

## LA SPECTROMÉTRIE DE MASSE EN TANDEM APPLIQUÉE À LA GÉNÉTIQUE

Pierre Allard

Biochimiste clinique  
Service de génétique médicale  
CHU mère-enfant Sainte-Justine  
3175 Chemin de la Côte Ste-Catherine  
Montréal, QC, Canada  
H3T 1C5

### INTRODUCTION

Les techniques et instruments utilisés dans le but d'analyser des marqueurs biologiques évoluent constamment. Dans cette perspective, l'instrument idéal devrait permettre d'analyser quantitativement, à partir d'une matrice complexe non purifiée, une multitude de composés, et ce, avec de très grandes sensibilité et spécificité. Parmi les instruments actuellement disponibles, qui tendent à se rapprocher de cet idéal, figure le spectromètre de masse en tandem (SM/SM). En effet, avec cet instrument, il est possible de déterminer la concentration de plusieurs dizaines de composés en seulement quelques minutes à partir d'un échantillon biologique ayant été soumis à une préparation simple et rapide. Une des principales applications du spectromètre SM/SM se trouve actuellement en pharmacologie, car il permet d'analyser des composés de structures chimiques variées avec une grande sensibilité, tels que les médicaments et leurs métabolites. De nombreuses autres applications ont été développées, tant dans les domaines de la biochimie que de la chimie, et de bons textes sur la spectrométrie de masse ont déjà été publiés (1-5). Le sujet de ce court texte portera uniquement sur les applications de la spectrométrie SM/SM dans le domaine de la génétique biochimique.

### PRINCIPES DE LA SPECTROMÉTRIE DE MASSE EN TANDEM

Bien que les principes physiques de la spectrométrie de masse remontent au début des années 1900, il faut attendre les années 1960 pour l'apparition de la spectrométrie SM/SM, puis la fin des années 1980 pour le développement d'un appareil permettant l'ionisation efficace et rapide d'un spécimen à partir d'une phase liquide. C'est véritablement à partir des années 1990, suite à la mise en marché d'instruments relativement abordables faisant appel à l'ionisation par électrovaporisation, que la spectrométrie SM/SM a pris un essor fulgurant au niveau des applications cliniques.

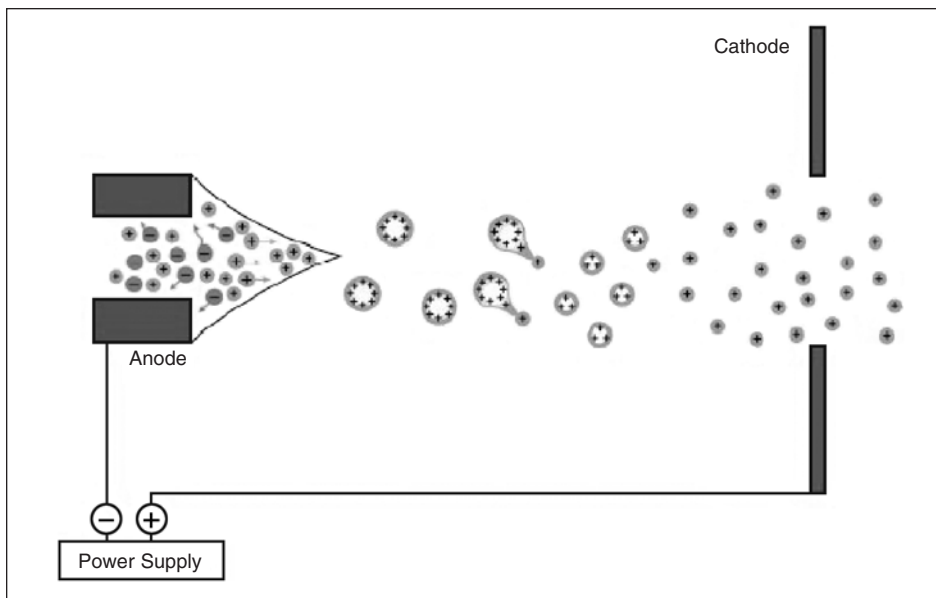
Le spectromètre SM/SM est un instrument qui peut être fragmenté en cinq composantes principales : la source d'ionisation, le premier spectromètre de masse, la cellule à collision, le deuxième spectromètre de masse et finalement le détecteur, tout cela dans un instrument compact. Le principe de base de la spectrométrie de masse implique que les molécules à analyser doivent posséder une charge. En absence de charge, il sera impossible de séparer et de concentrer les molécules dans le spectromètre de masse et il sera conséquemment impossible de

détecter ces composés. Afin d'ajouter une charge électrique aux composés à analyser, différentes sources d'ionisation ont été développées, chacune ayant ses forces et ses faiblesses (6). Conséquemment, dépendant de la taille et du type de molécule à analyser, une source d'ionisation peut être préférée à une autre. Les principes physiques permettant la séparation des molécules selon leur masse sont également variés (secteur magnétique, temps de vol, trappe ionique...), chacun présentant ses forces et ses faiblesses. Comme les sources d'ionisation et la technologie de spectrométrie de masse utilisées ne sont pas aisément interchangeables d'un instrument à un autre, cela se traduit par une série d'instruments ayant une gamme d'application spécifique et limitée. Par exemple, un spectromètre SM/SM utilisé pour analyser des protéines pourra difficilement analyser des petites molécules organiques, et inversement. Le spectromètre SM/SM est donc sélectionné en fonction du type de molécules à analyser et du degré de précision et de sensibilité recherché. Dans le cadre de ce court texte, l'instrument qui nous intéresse plus particulièrement est composé d'une source d'ionisation par électrovaporisation (Figure 1) et de spectromètres de masse à quadrupôles (Figure 2). C'est la configuration actuellement la plus utilisée pour les applications cliniques.

La source d'ionisation par électrovaporisation permet la vaporisation d'un échantillon présent dans une phase liquide, par exemple en provenance d'une colonne HPLC, en soumettant l'échantillon à un jet de gaz chaud et en même temps à un fort courant électrique. Les grosses gouttelettes formées au départ sont chargées par l'intermédiaire du courant électrique appliqué et deviennent ainsi de plus en plus petites jusqu'à former des ions moléculaires (2). Tel que montré à la Figure 1, lorsque les conditions instrumentales sont sélectionnées pour que l'anode soit située au niveau de l'échantillon liquide en provenance du HPLC, une charge positive sera acquise par les molécules de cet échantillon, si leur nature chimique le permet. Seuls les cations ainsi formés seront attirés et accélérés vers la cathode, et par un petit orifice présent dans cette cathode, ils pourront pénétrer plus loin dans l'appareil pour être analysés. Le reste de l'échantillon est éliminé par une pompe à vide. Il est à noter que si la nature chimique des molécules à analyser se prête davantage à la formation d'anions, il est possible d'inverser le courant. Ces ions peuvent ensuite pénétrer dans le premier spectromètre de masse pour être séparés en fonction de leur masse et de leur charge. Le premier spectromètre de masse est le plus souvent composé d'une enceinte formée de quatre barres métalliques (quadrupôle) ou plus (hexapôle, octapôle) auxquelles est appliqué un courant électrique. Afin d'alléger le texte, seul le terme quadrupôle sera utilisé dans les explications qui suivent.

**Figure 1**

Principe de la source d'ionisation par électrovaporisation.  
Schéma reproduit avec la permission de John Wiley & Sons Inc.



La Figure 2 illustre que lorsqu'une molécule pénètre dans une enceinte soumise à une radiofréquence précise, elle va adopter une trajectoire ondulatoire propre à sa masse et à sa charge. On peut constater que les mouvements oscillatoires réguliers de l'ion résonnant vont lui permettre de traverser toute la distance du spectromètre de masse et lui permettre ainsi de passer dans l'orifice de sortie. Par contre, à cette même radiofréquence, l'ion non résonnant de masse différente adopte une trajectoire qui ne lui permet pas de sortir du quadrupôle et il sera évacué par les pompes créant le vide de l'appareil. En changeant rapidement les radiofréquences sur un intervalle de quelques millisecondes, on peut ainsi analyser des composés de masse différente. Si on s'arrêtait ici, on aurait un spectromètre de masse simple. L'utilité de cet instrument resterait limitée, car de nombreux composés possèdent la même masse atomique, et une purification importante de l'échantillon ou séparation chromatographique préalable serait nécessaire afin de se débarrasser des contaminants. En ajoutant une cellule à collision et un deuxième spectromètre de masse, on obtient un spectromètre SM/SM qui permet d'obtenir beaucoup plus d'informations sur la nature du composé. La cellule à collision et le deuxième spectromètre de masse sont des quadrupôles, tout comme le premier spectromètre de masse, ce qui fait que ce type d'instrument est souvent appelé triple quadrupôle. Après leur sortie du premier spectromètre de masse (premier quadrupôle), seules les molécules d'une masse moléculaire précise pourront poursuivre leur chemin dans la cellule à collision (deuxième quadrupôle) où elles seront fragmentées en entrant en collision avec des molécules d'argon. Dans des conditions instrumentales particulières, le profil des fragments qui ont conservé une charge est habituellement unique à un composé. Comme il n'y a pas de séparation de masse dans la cellule à collision, l'analyse de la masse et de l'intensité relative des ions fragments se fait dans le deuxième spectromètre de masse (troisième quadrupôle), donnant un profil qui est en quelque sorte un empreinte digitale, permettant d'identifier à partir d'un mélange complexe une ou plusieurs molécules, et ce avec une grande précision. C'est ce qui fait la force de la spectrométrie SM/SM.

Étant donné la spécificité de l'information obtenue sur chaque composé, la préparation préalable de l'échantillon se limite souvent à une seule extraction organique simple. L'étape chromatographique devient souvent inutile ou réduite à sa plus simple expression, car on peut considérer que les deux spectromètres de masse jouent le rôle de deux étapes chromatographiques successives. Le temps d'analyse est ainsi significativement réduit et n'est plus que de quelques minutes par échantillon. Bien que cet instrument soit très performant, il comporte certaines limitations, les deux plus fréquentes affectant la sensibilité de détection et la difficulté à discriminer certaines molécules. Comme les molécules doivent obligatoirement être ionisées, toute interférence dans l'échantillon susceptible de diminuer l'efficacité de l'ionisation (sels, protéines...) affectera négativement le seuil de détection. Conséquemment, si un composé est particulièrement affecté

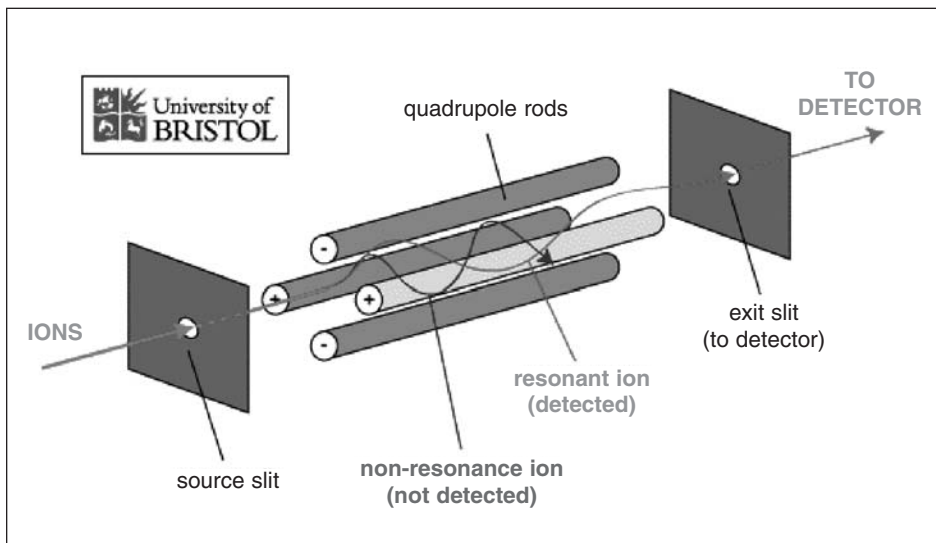
par ces interférences et que sa concentration est plus faible que le seuil de détection, il faudra purifier davantage ou concentrer l'échantillon avant de pouvoir l'analyser. En ce qui concerne la capacité à discriminer certaines molécules, il faut mentionner que les isomères, ayant par définition une masse moléculaire identique, ne sont conséquemment pas séparés par le premier spectromètre de masse, et comme les fragments qu'ils produisent dans la cellule à collision sont souvent identiques, il peut s'avérer impossible de les quantifier isolément. De plus, la complexité du mélange biologique est parfois si grande que la probabilité d'obtenir les mêmes ions fragments de la part de deux composés différents peut être élevée. Dans ces situations, une purification plus grande de l'échantillon ou une étape chromatographique HPLC préalable pour séparer les isomères peut s'avérer nécessaire afin d'obtenir l'information désirée.

## APPLICATIONS EN GÉNÉTIQUE

Les applications de la spectrométrie SM/SM sont particulièrement importantes en pharmacologie et en endocrinologie, mais également dans d'autres domaines comme la génétique. La première application clinique importante de la spectrométrie SM/SM en génétique fut l'analyse des acylcarnitines. La carnitine est une molécule de taille similaire aux acides aminés et jouant un rôle important dans la  $\beta$ -oxydation des acides gras (7). En présence d'un désordre métabolique de la  $\beta$ -oxydation, de certains autres désordres métaboliques ou dans certaines conditions physiologiques, il se produit une accumulation des acides organiques produits par l'organisme. Afin de s'en débarrasser, l'organisme dispose de plusieurs voies et mécanismes de détoxification et l'un d'entre eux est la conjugaison à la carnitine produisant des esters de carnitine appelés acylcarnitines. Ainsi, une élévation plasmatique des acylcarnitines peut entre autres suggérer la présence d'un désordre génétique du métabolisme. Bien que la mesure des acylcarnitines totaux soit utilisée dans les désordres du métabolisme, ce test est peu spécifique car de telles élévations peuvent également être observées dans

**Figure 2**

Mouvement ondulatoires des ions résonnants et non résonnants soumis à une radiofréquence précise. Schéma reproduit avec la permission du Dr Paul Gates, School of Chemistry, University of Bristol, UK.



plusieurs autres conditions. À titre d'exemple, un individu en état de jeûne prolongé produira une grande quantité de corps cétoniques dont une partie se condensera à la carnitine pour former de l'acétylcarnitine et du butyrylcarnitine, augmentant ainsi les niveaux d'acylcarnitines plasmatiques totaux à un niveau similaire à celui qui pourrait être observé chez un patient avec désordre génétique du métabolisme. Étant donné que de nombreux patients admis à l'urgence sont en état de jeûne prolongé, il devient donc très difficile d'interpréter adéquatement un résultat élevé d'acylcarnitines totaux. La solution à ce problème serait de déterminer les concentrations spécifiques des différents acylcarnitines. C'est là qu'entre en jeu le spectromètre SM/SM.

En faisant appel au pouvoir de résolution de cet appareil, on arrive à déterminer précisément les concentrations d'une trentaine d'acylcarnitines en moins de deux minutes. Chez un enfant produisant une quantité importante de corps cétoniques, on détermine que les élévations se concentrent au niveau des acylcarnitines secondaires à la cétose (acétylcarnitine et butyrylcarnitine) et on peut du même coup diminuer grandement la possibilité d'un désordre métabolique. Par contre, la présence d'autres acylcarnitines spécifiques permettra de déterminer avec une grande sensibilité et une grande spécificité la présence d'un désordre du métabolisme, et même le type précis de ce désordre. Cet outil s'avère donc très utile en génétique et est maintenant utilisé de façon courante dans l'évaluation de nombreux patients chez lesquels les cliniciens soupçonnent la présence d'un désordre métabolique.

Les applications de la spectrométrie SM/SM à la génétique ne se limitent pas à l'analyse des acylcarnitines, mais également à plusieurs autres molécules importantes telles que les acides aminés, les purines et pyrimidines, les porphyrines, l'homocystéine, les oligosaccharides et glycolipides, et l'acide méthylmalonique. Cependant, dans la plupart des laboratoires, ces autres analyses sont le plus souvent toujours effectuées à l'aide d'instruments plus classiques tels que le HPLC ou le GC/MS, et cela pour plusieurs raisons. La raison principale est que le spec-

tromètre SM/SM reste un instrument dispendieux qui ne peut se faire une place que dans les laboratoires ayant un grand volume d'analyses spécialisées. Sa rentabilité ne peut donc être justifiée que dans les grands centres de génétique ou dans les centres de taille moyenne par un partenariat avec d'autres départements pour que soient aussi effectuées des analyses de pharmacologie et d'endocrinologie. De plus, certaines limitations inhérentes à la spectrométrie SM/SM font quelquefois en sorte qu'une étape d'extraction de l'échantillon doit être effectuée, que certaines molécules thermiquement instables ne puissent être quantifiées adéquatement ou que des isomères ne puissent pas être quantifiés sans une étape préalable de chromatographie.

### DÉPISTAGE NÉONATAL

Plusieurs maladies génétiques associées à une perturbation du métabolisme se traduisent cliniquement par une période initiale plus ou moins longue où le patient ne présente pas d'atteinte sévère. Par la suite, surviennent les crises métaboliques pouvant conduire à des dommages irréversibles. Conséquemment, l'identification de ces patients dès la naissance et leur traitement présymptomatique sont susceptibles de leur permettre d'avoir un développement normal. C'est le principe de base du dépistage néonatal dont l'exemple classique est le dépistage de la phénylcétonurie. Pour effectuer ce dépistage, un échantillon de sang sur papier buvard est utilisé, ce dernier étant plus pratique et moins coûteux à prélever et à transporter qu'un échantillon de plasma. Plusieurs principes analytiques peuvent alors être utilisés pour détecter la phénylalanine ou d'autres composés. Le principal désavantage de cette approche est qu'il faut effectuer un dosage spécifique pour chaque composé à détecter, en limitant ainsi le nombre, et conséquemment, les pathologies différentes qu'un programme de dépistage néonatal peut se permettre de cibler. C'est à ce niveau qu'entre encore une fois en jeu le spectromètre SM/SM.

Ainsi, suite au développement du dosage des acylcarnitines par spectrométrie SM/SM, la méthodologie a rapidement été appliquée à la quantification simultanée des acylcarnitines et des acides aminés, en utilisant du sang séché sur papier buvard comme échantillon. Bien que certains isomères des acylcarnitines et des acides aminés ne puissent être quantifiés séparément dans les conditions analytiques utilisées pour le dépistage néonatal, ces limitations restent mineures comparativement aux forces de la spectrométrie SM/SM. Étant donné la capacité d'analyser aisément une centaine de composés en une seule injection, et de produire rapidement les résultats, il devenait possible d'augmenter considérablement le nombre de pathologies pouvant être incluses dans un programme de dépistage. Il est donc possible de détecter par spectrométrie SM/SM la phénylcétonurie, mais aussi de nombreux autres composés reliés aux désordres du métabolisme des acides aminés et de la  $\beta$ -oxydation des acides gras (8). Ainsi, avec un délai de deux minutes entre chaque injection, il est possible d'analyser les

spécimens de plus de 300 patients par jour sur un seul instrument et de quantifier dans ces spécimens des dizaines de composés permettant d'identifier plus d'une trentaine de désordres du métabolisme. Cette approche a littéralement révolutionné la façon de faire le dépistage néonatal et la majorité des programmes de dépistages néonataux utilisent déjà ou envisagent l'utilisation du spectromètre SM/SM. Encore une fois, il ne faudrait cependant pas croire que le spectromètre SM/SM est un instrument miraculeux qui règle tous les problèmes. Il existe toujours une certaine zone de chevauchement entre les distributions des concentrations normales et pathologiques de la majorité des métabolites mesurés, ce qui se traduit par la présence de faux négatifs et de faux positifs. Cette restriction n'est cependant pas spécifique à la spectrométrie SM/SM et est inhérente à la très grande majorité des tests diagnostiques utilisés en clinique.

## CONCLUSION

Le développement de la spectrométrie SM/SM a permis de faire avancer considérablement le domaine de la génétique biochimique, principalement par le dosage des différentes espèces d'acylcarnitines présentes dans une matrice complexe, mais également en révolutionnant le dépistage néonatal. À cet égard, la spectrométrie SM/SM est maintenant utilisée dans la majorité des laboratoires de dépistage néonataux aux États-Unis et occupe une place moindre, mais de plus en plus importante, dans les laboratoires de dépistage canadiens et européens. La souplesse du spectromètre SM/SM avec source d'ionisation électronique permet également son utilisation dans des centres de référence plus petits par partage de l'instrumentation pour d'autres applications, telles que les dosages d'hormones ou de médicaments et ce, en ne changeant que les paramètres de la méthode au niveau de l'instrument. Plus spécifiquement en ce qui concerne le Québec, les grands centres universitaires (CHUS, CHUM et CUSM) disposent déjà ou disposeront sous peu de spectromètres SM/SM utilisés à des fins cliniques. Bien que seul le CHUS utilise jusqu'à maintenant cet instrument pour des analyses de génétique, ces trois centres l'utiliseront également pour des analyses pharmacologiques (principalement les immunosuppresseurs) et le dosage d'hormones stéroïdiennes. Le faible niveau de purification de l'échantillon habituellement requis, la capacité à analyser un large spectre de molécules avec un minimum d'interférences et la rapidité d'analyse souvent réduite à quelques minutes par échantillon, font du spectromètre SM/SM un instrument performant et recherché. Avec la popularisation et l'évolution de cette technologie, il est probable que les coûts vont diminuer permettant à des centres de plus petite taille d'y avoir accès.

## RÉFÉRENCES

1. Alex S, Miousse D, Ponsard B. Analyse chimique : la spectrométrie de masse prend du poids. *Le Chimiste, Ordre des chimistes du Québec* 2002;15-18.
2. Griffiths WJ, Jonsson AP, Liu S, Rai DK, Wang Y. Electrospray and tandem mass spectrometry in biochemistry. *Biochem J* 2001; 355:545-61.
3. Kostianen R, Kotiaho T, Kuuranne T, Auriola S. Liquid chromatography/atmospheric pressure ionization-mass spectrometry in drug metabolism studies. *J Mass Spectrom* 2003;38:357-72.

4. Rodland KD. Proteomics and cancer diagnosis: the potential of mass spectrometry. *Clin Biochem* 2004;37:579-83.
5. <http://www.chm.bris.ac.uk/ms/theory/theory.html> (site consulté le 29 octobre 2006).
6. Niwa T. Basic theory of mass spectrometry. *Clin Chim Acta* 1995;241-242:15-71.
7. Stryer L. *Biochemistry*. 3th Edition. Library of Congress Catalog. 473-475.
8. Rashed MS. Clinical applications of tandem mass spectrometry: ten years of diagnosis for inherited metabolic diseases. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl* 2001;758:27-48.

## ABRÉVIATIONS

CHUM	Centre hospitalier de l'Université de Montréal
CHUS	Centre hospitalier de l'Université de Sherbrooke
CUSM	Centre hospitalier de santé McGill
GC/MS	chromatographie phase gazeuse/spectromètre de masse
HPLC	chromatographie liquide à haute performance
SM/SM	masse en tandem