] ANST – *Clinical: Androstenedione, Serum, Mayo Clinic Laboratories*, <https://www.mayocliniclabs.com/test-catalog/Clinical+and+Interpretive/9709>.
- [20] S. J. SOLDIN, C. M. D. BRUGNARA & E. C. WONG, *Pediatric Reference Ranges*, 4<sup>e</sup> édition, American Association for Clinical Chemistry, Washington DC, 2003.

## Annexe

Enfant prématuré		Enfant à terme		Garçon, homme		Fille, femme	
26 à 28 semaines	J4 : 3,2 à 9,8	1 à 7 jours	0,7 à 10,1	Stade I <i>Moins de 9,8 ans</i>	< 1,8	Stade I <i>Moins de 9,2 ans</i>	< 1,8
31 à 35 semaines	J4 : 2,8 à 15,6	1 mois à 1 an	< 2,4	Stade II <i>[9,8 ; 14,5[</i>	1,1 à 2,3	Stade II <i>[9,2 ; 13,7[</i>	1,5 à 3,5
				Stade III <i>[10,7 ; 15,4[</i>	1,7 à 3,5	Stade III <i>[10,0 ; 14,4[</i>	2,8 à 6,6
				Stade IV <i>[11,8 à 16,2[</i>	1,7 à 4,9	Stade IV <i>[10,7 ; 15,6[</i>	2,7 à 7,9
				Stade V <i>[12,8 ; 17,3[</i>	2,3 à 7,3	Stade V <i>[11,8 ; 18,6[</i>	2,8 à 8,4
				Adulte	1,4 à 5,2	Adulte	1 à 7

### Valeurs usuelles de concentrations en androstènedione, en fonction de l'âge et du sexe

Toutes les valeurs, obtenues par chromatographie couplée à la spectrométrie de masse en tandem, sont exprimées en nM [19]. Les catégories d'âges associées à chaque stade sont précisées en italique, exprimées en années [20].