

Spectrométrie de masse : en avoir ou pas ?

La spectrométrie de masse

La spectrométrie de masse est une méthode d'analyse qui permet la détermination de la masse moléculaire des composés analysés, ainsi que leur identification et leur quantification.

Le spectromètre de masse est un instrument qui comprend plusieurs parties, disposées en série, permettant successivement :

- l'introduction de l'échantillon ;
- l'évaporation et l'ionisation des molécules dans un élément appelé **source** (transformation des molécules à l'état naturel en ions à l'état gazeux) ;
- l'accélération des ions formés ;
- la séparation de ces ions dans un élément appelé **analyseur de masse**, en fonction de leur rapport m/z (masse sur charge) ;
- la détection, c'est-à-dire l'obtention du spectre de masse.

Les sources utilisées en fonction des composés analysés

Sous faible pression

1. **Ionisation et fragmentation sous impact électronique** : méthode adaptée aux composés de masse moléculaire inférieure à 1.000 daltons, facilement volatilisables et stables à température élevée.
2. **Ionisation chimique positive** : méthode plus douce que la précédente, convenant aux analytes du même type.
3. **Ionisation-désorption par impulsion laser assistée par une matrice (MALDI = matrix assisted laser desorption ionisation)** : méthode dite douce, utilisant une plaque métallique recevant un mélange co-cristallisé (molécule matrice + analyte), peu utilisée pour l'analyse des molécules organiques de masse inférieure à 500 daltons.

NB : une technique proche dans son principe (**SELDI-TOF : surface enhanced laser desorption-ionisation en détection par le temps de vol**) est associée à un système de séparation des protéines et peptides par chromatographie sur une surface plane (cette technique aurait une faible reproductibilité).

A pression atmosphérique

1. Ionisation par électronebulisation (**ESI = electrospray nebulization**) : méthode convenant pour un analyte introduit après chromatographie en phase liquide ou après électrophorèse capillaire, compatible pour de faibles débits. Applications : liquides facilement ionisables.
2. Ionisation chimique à pression atmosphérique (**APCI**) : méthode utilisable en aval d'une chromatographie en phase liquide (complémentaire de la méthode ESI).

Les analyseurs de masse

a) Les analyseurs à temps de vol (TOF = *time of flight*)

L'application d'un champ électrique fait que la distance parcourue par un ion jusqu'au détecteur (temps de vol) dépend du rapport m/z (les ions légers frappent le détecteur **avant** les ions lourds).

b) Les analyseurs utilisant un champ électrique oscillant :

- les analyseurs à filtre quadripolaire : systèmes assurant la sélection des ions ayant un rapport m/z déterminé, qui peuvent parvenir au détecteur sans être déchargés au contact des barres du quadripôle.
- les analyseurs à pièges à ions ou à trappe à ions. Dans ces systèmes, les champs électriques assurent le confinement dans l'analyseur, des ions de différents rapports m/z ; le spectre est obtenu en expulsant ces ions en fonction du rapport m/z.

Spectrométrie de masse en tandem

La spectrométrie de masse en tandem (MS/MS) combine en général deux analyseurs. Les ions formés dans la source entrent dans le premier analyseur MS1, d'où seuls les ions ayant un rapport m/z déterminé pourront sortir. Dans une cellule de collision, ces ions sélectionnés sont dissociés en ions fragments qui seront analysés dans le second analyseur MS2. Les équipements les plus souvent rencontrés dans les laboratoires sont des triples quadripôles.

La MS/MS offre trois avantages majeurs :

- capacité à étudier de nombreuses molécules appartenant ou non à la même famille structurale ;
- capacité à mettre en évidence des métabolites spécifiques d'une maladie ;
- automatisation offrant la possibilité de grandes séries d'analyses.

Les couplages aux techniques séparatives

1. Couplage à la chromatographie gazeuse

Il y a séparation de molécules vaporisées par effet thermique et entraînées par un gaz neutre pour être dirigées sur un MS ou un MS/MS.

La préparation des échantillons est une opération lourde.

2. Couplage à la chromatographie liquide (ou à l'électrophorèse capillaire)

En sortie de colonne analytique, l'ionisation est assurée par des systèmes **ESI** ou **APCI**.

Ces techniques présentent un énorme potentiel ; les ions ne sont pas des fragments moléculaires ; l'efficacité d'ionisation est molécule-dépendante ; il y a un risque de transfert de charge entre composés.

3. Electrophorèse bidimensionnelle sur gel

L'électrophorèse bidimensionnelle sur gel est le principal outil permettant de séparer des milliers de protéines (c'est l'analyse protéomique). Les protéines contenues dans l'échantillon biologique sont séparées d'abord par isoélectrofocalisation en fonction de leur point isoélectrique, puis par électrophorèse dénaturante en gel de polyacrylamide (PAGE-SDS) en fonction de leur masse. Les spots d'intérêt sont découpés des gels, puis traités par une protéase. La masse des peptides est obtenue par MS de type **ESI** ou **MALDI-TOF**. Mais, cette technique ne convient pas aux protéines faiblement exprimées, aux protéines très hydrophobes, ni aux protéines membranaires.

Applications en biologie médicale

Remarque : l'analyse protéomique repose également sur l'emploi de la spectrométrie de masse ; elle ne sera pas traitée ici car ses buts sont moins directement associés à des besoins cliniques de routine ; en effet, il s'agit plus de collecter des données utiles en biologie fondamentale, d'identifier des marqueurs spécifiques et sensibles de maladies ou de cibles d'intervention thérapeutique.

1. Applications en bactériologie-mycologie

L'identification rapide des microorganismes par MS-Maldi-Tof repose sur l'analyse des protéines ribosomales et des protéines associées aux membranes, après transfert d'une colonie ou extraction des protéines. Elle passe par une comparaison des spectres obtenus avec des spectres de référence validés.

Au niveau des performances, les publications font état d'au moins 90 % de concordance avec les méthodes d'identification conventionnelles.

2. Applications en biochimie

Il s'agit pour la plupart de méthodes de référence.

- Vitamine D : mise en évidence possible de la forme D2 (médicament) et de la forme D3 (synthèse endogène et aliments).
- Stéroïdes : formes non conjuguées par GC-MS/MS ; formes conjuguées par LC-MS/MS. NB : accès à la forme biodisponible de la testostérone.
- Désordres métaboliques : la spectrométrie de masse fait partie des méthodes essentielles pour le diagnostic et le suivi des maladies héréditaires du métabolisme : aminoacidopathies, déficits du cycle de l'urée, aciduries organiques, déficits de la β -oxydation des acides gras (dont le profil des acylcarnitines).
- Acides biliaires, acides gras libres, stérols.

3. Suivi thérapeutique-pharmacologie

Exemples : immunosuppresseurs (ciclosporine, tacrolimus, sirolimus, everolimus, acide mycophénolique), neuroleptiques (clozapine, haloperidol, penfluridol, thioridazine, flupenthixol, zuclopenthixol), hypnotiques dont les benzodiazépines (lorazepam, bromazepam, flunitrazepam, clonazepam, alprazolam, zopiclone, zolpidem), antimycosiques (posaconazole), médica-

ment utilisés dans le traitement de la leucémie myéloïde aigüe : erufosine (acylphosphocholine), antihistaminiques, antirétroviraux.

4. Toxicologie (toxiques, dopage, stupéfiants)

- Toxiques : métaux (jusqu'à 34 éléments), cyanures.
- Dopage : détection et identification de stéroïdes anabolisants (nandrolone et métabolites : norandrostérone et noréthiocholanolone).
- Stupéfiants et soumission chimique : opiacés, cocaïnes, buprénorphine et norbuprénorphine, cannabis, LSD, dérivés de l'ecstasy, GHB, kétamine.

Remarque : la spectrométrie de masse est aussi applicable en biologie vétérinaire ; elle est très présente dans le domaine de l'agroalimentaire et de la protection de l'environnement.

Conclusion

Les avantages de la spectrométrie de masse sont :

- l'accès (dans une situation de concurrence) à des analyses importantes : les médicaments (dont les immunosuppresseurs et les antirétroviraux), les drogues, les stéroïdes et la vitamine D, les maladies héréditaires du métabolisme, etc. ;
- cette technologie devrait également être indispensable à certaines études cliniques ;
- en dehors de la biologie clinique humaine, elle pourrait se révéler un atout dans le domaine de la biologie vétérinaire, de l'agroalimentaire et de l'environnement.

Ses inconvénients sont :

- son coût, car elle nécessite un budget d'équipement important.
Il n'existe pas de systèmes polyvalents, comme nous l'avons vu : en amont de l'affichage du résultat, la chaîne analytique peut varier en fonction de la molécule étudiée (GC-ou LC-MS, type d'ionisation, travail en faible pression ou à pression atmosphérique, analyse de masse en temps de vol ou en champ électrique oscillant, SM ou SM en tandem).
- son exécution doit être confiée à des techniciens hautement spécialisés.

Jacques Ingrand, comité scientifique Biomics

Bibliographie

- Baudin B. *et al.* Protéomique, spectrométrie de masse et analyses multiples. Cahier de formation BIOFORMA n°46, 2010.
- Courcol R. Quelles utilisations de la spectrométrie de masse de type Maldi-Tof en microbiologie médicale ? *Rev Fr Lab* 2009 ;416 :61-65.
- Vogeser M., Parkhofer KG. *et al.* *Liquid chromatography tandem-mass spectrometry (LC-MS/MS)-techniques and applications in endocrinology. Exp Clin Endocrinol Diabetes* 2007;115:559-70.
- Vogeser M. *et al.* *Progress in automation of LC-MS in laboratory medicine. Clin.Biochem* 2011;1,4-13.
- Cheillan D. *et al.* La spectrométrie de masse en tandem appliquée au dépistage néonatal des maladies héréditaires du métabolisme ; le point sur les méthodes actuelles. *Ann Biol Clin* 2004,62 ;269-77.
- Lacroix C. Préparation en ligne couplée à la LC-MS/MS ; applications aux dosages des médicaments et stupéfiants. Colloque CORATA, Namur, 8-10 juin 2011.

