

Application de la spectrométrie de masse en exploration hormonale

Jean Fiet^{a,*}, Frank Giton^{a,b}, Jérôme Guéchet^c

RÉSUMÉ

La spectrométrie de masse (SM) couplée à la chromatographie en phase gazeuse (GC-MS) ou en phase liquide (LC-MS/MS) est de plus en plus utilisée en hormonologie, particulièrement pour les dosages des stéroïdes. La spécificité et la sensibilité des dosages des stéroïdes par SM sont comparées à celles obtenues couramment par immunologie (radioimmunologie (RIA) et automates d'immunoanalyses).

Les principales situations clinico-biologiques au cours desquelles la SM présente des avantages de spécificité ou de sensibilité par rapport aux dosages immunologiques sont les suivantes: le diagnostic de l'hyperplasie congénitale des surrénales à la naissance en particulier chez les prématurés, et plus généralement l'exploration des divers déficits enzymatiques des stéroïdes, le dosage du cortisol urinaire et du cortisol salivaire dans l'exploration du syndrome de Cushing, la détermination de l'aldostérone du plasma (difficile par RIA), celle de la cortisone au cours des syndromes d'excès apparent en minéralocorticoïdes, l'exploration des hyperandrogénies avec leurs diverses étiologies (ovaires polykystiques, syndromes de Cushing, tumeurs endocriniennes, forme non classique de déficit en 21-hydroxylase, idiopathiques), le diagnostic différentiel des états pré-pubères et pubères en pédiatrie.

Cependant malgré les avantages réels de la SM par rapport aux dosages immunologiques, une validation rigoureuse des dosages est nécessaire en particulier pour les dosages des stéroïdes isomères qui présentent le même spectre de fragmentation.

La SM élargit le domaine d'exercice des biologistes car elle leur donne accès à des dosages, et par conséquent à des pathologies, auparavant réservés à des laboratoires très spécialisés comme les dosages de 21-désoxycortisol, 11-désoxycorticostérone, 11-désoxycortisol, androstènediol, prégnénolone et 17-OH-prégnénolone. Enfin, la mise en œuvre de la SM en conduisant à des résultats plus exacts, permet d'améliorer la comparabilité des résultats entre les laboratoires.

GC-MS – LC-MS/MS – stéroïdes – déficits enzymatiques des surrénales – syndrome de Cushing – hypertension endocrinienne – hyperandrogénie – hypogonadisme – ménopause – pédiatrie – vitamines D.

a Laboratoire des stéroïdes – INSERM U955 Eq07

Faculté de médecine

8, rue du Général-Sarrail

94010 Créteil cedex

b Centre d'investigation biomédicale

Hôpital Henri-Mondor- Groupe hospitalier universitaire Sud (AP-HP)

51, av. du Mal de Lattre-de-Tassigny

94010 Créteil cedex

c Service de biochimie A

Hôpital Saint-Antoine (Hôpitaux universitaires Paris-Est, AP-HP)

184, rue du Faubourg Saint-Antoine

75571 Paris cedex 12

* Correspondance

fiet@univ-paris12.fr

article reçu le 13 septembre accepté le 13 septembre 2011

© 2011 – Elsevier Masson SAS – Tous droits réservés.

SUMMARY

Application of mass spectrometry in hormonal exploration

Mass spectrometry (MS) coupled with gas- or liquid-phase chromatography (LC-MS/MS) is used more and more frequently in hormone biology, particularly for steroid assays. We emphasize the specificity and sensitivity qualities of LC-MS/MS in comparison with assays carried out by radioimmunity (RIA) or by automated immunoanalysis in the investigation of endocrine syndromes.

The main biological and clinical situations for which MS improves specificity or accuracy relative to immunologic assay methods are the following: congenital adrenal hyperplasia diagnosis, particularly in premature newborns, and in general, studies of steroid enzyme deficiencies, urinary and salivary free cortisol, in Cushing's syndrome investigation, difficult aldosterone assay, cortisone assay in diagnosis of apparent mineralocorticoid excess syndrome, hyperandrogeny studies with the various etiologies (idiopathic hirsutism, polycystic ovary, 21-hydroxylase deficiency, endocrine tumors, Cushing's syndrome) and the pre- and post-pubertal differential diagnosis.

However, in spite of the real advantages of MS compared with immunological assays, rigorous validation of MS assay is necessary during development of the method, especially for assays of steroid isomers, which present the same fragmentation spectrum.

We emphasize the interest of MS, which broadens biologists' area of activity, since it provides them with access to new steroid assays, and, as a consequence, to pathologies previously reserved to very specialized laboratories, for example, for 21-deoxycortisol, 11-deoxycorticosterone, 11-deoxycortisol, androstenediol, pregnenolone and 17-OH-pregnenolone. Finally, by yielding more accurate results, the use of MS should allow improvement in comparison of results among laboratories.

GC-MS – LC-MS/MS – specificity – steroid enzymatic deficiency – pediatrics – hyperandrogeny – aldosterone – cortisone.

1. Introduction

Les dosages par spectrométrie de masse en hormonologie en 2011 s'adressent essentiellement aux stéroïdes. Dans les années 1970, on a vu apparaître leurs dosages dans les urines par chromatographie en phase gazeuse (CPG) très rapidement associés à un développement

Tableau I – Comparaison des qualités et avantages respectifs de la GC-MS et de la LC-MS/MS [5].

Caractéristiques	GC-MS	LC-MS/MS
Diversité des dosages	Petites molécules (MM < 500 Da), stéroïdes non conjugués, prostaglandines, acides organiques, acides gras (les analytes doivent être volatils après dérivation)	Très grande diversité des dosages. Stéroïdes non conjugués et conjugués, acides aminés, acylcarnitines, bases puriques et pyrimidiques, prostaglandines, petits peptides et protéines (liste non limitative)
Facilité d'utilisation	Moyenne	Plus grande que la GC-MS
Dérivation	Nécessaire	Généralement non nécessaire
Automatisation	Injection seule	Complète
Vitesse de l'analyse	Lente	Rapide
Résolution de la chromatographie	Excellente	Pauvre
Spécificité	Excellente	Excellente
Dérivés 3-oxo 4-ène	Détection moyenne	Détection excellente
Dérivé 3-hydroxy	Bonne détection	Détection médiocre
Profils de stéroïdes non ciblés	Bonne	Médiocre

des dosages plasmatiques par radioimmunologie (RIA). Ainsi, une sémiologie endocrinienne s'est constituée, basée sur des dosages hormonaux plasmatiques mettant en œuvre des étapes de purification préalable par extraction et chromatographie avant l'étape terminale de RIA. Des valeurs « normales » des stéroïdes ont ainsi été décrites. En raison de la difficulté de ces étapes de purification et du savoir-faire nécessaire à leur réalisation, des dosages dits « directs » se sont développés, par RIA ou non isotopiques, sur des plates-formes d'immunoanalyse, avec des résultats souffrant d'un manque de spécificité. Depuis une quinzaine d'années, des spectromètres de masse couplés à la chromatographie en phase gazeuse (GC-MS) ont été mis à la disposition des biologistes. Les résultats obtenus sont reconnus comme exacts et ont servi de référence dans les programmes de contrôle de qualité des dosages de stéroïdes pour les laboratoires de biologie médicale. Parallèlement, les spectromètres de masse couplés à la chromatographie en milieu liquide, dite « haute performance » (CLHP), sont apparus. Ils font actuellement l'objet d'un développement rapide ; pratiquement tous les stéroïdes conjugués ou non peuvent être dosés par cette méthode appelée LC-MS/MS (« liquid chromatography tandem mass spectrometry »), qui associe la CLHP à deux spectromètres de masse en tandem.

Nous décrivons très succinctement le principe de fonctionnement des appareils de spectrométrie de masse couplés aux chromatographes. Nous ferons le point sur les applications actuelles (en 2011) et probables de ces méthodes aux différents chapitres de l'exploration hormonale en montrant ce que la spectrométrie de masse peut apporter en matière de diagnostic et de traitement par rapport aux méthodes immunologiques.

2. Principes du fonctionnement des spectromètres de masse [1, 2]

2.1. Spectromètres de masse couplés à la chromatographie en phase gazeuse (GC-MS, et GC-MS/MS)

La chromatographie sur cet appareillage nécessite une attention spéciale à la préparation de l'échantillon. Après incubation en présence de stéroïdes deutérés (étalons internes), les stéroïdes du plasma sont extraits par un solvant organique. Puis, suit une étape de purification rapide sur colonne de silice, et enfin une étape de dérivation. Cette dernière est effectuée pour les stéroïdes hydroxylés (testostérone, DHT, DHEA, androstènediol, estradiol et estrone essentiellement), à l'aide de chlorure de pentafluorobenzoyl, et pour les stéroïdes non hydroxylés (androstènedione) par le pentafluorobenzylhydroxylamine [3, 4]. La séparation chromatographique est réalisée dans une colonne capillaire (30 m, I.D. 0,25 mm, film 0,15 µm) (DB-17HT, J&W, réf. 122-1831) selon un gradient de température de 190 °C à 310 °C. En sortie de colonne chromatographique, les stéroïdes dérivés sont introduits dans la source du spectromètre de masse où ils sont ionisés. Il s'agit d'une ionisation chimique en présence du gaz méthane. Des électrons produits par un filament ionisent le gaz méthane en produisant certains ions pouvant réagir avec les molécules de stéroïde arrivant dans la source. Dû à la présence d'halogènes sur la molécule, les ions chargés négativement sont dirigés vers l'analyseur quadripolaire. Dans celui-ci, les ions sont séparés en fonction des rapports masse sur charge (m/z). Parmi les 7 stéroïdes suivants que nous dosons journalièrement (testostérone, DHT, DHEA, androstènediol, estradiol,

Download English Version:

<https://daneshyari.com/en/article/7655202>

Download Persian Version:

<https://daneshyari.com/article/7655202>

[Daneshyari.com](https://daneshyari.com)