

Testostérone libre et testostérone salivaire

L'analyse de la testostérone salivaire peut constituer un élément clé du bilan androgénique, chez la femme en particulier, reléguant au second plan l'intérêt porté jusqu'alors à la détermination plasmatique des taux totaux et des fractions réputées biologiquement actives de l'hormone. La diversité des méthodes disponibles pour réaliser l'analyse de la testostérone totale et de ses fractions dans les différents milieux conduit à l'obtention de résultats dépendant des techniques appliquées, parfois difficilement interprétables. Seule une bonne compréhension du concept des hormones libres ainsi que des propriétés analytiques et des limites de chaque méthode permet de dissiper les nombreux malentendus qui en résultent.

François Rey

Testostérone plasmatique totale, testostérone libre ... ou testostérone salivaire?

Chez le garçon et l'homme adulte, sans préjuger du milieu le plus favorable à l'analyse et de la fraction à doser, la détermination des taux de testostérone est généralement réservée à l'investigation des défauts présumés de la fonction testiculaire endocrine ou des suspicions d'activité androgénique insuffisante (retard pubertaire, gynécomastie, hypogonadisme, infertilité, etc.). L'analyse est utile aussi au suivi des patients sous substitution androgénique ou soumis à un traitement freinateur de la production testiculaire [1].

Chez la fille et la femme par contre, l'analyse est plutôt réalisée lors de l'investigation et du suivi des situations cliniques associées à un excès de production de l'hormone d'origine surrénalienne ou ovarienne, voire à des effets périphériques trop marqués (syndrome des ovaires polykystiques, hirsutisme, virilisation, troubles du cycle, etc.) [1].

Dans le sang, la testostérone circule sous deux formes, l'une liée à des protéines vectrices, l'autre libre. La mesure des taux sanguins totaux permet d'évaluer la capacité de production de l'hormone alors que la détermination des taux libres correspondants assimilés à la fraction bioactive, sous réserve de la validité du choix des méthodes analytiques, permet d'en estimer la

disponibilité tissulaire (1 à 3%). La testostérone libre n'est toutefois pas active en tant que telle. Ses effets dépendent de la capacité des tissus cibles à la réduire en 5 α -dihydrotestostérone (DHT), et enfin du taux des récepteurs spécifiques de ce métabolite actif.

Le contenu en testostérone de la salive est réputé refléter les taux libres plasmatiques correspondants. En réalité, les taux salivaires en diffèrent et fournissent vraisemblablement une indication sur le métabolisme androgénique périphérique. Chez la femme en particulier, la testostérone salivaire permet à elle seule d'établir un «mini-bilan androgénique» et son intérêt surpasse celui de la fraction libre circulante.

L'investigation clinique des situations précitées s'avérerait très difficile s'il fallait évaluer précisément chaque élément de la cascade conduisant de la production de la testostérone à ses effets. En pratique, la détermination des taux sanguins totaux et/ou des taux salivaires, de préférence aux taux libres sanguins, peut fournir des informations suffisantes. Au besoin, l'analyse des stéroïdes précurseurs de la testostérone, ainsi que de la SHBG et de la LH, permet de compléter le bilan androgénique.

Hors du contexte clinique et en raison du caractère non invasif de la collecte des échantillons, la testostérone salivaire a trouvé de nombreux adeptes parmi les investigateurs d'études comportementales et psychosociales. Pour

la même raison, de nombreux «laboratoires» en proposent l'analyse sur le web dans le cadre de «bilans» destinés à promouvoir l'établissement de plans de substitutions hormonales ... et la vente des produits correspondants.

Les déterminants de la testostérone libre plasmatique

La testostérone circulante se lie principalement à deux protéines, la SHBG et l'albumine. La SHBG la fixe avec une forte affinité mais avec une faible capacité, l'albumine avec une très grande capacité mais avec une très faible affinité. Chez l'homme «standard», la testostérone se fixe à raison de 44% à la SHBG, de 50% à l'albumine et de 4% à une troisième protéine, la CBG. Chez la femme, les proportions diffèrent et s'approchent respectivement de 66%, 30% et 2%. Dans les deux cas, la fraction libre ne représente que les 1 à 3% des taux totaux [2].

Aux taux de testostérone totale identiques, deux patients peuvent présenter des taux libres très différents lorsque leurs taux de SHBG diffèrent ou lorsqu'une substance quelconque entre en compétition avec l'hormone pour la fixation protéique. À l'inverse, deux patients peuvent présenter des taux libres identiques en présence de taux totaux distincts.

Deux situations cliniques illustrent l'importance des variations de la liaison de la testostérone. La première concerne les patientes traitées au danazol chez lesquelles la très forte liai-

son du médicament à l'albumine et à la SHBG, conjuguée à un abaissement marqué des taux de cette dernière, provoque un doublement des taux libres en dépit d'un abaissement des taux totaux. L'hirsutisme est un effet secondaire fréquent du traitement imputable en particulier à ses conséquences sur la liaison de la testostérone. La seconde situation concerne la grossesse au cours de laquelle les taux libres de testostérone demeurent stables malgré une élévation très marquée des taux totaux, comparable à celle que l'on observe en présence d'une tumeur virilisante. Dans ce cas, la très forte augmentation de la SHBG induite par l'élévation des œstrogènes préserve la future mère des effets androgéniques attendus d'une pareille situation.

Les déterminants de la testostérone salivaire

Chez l'homme, les taux salivaires de testostérone, bien que légèrement inférieurs aux taux libres plasmatiques, en sont très proches. Historiquement, cette observation a conduit à l'hypothèse que les glandes salivaires se comportent comme un système d'ultrafiltration offrant un libre passage aux petites molécules. Tout comme la testostérone totale circulante, la testostérone salivaire suit un rythme circadien, s'abaissant d'environ 30% entre 8h et 17h. Chez l'adulte, ses taux diminuent avec l'âge.

Chez la femme par contre, les taux salivaires s'avèrent deux à trois fois plus élevés que les taux libres plasmatiques correspondants, remettant en cause l'idée d'un «simple» transfert passif entre les deux compartiments. Nos observations, basées sur le calcul de «l'excès» du contenu en testostérone de la salive par rapport aux taux libres plasmatiques correspondants, nous ont conduits à suspecter une conversion d'androstènedione dans les glandes mêmes. Ainsi, chez la femme tout au moins, la testostérone salivaire reflèterait non seulement les taux libres plasmatiques mais pourrait s'avérer être aussi un excellent marqueur du métabolisme androgénique périphérique. La discordance observée entre taux salivaires et taux libres plasmatiques, souvent mal comprise, a conduit

à tort à discréditer l'analyse salivaire. Plus de 70% des patientes hirsutes présentent un taux élevé de testostérone salivaire, supérieur à 100 pmol/l, révélateur dans plus de 95% des cas d'un taux élevé de testostérone et/ou d'androstènedione plasmatique, voire d'une SHBG effondrée [3].

Dans ce contexte, il est certain que l'analyse de la testostérone salivaire, réalisée par une méthode fiable, peut constituer un élément essentiel du bilan androgénique.

Il a été suggéré que le contenu en testostérone de la salive pourrait être affecté physiologiquement par le flux gingival ou par des microlésions de la muqueuse buccale. Nos propres mesures des taux salivaires de SHBG et d'albumine ne soutiennent pas cette hypothèse. Toute contamination devrait être considérée comme accidentelle.

Détermination de la testostérone libre plasmatique: méthodologies et limites d'interprétation

La plupart des méthodes de détermination directe ou indirecte des taux libres circulants conduisent à l'obtention de résultats «méthode-dépendant», difficilement comparables, à considérer avec réserve. Les problèmes rencontrés renforcent l'intérêt de l'analyse salivaire.

Un rappel des fondements et des particularités de chaque méthode s'impose afin d'en définir les limites d'application.

Détermination de la testostérone libre plasmatique par dialyse (ou ultrafiltration)

La procédure consiste à dialyser les échantillons de plasma, puis à déterminer le contenu en testostérone des dialysats par une méthode analytique très sensible ou par mesure de la répartition de testostérone radiomarquée ajoutée aux échantillons avant dialyse. Les difficultés associées aux mesures finales limitent le recours à cette méthode. En particulier, le degré de pureté de la testostérone radiomarquée, difficilement contrôlable, affecte directement les résultats. L'ultrafiltration, basée sur les mêmes principes, est soumise aux mêmes difficultés d'application.

Les taux libres déterminés par cette méthode de référence représentent 1,5% à 2,5% des taux totaux chez les sujets normaux (dépendance du sexe).

Détermination de la testostérone libre plasmatique par RIA direct

Les méthodes RIA disponibles, comme nous l'avons déjà montré en 1990, conduisent en fait à la mesure des taux de testostérone totale qu'elles expriment sous forme d'un pourcentage fixe, proche de 0,8%, donnant l'illusion de la mesure de taux libres [4]. Malgré les nombreuses publications incitant à renoncer à leur usage, ces méthodes sont toujours commercialisées et utilisées ... [5]

Détermination de la testostérone libre plasmatique par calcul

Les taux libres calculés à partir des concentrations de testostérone totale et de SHBG représentent les taux que l'on devrait idéalement mesurer si aucune interaction n'invalide l'approche mathématique. Ces taux sont erronés en particulier lorsque d'autres molécules entrent en compétition avec la testostérone pour la liaison protéique (cas des patientes traitées au danazol!).

Les taux calculés dépendent du modèle mathématique retenu et des propriétés analytiques des dosages de testostérone totale et de SHBG. Ils doivent être considérés comme indicatifs et être interprétés avec réserve [6].

Index androgénique

Les taux de testostérone totale rapportés aux taux de SHBG définissent un index qui serait associé à l'imprégnation androgénique des patients. L'approche manque de finesse. A titre d'exemple, l'index d'une patiente qui verrait doubler ses taux circulants de testostérone et de SHBG demeurerait le même alors que son taux de testostérone libre plasmatique augmenterait de 60%!

Détermination de la testostérone biodisponible plasmatique par précipitation fractionnée

L'affinité de liaison de la testostérone à l'albumine étant faible, une partie de cette fraction pourrait s'avérer disponible dans certains tissus. Le concept

de fraction biodisponible a ainsi été introduit pour regrouper en une seule entité les deux fractions circulantes dont la disponibilité tissulaire est pressentie. La fraction libre et la fraction liée à l'albumine représentent à elles deux 30% à 55% des taux totaux selon le sexe.

L'analyse de la fraction biodisponible implique une précipitation fractionnée de la testostérone liée à la SHBG par saturation des échantillons en sulfate d'ammonium puis la mesure effective des taux de testostérone dans le surnageant par immuno-analyse ou détermination de la répartition de testostérone radiomarquée. La nature du milieu soumis aux mesures compromet la fiabilité de l'analyse.

A défaut, la fraction biodisponible, comme la fraction libre, peut aussi être estimée par calcul mais avec toutes les réserves associées à ce type d'approche.

La fraction biodisponible mérite-t-elle l'intérêt clinique particulier que d'autres souhaitent lui attribuer? Certainement pas si l'on considère qu'elle évolue parallèlement à la fraction libre dans la majorité des cas et que ses variations relatives ne permettent pas de la considérer comme un facteur plus discriminant.

Testostérone salivaire: aspects préanalytiques et analytiques

Contrairement à certains préjugés, l'analyse de la testostérone salivaire est totalement fiable pour autant qu'elle soit réalisée en respectant quelques principes.

Préanalytique

En raison du rythme circadien de la testostérone, les échantillons de salive devraient être collectés à heure fixe au cours des consultations successives d'un ou une même patient(e).

Les échantillons peuvent être recueillis par simple salivation dans un flacon. La durée de la récolte ne devrait pas excéder 15 minutes. Bien que le débit salivaire n'affecte pas le contenu salivaire en testostérone, nous préconisons de renoncer à l'usage des dispositifs commerciaux facilitant la salivation (tampons, papiers absorbants, chewing-gum, etc.). La plupart des supports retiennent en effet une

partie des hormones récoltées, d'autres paraissent même libérer des substances interférentes compromettant l'exactitude des résultats [7]. L'usage du système Salivette®, pourtant fréquemment recommandé, conduit à l'obtention de valeurs élevées totalement aberrantes dans notre propre RIA (valeurs décuplées chez la femme). Lorsque le recueil par salivation libre est difficilement envisageable (jeunes enfants), il est préconisé de procéder à la collecte par aspiration.

Les patients doivent renoncer à s'alimenter, à boire et à fumer dans l'heure qui précède le prélèvement; le lavage des dents est également proscrit durant cette période.

Tout échantillon souillé par des traces de sang doit être rejeté. Les expectorats sont impropres à l'analyse.

Analytique

Les difficultés associées au dosage de la testostérone salivaire sont avant tout liées aux très faibles concentrations à mesurer, situées pour la plupart entre 15 et 500 pmol/l, excluant d'emblée le recours à l'usage d'automates d'immunanalyse ou de méthodes commerciales manuelles, même modifiées. Quelques laboratoires prétendent recourir à l'HPLC/MS mais aucun résultat probant n'a encore été publié à ce sujet.

L'approche la plus performante consiste à réaliser l'analyse par RIA, sur échantillons préalablement extraits. Chaque laboratoire est pratiquement contraint de développer son propre essai [3]. Une méthode d'analyse directe par immuno-compétition, faisant appel à un marqueur luminescent, est néanmoins commercialement disponible [8].

Interférences

Notre laboratoire a acquis une expérience de plus de 25 ans dans l'analyse

de la testostérone salivaire. Outre les interférences observées en relation avec l'usage des dispositifs de prélèvement, nous avons identifié deux situations cliniques conduisant à la détermination de taux salivaires erronés.

La première concerne les hommes atteints de gynécomastie traités par application topique de DHT, patients chez lesquels les taux de testostérone salivaire apparaissent paradoxalement très élevés. Nous avons pu montrer dans ce cas que la salive «concentre» la DHT à un point tel que sa réaction croisée lors de l'analyse de la testostérone par RIA, bien qu'inférieure à 10% et en principe acceptable, conduit à une surestimation considérable des taux pouvant dépasser 1000 pmol/l (des taux salivaires de DHT supérieurs à 10 nmol/l ont été mesurés par GC/MS chez certains patients concernés!). Le processus impliqué et son rôle ne nous sont pas connus mais renforcent l'hypothèse de l'existence de processus actifs modulant le contenu salivaire en certaines hormones [9].

La seconde situation a été observée dans les mêmes circonstances cliniques chez des patients traités par application topique de testostérone. Nous suspectons dans ce cas un processus semblable résultant de la conversion périphérique préalable de la testostérone en DHT.

Nous ne connaissons pas d'autres limites à l'analyse de la testostérone salivaire.

En guise de conclusion ...

Chez la femme, l'analyse de la testostérone salivaire procure des informations particulières surpassant celles que fournissent les taux plasmatiques totaux et les taux libres. Il est pleinement justifié de la recommander en lieu et place des analyses sanguines dans la grande majorité des cas. Au be-

Testostérone libre plasmatique: l'analyse par dialyse constitue la seule référence.

Testostérone salivaire: le meilleur compromis pour approcher la fraction libre circulante et le métabolisme androgénique périphérique.

Index androgénique: une approche simpliste d'un autre temps!

Testostérone libre ou biodisponible plasmatique calculée: une approche théorique souvent mise en défaut.

Testostérone biodisponible: une analyse difficile dont l'intérêt ne peut pas surpasser celui de la fraction libre circulante ou de la testostérone salivaire.

soin, le «bilan androgénique» qu'elle permet d'établir peut être complété dans un second temps par l'analyse de la testostérone totale, de l'androstène-dione et/ou de la SHBG sanguines.

Chez l'homme, l'analyse de la testostérone salivaire offre une alternative à la détermination des taux sanguins totaux, facilitant en particulier le prélèvement des échantillons. En raison de l'abaissement des taux en cours de journée et de leur dépendance de l'âge, les valeurs de référence doivent être rigoureusement déterminées et reportées en fonction de la situation des patients.

Dans tous les cas, l'analyse de la testostérone salivaire est à préférer à celle des taux libres plasmatiques.

Correspondance:
Dr François Rey (PhD)
Service d'endocrinologie, diabétologie
et métabolisme
BH-19
CH-1011 Lausanne
Francois.Rey@chuv.ch

Références

- 1 Rosner W, Auchus RJ, Azziz R, Sluss PM, Raff H. Position statement: utility, limitations, and pitfalls in measuring testosterone: an Endocrine Society position statement. *J Clin Endocrinol Metab.* 2007;92:405–13.
- 2 Dunn JF, Nisula BC, Rodbard D. Transport of steroid hormones: binding of 21 endogenous steroids to both testosterone-binding globulin and corticosteroid-binding globulin in human plasma. *J Clin Endocrinol Metab.* 1981;53:58–68.
- 3 Rey F, Gomez F. La testostérone salivaire: un indicateur du métabolisme androgénique des tissus périphériques. *Med et Hyg.* 1989;47:345–7.
- 4 Rey F, Chiodoni G, Braillard K, Berthod C, Lemarchand-Béraud T. Free testosterone levels in plasma and saliva as determined by a direct solid-phase radioimmunoassay: a critical evaluation. *Clin Chim Acta.* 1990;191:21–30.
- 5 Rosner W. An extraordinarily inaccurate assay for free testosterone is still with us. *J Clin Endocrinol Metab.* 2001;86:2903.
- 6 Södergard R, Bäckström T, Shanbhag V, Carstensen H. Calculation of free and bound fractions of testosterone and estradiol-17beta to human plasma proteins at body temperature. *J Steroid Biochem.* 1982;16:801–10.
- 7 Groschl M, Rauh M. Influence of commercial collection devices for saliva on the reliability of salivary steroids analysis. *Steroids.* 2006;71:1097–100.
- 8 Goncharov N, Katsya G, Dobracheva A, Nizhnik A, Kolesnikova G, Herbst V et al. Diagnostic significance of free salivary testosterone measurement using a direct luminescence immunoassay in healthy men and in patients with disorders of androgenic status. *Aging Male.* 2006 June;9:111–22.
- 9 Gomez F, Rey F, Schweizer C, Saugy M, Gaillard RC. Massive dehydrotestosterone (DHT) accumulation in saliva during percutaneous DHT administration. 84th Annual Meeting of the Endocrine Society, San Francisco, USA, 2002 (abstract).