



Une nouvelle perspective sur les défis de la spectrométrie de masse

Gary Impey, Christie Hunter et Andre Schreiber, Applied Biosystems Inc.

Contact France : Didier Deporte, sales manager, **Email :** didier.deporte@eur.appliedbiosystems.com, **Tél :** +33 2 98 38 30 07

Entraînés dans la complexité des domaines de la découverte et du développement de médicaments, de la protéomique ou des analyses des aliments et de l'eau, les laboratoires dépendent de plus en plus de spectromètres de masse sophistiqués pour surmonter les défis importants et contraignants auxquels ils doivent faire face. Les problèmes tels que le type, la qualité et la concentration des échantillons, les demandes de capacité toujours croissantes et les limites en terme de workflow des techniques de spectrométrie de masse (MS) actuellement disponibles sont tous considérés comme allant de soi et doivent être résolus si l'on souhaite repousser encore plus les frontières de l'analyse.

Pour les workflows impliqués dans la découverte des médicaments, le problème de la détection et de l'identification des métabolites dans les systèmes *in vivo* représente un défi critique. La grande variété de matrices complexes (telles que la bile, le plasma, l'urine et les extraits fécaux), et les effets de suppression ionique de ces matrices biologiques, peuvent réduire de façon importante la capacité de détection des métabolites. Une plus grande sensibilité des instruments est nécessaire pour détecter ces composés et, en même temps, elle contribue à minimiser la préparation des échantillons, en diluant simplement les effets négatifs de ces matrices complexes et en évitant les étapes longues et laborieuses de la concentration ou de la purification de l'échantillon qui pourraient autrement s'avérer nécessaires.

Lors du développement des médicaments, les études de microdosage (utilisant moins d'un centième de la dose normale) permettent une évaluation plus précoce et potentiellement plus sûre, de la pharmacocinétique des nouveaux composés chez l'homme par rapport aux études de Phase I classiques ; elles permettent par ailleurs de réduire ou de remplacer les essais d'innocuité ou de toxicologie chez l'animal. La sensibilité élevée de la chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse (LC-MS) est un facteur significatif dans de telles stratégies, permettant la détection de concentrations de composés et métabolites bien plus faibles, aussi bien en analyse qualitative que quantitative.

Nombre de composés présentant un intérêt sont présents à faibles concentrations - un problème également fréquemment rencontré lors des travaux de vérification et de validation des biomarqueurs - et une sensibilité insuffisante des instruments pourrait empêcher de détecter certains composés clés. De même, dans les secteurs de l'alimentation et de l'environnement, les processus de contrôle de la qualité exigent constamment une plus grande sensibilité, afin de rester conforme aux réglementations qui réduisent progressivement les limites acceptables d'un nombre croissant de contaminants. En raison du grand nombre de composés qui doivent être détectés, on dispose de moins de temps pour contrôler chaque composé lors d'un même passage, ce qui réduit la sensibilité et conduit souvent à effectuer plusieurs injections, augmentant considérablement la durée

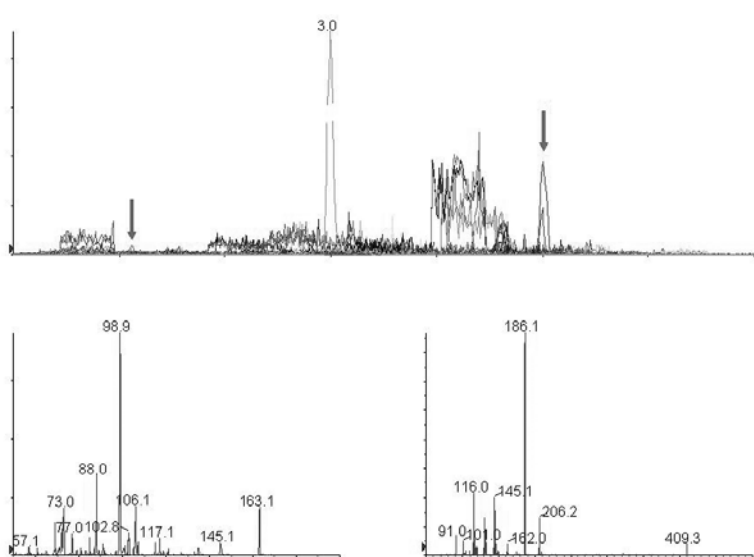


Figure 1 Analyse de plus de 1000 pesticides dans des échantillons de raisins. Le méthomyl et la trifloxystrobin ont été quantifiés et identifiés à l'aide de la Scheduled MRM et de la recherche rapide dans les archives de MS/MS.

des expériences. L'amélioration de la sensibilité des instruments et de la vitesse de balayage permettraient de contrôler un bien plus grand nombre d'analytes lors du même passage à la sensibilité requise, de telle sorte que chaque expérience nécessiterait moins d'injections, et que toutes les réponses nécessaires pourraient potentiellement être obtenues à partir d'une seule injection. La vitesse du spectromètre de masse est également importante pour d'autres raisons. Du fait de la tendance actuelle exigeant des temps d'analyse chromatographique plus rapides, de 5 minutes ou moins, un système doit pouvoir produire suffisamment de points de résultats pour chaque pic de chromatographie pour une analyse efficace en LC-MS. En outre, un balayage plus rapide et un cycle de fonctionnement amélioré permettent d'augmenter l'efficacité des workflows automatisés.

De nouveaux domaines de flexibilité

Concernant l'identification d'un grand nombre de composés (par exemple, lors de la phase de découverte de produits pharmaceutiques), normalement, un premier passage a été effectué à l'aide d'un spectromètre de masse à triple quadrupôle pour les fonctions de balayage sélectif, comme les spectres d'ions précurseurs et la perte de neutres, ce qui contribue à filtrer les composés indésirables. En général, la nature sélective du suivi des multiples fragmentations (multiple reaction monitoring, MRM), des spectres d'ions précurseurs et de perte de neutres procure le degré le plus élevé de détection par rapport à une méthodologie de spectrométrie de masse simple. Ensuite, aux fins de confirmation, d'autres instruments tels que les trappes d'ions, ont été utilisés en vue d'obtenir des spectres MS-MS (spectrométrie de masse en tandem) de bonne qualité.

À présent, avec la demande d'une plus grande qualité, efficacité, capacité et confiance dans les données avec aussi peu d'injections que possible, les spectromètres de masse sont conçus pour répondre précisément aux besoins des chercheurs. Des instruments dotés d'une sensibilité, d'une vitesse et d'une sélectivité améliorées, couplés à des combinaisons uniques de technologies au sein d'une plate-forme unique pour permettre des workflows plus efficaces, sont en cours de développement par les fabricants leaders du secteur. Parmi les instruments hybrides, on peut citer le

Système AB SCIEX QTRAP® 5500 de Applied Biosystems/MDS Analytical Technologies, qui combine un triple quadrupôle et une trappe d'ions couplée à un accélérateur linéaire (linear accelerator trap, LAT) sur la même plate-forme. De tels instruments sont en train de changer la façon dont l'analyse de spectrométrie de masse, tout comme l'identification des métabolites, est réalisée (par exemple, la MRM prédictive (pMRM), couplée au balayage MS-MS complet lors de la même analyse afin de confirmer que le composé est le métabolite attendu). La nature hybride de cette technologie permet aussi d'effectuer plus d'un test en un seul passage, ce qui est idéal pour les applications comme les analyses de détection de pesticides et de mycotoxines dans les produits alimentaires dérivés des grains, et la détection des produits pharmaceutiques et parapharmaceutiques et cosmétiques dans l'eau de boisson.

Avec l'addition d'un guide d'ions nouvellement développé et d'un LAT Q3 amélioré, le tout dernier de ces systèmes démontre des augmentations importantes de la réponse du signal, en particulier en

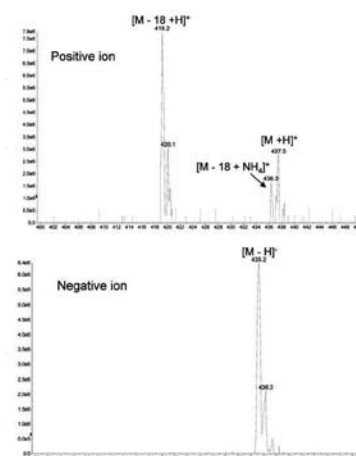


Figure 2 Détection de l'acide hydroxylique de simvastatine sous forme d'ions positifs et négatifs. Le précurseur lactonique de la simvastatine est hydrolysé en composé actif (acide hydroxylique de la simvastatine), et la simvastatine et son acide hydroxylique s'ionisent en ions positifs, mais l'acide hydroxylique est mieux détecté sous forme d'ion négatif. Parmi les 34 métabolites, cinq ont été détectés seulement sous la forme d'ions positifs, 28 ont été détectés seulement sous forme d'ions négatifs et un a été détecté sous les deux polarités.



Nikon...
... Microscopy and Imaging Solutions

- Clinical & medical microscopes
- Research upright & inverted microscopes
- Multi-purpose zoom microscope
- Extended zoom range with stereomicroscopes
- NIS-Elements software
- Digital cameras
- Advanced confocal imaging

Please take a look at our website :
<http://www.nikoninstruments.eu>

NIKON Belux - Microscience Division

Bourgetlaan - 1130 BRUSSELS - Tél : 02/702 83 06 - Fax : 02/726 66 45
microscience@nikon.be

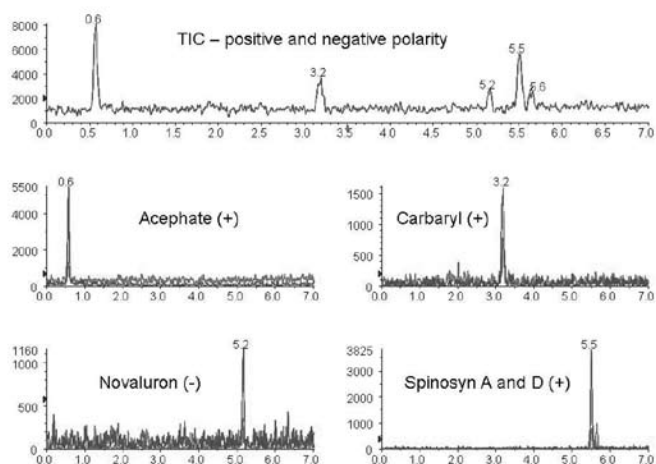


Figure 3 Analyse LC-MS/MS ultrarapide de quatre pesticides dans de l'eau de boisson à 0,1 µg/l à l'aide du changement rapide de polarité et de détection MRM rapide avec une sensibilité supérieure.

mode LAT. Le cycle de fonctionnement est encore amélioré grâce à des délais de remplissage de la trappe de seulement 50 µsec, en raison de l'augmentation de la sensibilité de la trappe d'ions. Nous voyons aussi des vitesses de balayage atteignant 20 000 Da/sec en mode LAT et quatre fois plus rapides en mode quadrupôle par rapport aux systèmes antérieurs. Ce taux de cycle plus important permet une compatibilité avec les pics chromatographiques aigus, ainsi qu'une couverture améliorée de l'acquisition dépendante de l'information (information-dependent acquisition, IDA) procurée par un nombre plus important de balayages dépendant de la spectrométrie de masse

en tandem (MS/MS); ceci constitue un avantage majeur lorsque des matrices complexes, telles que la bile, contiennent un nombre important de pics ne correspondant pas à des métabolites, et peuvent entraîner des signaux créés par des éléments étrangers en IDA. Les améliorations des vitesses de balayage en triple quadrupôle permettent aussi de réaliser plusieurs balayages d'exploration (survey scans), et de déclencher simultanément des balayages MS complets en tandem (MS/MS) à partir des pics qui pourraient être présents en mode LAT. La plus grande vitesse des instruments les plus récents, qui peuvent détecter plus de 1000 composés, signifie

que ces appareils conviennent parfaitement à l'analyse multicible (multitarget analysis), détectant tous les composés présentant un intérêt en une seule injection (**Figure 1**).

Avec des changements de polarité réalisés en seulement 50 msec, il est possible de combiner les modes les plus puissants de détection des métabolites en une seule injection avec une sensibilité suffisante en un temps de cycle de fonctionnement global d'environ 2 sec., pour un résultat précis permettant une détection exhaustive des métabolites ou des pesticides (**Figures 2, 3**).

La sensibilité et la vitesse améliorées sont aussi des facteurs importants pour les workflows de quantification ciblée efficace des peptides, notamment la vérification et la validation des biomarqueurs, et la sélectivité élevée envers les composés présentant un intérêt augmente certainement la capacité des workflows automatisés. Les systèmes combinés les plus récents permettent d'effectuer des vérifications basées sur des hypothèses, éliminant le besoin de standards protéiques synthétiques dans le développement des dosages, et la sensibilité accrue permet au LAT d'avoir une sensibilité équivalente à celle de la MRM, accélérant le développement et la confirmation de l'identification. La Scheduled MRM permet de réaliser des dosages bien plus multiplexés, tout en maintenant toujours une reproductibilité analytique; grâce aux derniers instruments capables d'effectuer jusqu'à 2500 MRM en un seul passage, ce qui équivaut à 100 protéines, un seul passage suffit à obtenir toutes les données requises, éliminant ce qui constituait jusqu'à présent un goulet d'étranglement potentiel.

Faire face à l'augmentation des données

Les derniers programmes logiciels qui accompagnent les plates-formes de spectrométrie de masse ont été développés en vue de mettre toutes les méthodes complexes et sophistiquées à la portée du chercheur, en seulement quelques clics de souris. La convivialité est une caractéristique clé, contribuant à rendre la technologie de spectrométrie de masse accessible par un nombre plus important d'utilisateurs. Les expériences et protocoles préconfigurés, prêts à l'emploi sont particulièrement utiles pour ceux qui débutent en LC-MS, et leur permettent de réaliser des expériences significatives en quelques semaines, plutôt qu'en quelques mois.

De même, le logiciel d'analyse des données a été mis à niveau de manière à pouvoir traiter les quantités considérables de données résultant de la capacité supérieure des nouveaux instruments de spectrométrie de masse, simplifiant et automatisant le processus analytique de manière à ne nécessiter qu'une intervention manuelle minimale.

Ces nouveaux systèmes offrent une solution complète pour les workflows en LC-MS/MS dans diverses applications, procurant ce qu'il y a de mieux en matière de précision et reproductibilité quantitative et qualitative, et générant également une analyse quantitative ciblée, une validation et une confirmation supérieures en un seul passage.

En Bref... En Bref...

En 2008, IPSOGEN a renforcé sa position de leader dans le domaine du diagnostic moléculaire et du suivi des leucémies

IPSOGEN (Alternext - FR0010626028 - ALIPS), 'profilier' des cancers, qui développe, fabrique et commercialise des tests de diagnostic moléculaire pour les leucémies et les cancers du sein a lancé 3 nouveaux kits au cours du 4ème trimestre 2008, qui viennent enrichir sa gamme de diagnostic moléculaire pour les leucémies.

Le Kit FusionQuant® BCR-ABL IVD, utilisé pour la détection et le suivi des leucémies myéloïdes chroniques (LMC), est une nouvelle version du produit existant, certifié CE. Ce nouveau kit de diagnostic in vitro, plus pratique à utiliser en laboratoire, fournit désormais tous les composants nécessaires à la réalisation des tests. Ce kit, comme les autres produits d'IPSOGEN contribuera à l'indispensable normalisation des tests, obligatoire pour un suivi optimal de la réponse moléculaire.

ProfileQuant® CLLU1, pour la leucémie lymphoïde chronique (LLC). Ce kit de recherche fournit une information pronostique et pourrait à terme être utilisé dans le suivi de cette maladie.

MutaScreen™ MPL, un kit de recherche pour la détection des mutations MPL dans les néoplasmes myéloprolifératifs JAK2 négatifs, vient enrichir la gamme de produits dédiés aux syndromes myéloprolifératifs (SMP) proposée par IPSOGEN.

Ces 3 nouveaux tests illustrent la stratégie d'IPSOGEN :

- (i) développer l'innovation technologique et scientifique pour répondre à des besoins diagnostiques non couverts et
- (ii) traduire rapidement les découvertes scientifiques en outils au service du patient, avec pour objectif ultime de permettre une médecine plus performante et plus personnalisée.

«Au dernier trimestre 2008, nous avons lancé 3 nouveaux produits. Avec désormais 21 kits - dont 10 sont certifiés CE - la gamme de

diagnostic moléculaire d'IPSOGEN couvre une partie significative des leucémies. Ces nouveaux produits aideront les hématologues à affiner et à améliorer leurs stratégies de traitement », commente Stéphane Debono, Directeur des Opérations d'IPSOGEN. « Le lancement de ces 3 nouveaux produits correspond à nos plans 2008. Nos équipes de vente sont ainsi dotées d'une gamme large de produits de référence dans le domaine de la leucémie, ce qui nous permettra de continuer à renforcer notre position de leader sur ce marché en pleine croissance », conclut Vincent Fert, PDG d'IPSOGEN.

« Profiler » des cancers, IPSOGEN développe et commercialise des tests de diagnostic moléculaire qui permettent de cartographier les maladies pour guider la décision des cliniciens et de leurs patients tout au long de leur parcours thérapeutique. Avec déjà plus de 70 références produits utilisées en routine dans le monde pour le diagnostic, le pronostic et le suivi de milliers de patients atteints de leucémie, IPSOGEN s'engage aujourd'hui dans le domaine du cancer du sein avec pour objectif de fournir des informations diagnostiques encore inaccessibles.

Fort de ses partenariats scientifiques, cliniques et technologiques, et de son équipe pluridisciplinaire en France et aux Etats-Unis, IPSOGEN entend s'imposer en leader mondial du profilage moléculaire des cancers, et poursuivre le développement et la promotion des standards qui font la différence pour le patient, le corps médical et la société dans son ensemble.

Au 31 décembre 2008, IPSOGEN employait 48 personnes. Son siège social est situé à Marseille. La société a également une filiale, IPSOGEN Inc., à New Haven, CT, Etats-Unis.

Pour en savoir plus : www.ipsogen.com

“Une sorbonne fonctionne 24 heures par jour...
et consomme 3,5 fois plus d'énergie
qu'une maison de taille moyenne.”

Plus maintenant.

Découvrez la sorbonne du futur



Green fume hood®
A Global Solution for Green Buildings.

Traduction libre de l'anglais : "A typical fume hood runs 24 hours a day...and uses 3.5 times more energy than the average house." (Bell et al 2003) Harvard Green Campus Initiative, (LBNL 2002)



www.GreenFumeHood.fr

Tél : 02 32 09 55 80 - info@erlab.net

Parc d'Affaires des Portes - BP 403 - 27104 Val de Reuil Cedex