

LA CHROMATOGRAPHIE LIQUIDE COUPLÉE À UN SPECTROMÈTRE DE MASSE EN TANDEM (LC-MS/MS) :

UNE RÉVOLUTION DANS LE LABORATOIRE DE CHIMIE CLINIQUE

CAVALIER E (1), LE GOFF C (1)

RÉSUMÉ : Les laboratoires de biologie clinique réalisent, depuis de très nombreuses années, des dosages de différentes molécules (hormones, peptides, stéroïdes,...) grâce à des méthodes analytiques utilisant des anticorps. Ces méthodes, faciles à utiliser sont, pour la plupart d'entre elles, totalement automatisables. Cependant, ces méthodes dites «immunologiques» manquent parfois de sensibilité et surtout de spécificité. Durant cette dernière décennie, la spectrométrie de masse en tandem couplée à la chromatographie liquide (LC-MS/MS) s'est de plus en plus imposée dans les laboratoires de chimie clinique comme une alternative aux immunodosages. En effet, cette technique permet de séparer et de quantifier avec précision des molécules dont la structure est proche et qui ne sont pas bien différenciées avec des immunodosages. Aussi, la sensibilité de la LC-MS/MS peut être également supérieure à celle des immunodosages. Par contre, ce type de technologie demande du matériel de pointe assez coûteux et un personnel hautement qualifié.

MOTS-CLÉS : LC-MS/MS - Immunoassay

TANDEM-MASS SPECTROMETRY COUPLED WITH LIQUID CHROMATOGRAPHY (LCMS/MS) : A REVOLUTION IN THE CLINICAL CHEMISTRY LABORATORY

SUMMARY : Manual or automated immunoassays are largely used in clinical chemistry laboratories for measuring various compounds like steroid or peptide hormones. However, these methods can lack sensibility and specificity. Hence, during this last decade, tandem-mass spectrometry coupled with liquid chromatography (LC-MS/MS) have emerged as a technique of choice to precisely quantify those molecules. However, these instruments remain quite expensive and need highly trained people.

KEYWORDS : LC-MS/MS - Immunoassay

INTRODUCTION

Les traitements dans le domaine de l'endocrinologie passent par un diagnostic précis qui, dans la plupart des cas, en plus de l'observation clinique, requiert le recours à des dosages hormonaux, que ce soit des peptides ou des stéroïdes. Le présent article retrace l'évolution des méthodes de chimie clinique qui ont permis de réaliser ces dosages hormonaux, en partant des classiques «radio-immunoassays» pour terminer par la révolution de la dernière décennie, avec l'avènement de la spectrométrie de masse couplée à la chromatographie liquide (LC-MS/MS).

LES PREMIERS DOSAGES À L'AIDE D'ANTICORPS : LES TEMPS HÉROÏQUES

Une des tâches dévolues au laboratoire de Chimie clinique est le dosage et l'interprétation

d'hormones présentant très souvent de très faibles concentrations et une très forte analogie de structure. Rosalyn Yalow et Solomon Berson ont reçu le prix Nobel, en 1977, pour leurs travaux pionniers sur les premiers dosages de peptides par radio-immunoassay (RIA). Le tout premier dosage qu'ils mirent au point fut celui de l'insuline (1) et le second fut celui de la parathormone (2). L'apport des résultats de ces dosages fut une véritable révolution pour le diagnostic des pathologies, pour l'amélioration de la prise en charge des patients et cela permit d'améliorer les connaissances en physiopathologie. Néanmoins, les manipulations étaient laborieuses. Il fallait tout d'abord obtenir un anticorps en immunisant des animaux contre l'antigène recherché (un peptide ou un stéroïde) et sélectionner l'animal qui produisait l'anticorps le plus spécifique. Le principe du dosage en lui-même reposait sur une compétition, pour cet anticorps, entre l'antigène marqué à l'iode 125 et l'antigène présent dans le sérum du patient ou au tritium. A l'époque, chaque laboratoire produisait ses propres anticorps, et les résultats obtenus par un laboratoire n'étaient pas nécessairement transposables à ceux obtenus par un autre laboratoire. Néanmoins, par souci de facilité, et pour améliorer la consistance des résultats, des sociétés spécialisées dans la production et la commercialisation de kits de dosage ont vu le jour et ont permis une meilleure accessibilité à ces immunodosages dans le monde. Ces dosages, qu'ils utilisent un seul

(1) Service de Chimie clinique, CHU Liège, ULiège, Belgique.

anticorps et une compétition comme décrit ci-dessus, ou bien deux anticorps (méthode dite «sandwich») pour l'antigène recherché, nécessitaient de longues périodes d'incubation afin d'atteindre l'équilibre parfait entre les anticorps et les antigènes : pas question de demander un dosage en «urgence», il fallait souvent une semaine complète pour avoir un résultat... Cela étant dit, les résultats obtenus par une méthode n'étaient toujours pas transposables à ceux obtenus par une autre, car il n'y avait toujours pas de standardisation de ces dosages.

L'AUTOMATISATION DES IMMUNODOSAGES

La seconde révolution dans les immunodosages eut lieu au début des années 90, avec la propagation de méthodes dites «froides» (qui n'utilisaient plus de l'iode radioactif) sur des automates. Ces méthodes, largement utilisées aujourd'hui dans tous les laboratoires du monde, présentent une meilleure reproductibilité que les méthodes dites «manuelles», qu'elles soient isotopiques ou non. Elles permettent, en outre, d'obtenir un résultat très rapidement (de 20 à 40 minutes après que l'échantillon ait été pipeté par l'instrument), mais elles ont le grand désavantage, souvent oublié, de ne plus jamais atteindre l'équilibre entre les anticorps et les substances à doser, ce qui peut diminuer leur sensibilité et/ou leur spécificité. Le problème de la standardisation (ou de l'harmonisation) des méthodes, est toujours d'actualité. Aujourd'hui encore, les résultats produits par des automates commercialisés par différentes firmes comme Roche, Abbott, Siemens (ou d'autres) ne sont pas transposables et peuvent même aller du simple au double, ce qui ne va pas sans créer de la confusion pour les cliniciens qui suivent des patients qui vont se faire prélever dans des laboratoires différents.

LA LC-MS/MS : UNE TECHNIQUE RÉVOLUTIONNAIRE

La troisième révolution dans les laboratoires de chimie clinique a réellement commencé au tout début de la décennie écoulée. Il s'agit de l'émergence de la spectrométrie de masse couplée à de la chromatographie liquide (LC-MS/MS) pour le dosage des stéroïdes et des peptides. De façon très schématique, un spectromètre de masse fonctionne comme une balance. Un extrait préparé de l'échantillon du patient est passé dans un chromatographe liquide à

haute performance afin de séparer les différents constituants qui arrivent ensuite dans une cellule de collision pour les «fragmenter». L'analyseur sélectionne le constituant d'intérêt via sa masse et sa charge et le fractionne à nouveau. Ces nouvelles fractions, appelées «transitions», ont une masse et une charge spécifiques, ce qui permet de les qualifier et de les quantifier. La LC-MS/MS est ainsi une méthode qui allie sensibilité et spécificité et qui, surtout, est indépendante d'anticorps plus ou moins spécifiques de la substance à doser (3, 4). Si ces méthodes étaient déjà largement utilisées dans les laboratoires de recherche et de toxicologie de pointe, leur utilisation en chimie clinique n'était encore que balbutiante en 2011, lorsque nous avons décidé de nous équiper avec notre première LC-MS/MS.

En 2020, le service de Chimie clinique du CHU de Liège disposera de six de ces instruments et nous sommes devenus un laboratoire clinique de référence en LC-MS/MS, au niveau régional, national et international. Cette technique nécessite, cependant, un personnel très qualifié pour, à la fois préparer les échantillons (souvent manuellement), développer des méthodes, les valider, les faire accréditer, gérer des instruments de haute sophistication et interpréter les résultats, qui sortent sous forme de «pics» à quantifier. Enfin, contrairement à la plupart des immunodosages automatisés gérés par des robots, la LC-MS/MS nécessite une préparation de l'échantillon consistant en une purification, suivie d'une extraction, avant l'injection de l'échantillon dans le chromatographe liquide.

Pour le moment, il existe très peu de kits «ready to use» commercialement disponibles, contrairement aux kits d'immunodosages. Ces kits peuvent être «montés» sur des LC-MS/MS en quelques semaines et ne nécessitent pas – *a priori* – une grande expertise pour pouvoir être utilisés. Les choses sont bien différentes avec les méthodes dites «maison» ou «home-made» qui restent, de loin, les plus utilisées. Pour ces méthodes «maison», comme on part d'une feuille blanche, il convient d'abord de mettre au point la partie MS qui consistera à infuser (injecter) la molécule pure afin de la scanner et sélectionner les transitions les plus adaptées. Ensuite, les paramètres de la chromatographie liquide devront être mis au point afin d'obtenir un pic avec une intensité satisfaisante et, surtout, un temps de rétention où il n'y aura que le composé d'intérêt qui sortira de la machine. Ensuite, quand tout cela est mis au point, on doit travailler sur la préparation d'échantillon («sample prep») qui reste l'étape la plus difficile lors des mises au point. Cette dernière variera en fonction des

propriétés physico-chimiques de la molécule et nécessitera plusieurs tentatives avant d'avoir une solution satisfaisante. Lorsque la méthode est finalement mise au point, une validation analytique devra être réalisée de façon très scrupuleuse afin de répondre aux recommandations fournies par des instances internationales (5). Enfin, il restera l'épineux problème de l'établissement des valeurs de référence. En effet, si les fournisseurs de kits d'immunodosage mettent des valeurs de référence à disposition des laboratoires, il faudra les établir soi-même lorsque la méthode «maison» sera validée. Cet établissement des valeurs de référence est une étape difficile car elle nécessite le recrutement de 120 sujets sains par catégorie d'âge ou de sexe... (6). Le développement complet d'une méthode peut ainsi prendre beaucoup de temps, allant parfois de quelques semaines à plus d'un an !

Par contre, la LC-MS/MS présente beaucoup d'avantages par rapport aux immunodosages. Outre la sensibilité et la spécificité plus importantes, comme déjà évoqué, cette technique permet de multiplexer les analytes proches. Par exemple, on peut doser en même temps un «panel» de stéroïdes, ce qui présente énormément d'avantages dans les cas cliniques complexes. C'est également le cas chez les enfants pour qui, non seulement, les concentrations attendues sont parfois tellement basses que l'utilisation d'une méthode plus sensible est indispensable, mais aussi pour limiter le volume de sang nécessaire pour le dosage. Aussi, cette technique permet de quantifier des molécules pour lesquelles il n'existe pas de trousses immunologiques valables sur le marché (par exemple, nous avons récemment mis au point le dosage du glucagon). Enfin, ces techniques étant indépendantes des anticorps, il est tout à fait possible de les standardiser sur des étalons internationaux (quand ils existent), sans avoir à craindre des problèmes de réactions croisées. Ainsi, théoriquement, le dosage d'une hormone en LC-MS/MS par un laboratoire X donnera strictement le même résultat que s'il est dosé par le laboratoire Y.

CONCLUSION

Nous savons exactement ce que nous dosons, nous le dosons avec précision et nous pouvons le doser avec une haute spécificité, dans des concentrations très basses. Tous les laboratoires de chimie clinique ne peuvent pas – ou ne pourront pas – s'équiper de techniques de si haute technologie dans les prochaines années à venir, au vu du coût de tels instruments et de la haute qualification du personnel nécessaire. Cependant, un tout premier instrument totalement automatisé a récemment vu le jour pour doser la 25-hydroxy vitamine D (7). Cela sera peut-être le premier pas vers une nouvelle évolution en chimie clinique.

BIBLIOGRAPHIE

1. Yalow RS, Berson SA. Immunoassay of endogenous plasma insulin in man. *J Clin Invest* 1960;**39**:1157-75.
2. Berson SA, Yalow RS, Aurbach GD, et al. Immunoassay of bovine and human parathyroid hormone. *Proc Natl Acad Sci* 1963;**49**:613-7.
3. Carvalho VM. The coming of age of liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry in the endocrinology laboratory. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 2012;**883-884**:50-8.
4. Wu AHB, French D. Implementation of liquid chromatography/mass spectrometry into the clinical laboratory. *Clin Chim Acta* 2013;**420**:4-10.
5. Lynch KL. CLSI C62-A: a new standard for clinical mass spectrometry. *Clin Chem* 2016;**62**:24-9.
6. Solberg HE. The IFCC recommendation on estimation of reference intervals. *Clin Chem Lab Med* 2004;**42**:710-4.
7. Benton SC, Tetteh GK, Needham SJ, et al. Evaluation of the 25-hydroxy vitamin D assay on a fully automated liquid chromatography mass spectrometry system, the Thermo Scientific Cascadion SM Clinical Analyzer with the Cascadion 25-hydroxy vitamin D assay in a routine clinical laboratory. *Clin Chem Lab Med* 2020;**58**:1010-7.

Les demandes de tirés à part doivent être adressées au Dr E. Cavalier, Service de Chimie clinique, CHU Liège, Belgique.
Email : Etienne.Cavalier@chuliege.be