« Développement d'une méthode de référence par chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse et de matériaux de référence pour des hormones stéroïdiennes dans des matrices biologiques »

Les perturbateurs endocriniens sont des substances capables d'interférer avec le système hormonal en imitant, bloquant ou modifiant l'action des hormones naturelles, ce qui perturbe les mécanismes biologiques de régulation comme par exemple pour les hormones stéroïdiennes. Les hormones stéroïdiennes, naturellement présentes chez l'Homme, constituent des biomarqueurs essentiels pour le diagnostic et le suivi thérapeutique de certaines pathologies. Des variations de concentration de l'ordre du pg/mL peuvent être représentatives de certaines pathologies ou d'une exposition à des perturbateurs endocriniens, ce qui impose non seulement des exigences élevées en termes de sensibilité, d'exactitude des méthodes analytiques existantes mais aussi de fiabilité et de comparabilité des résultats de mesure quelle que soit la méthode de dosage employée, dans le temps, et dans l'espace. Toutefois, les performances des méthodes couramment utilisées en pratique de routine restent limitées. En effet, les limites de quantification ne sont pas systématiquement adaptées aux besoins de diagnostic n'y spécifiques aux composés d'intérêt. Pour répondre à ces enjeux, l'utilisation d'outils métrologiques permet le raccordement des résultats aux unités du Système International. Il est ainsi nécessaire de disposer de méthode de référence et de matériaux de référence certifiés d'ordre supérieur. Dans ce contexte, l'approche métrologique permet de relier les résultats de mesure aux unités du Système international, tout en associant une incertitude de mesure maîtrisée.

L'objectif principal de cette thèse a été de développer une méthode de référence utilisant le DI-LC-MS/MS pour la quantification d'hormones stéroïdiennes dans le sérum humain. Un second objectif a consisté à assigner des valeurs de concentration à des échantillons de sérum humain, en vue de leur utilisation comme matériaux de référence.

À l'issue d'une étude bibliographique, trois hormones utilisées en pratiques cliniques et dont le besoin d'amélioration de la mesure a été exprimé ont été sélectionnées : la testostérone, l'aldostérone et le 17β-estradiol. La sérum humain est une matrice complexe qui nécessite un prétraitement de l'échantillon pour extraire les trois molécules dont les propriétés physico-chimiques sont proches. Deux méthodes de préparation de l'échantillon et d'analyse utilisant

la DI-LC-MS/MS ont été développées : une méthode de quantification et une méthode à visée de référence. Après les développements, les limites de quantification atteignent l'ordre du pg/mL. Les incertitudes élargies relatives de mesure évaluées pour la seconde méthode, sont inférieures à 10%. Pour évaluer la spécificité des méthodes, l'étude de la séparation des isomères et des isobares a été menée.

Enfin, des valeurs de concentration traçable aux unités du Système International ont été assignées à des échantillons de sérum humain, ouvrant la voie à la production de matériaux de référence certifiés. Ces matériaux de référence certifiés ont été produits dans le cadre de ces travaux.

Ces outils métrologiques permettront d'améliorer l'harmonisation des méthodes de dosage des hormones stéroïdiennes à des niveaux de concentration pertinents en biologie médicale.