

Apports de La spectrométrie de masse

Pour l'étude des biomarqueurs de dose efficace et d'effet



Dr Jean-Luc Ravanat

Laboratoire Lésions des Acides Nucléiques, Inac/SCIB UMR E3 CEA-UJF, CEA Grenoble, 17 rue des martyrs 38054 Grenoble cedex 9

jravanat@cea.fr

Jean-Luc Ravanat, CEA-Grenoble

Colloque HAP, Montréal 2-3 sept 2008

La spectrométrie de masse



- Introduction
 - Evolution récente
- Principes
 - Ionisation
 - MS et MS/MS
- Avantages
 - sensibilité
 - spécificité
- Exemples d'application
- Evolution future ?

Jean-Luc Ravanat, CEA-Grenoble

Colloque HAP, Montréal 2-3 sept 2008

Introduction : La spectrométrie de masse



- La spectrométrie de masse est une technique d'analyse ancienne, dont les fondements ont été posés à la fin du XIXème siècle
- Les premières analyses de spectrométrie de masse ont été décrites en 1912 par Joseph J. Thompson.

Applications à la biologie : **difficulté**

- Analyse des ions sous vide (limite applications)

-Développement des méthodes d'ionisation douce : **Electrospray** (à pression atmosphérique)

ELECTROSPRAY INTERFACE FOR LIQUID CHROMATOGRAPHS AND MASS SPECTROMETERS
WHITEHOUSE CM, DREYER RN, YAMASHITA M, et al.
ANALYTICAL CHEMISTRY 57 (3): 675-679 1985

John B. Fenn, prix Nobel chimie en 2002.

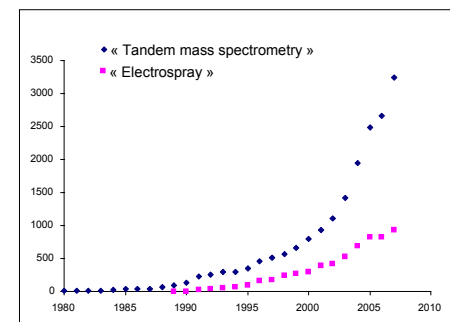
Jean-Luc Ravanat, CEA-Grenoble

Colloque HAP, Montréal 2-3 sept 2008

La spectrométrie de masse en mode tandem : Introduction



Nombre d'articles publiés / année



Source : ISI web of knowledge
<http://apps.isiknowledge.com/>

Jean-Luc Ravanat, CEA-Grenoble

Colloque HAP, Montréal 2-3 sept 2008

La spectrométrie de masse : principes



Spectromètre de masse :

- Source ionisation
- Analyseur
- Détecteur
- Traitement des données

Utilisation

- Détermination de poids moléculaires
- Caractérisation

Utilisation de la spectrométrie de masse comme un détecteur

- Permet « d'isoler » des molécules (ions) de m/z déterminé
- Bonne sensibilité (si ionisation efficace)
- Très bonne spécificité (MS/MS)
- Versatilité

Jean-Luc Ravanat, CEA-Grenoble

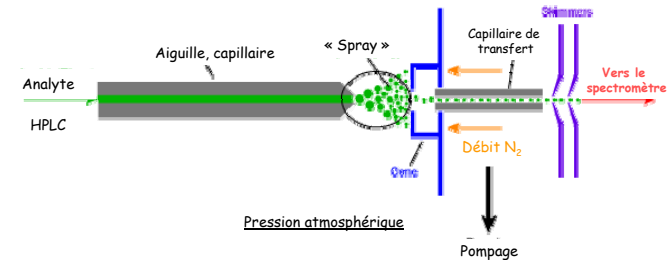
Colloque HAP, Montréal 2-3 sept 2008

La spectrométrie de masse : l'ionisation



Source d'ionisation : Ioniser les molécules d'intérêt
Éliminer les neutres (solvant)

Ionisation douce à pression atmosphérique : l'électrospray

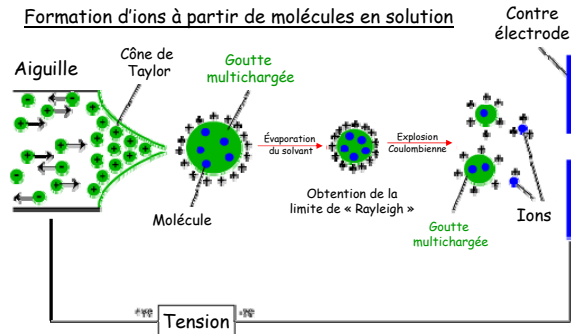


Jean-Luc Ravanat, CEA-Grenoble

Colloque HAP, Montréal 2-3 sept 2008

Ionisation électrospray : principes

Formation d'ions à partir de molécules en solution



Avantages : bons rendements d'ionisation, peu de fragmentation

Limitations : formation d'entités multichargées, adduits

Jean-Luc Ravanat, CEA-Grenoble

Colloque HAP, Montréal 2-3 sept 2008

Spectrométrie de masse : les analyseurs



Séparation des molécules en fonction du rapport m/z
(isoler ou détecter individuellement des ions)

Secteur magnétique

- déviation d'un ion dans un champ magnétique

Temps de vol (Time of flight: ToF)

- temps mis par un ion pour parcourir une distance

Quadripôle & trappe d'ions

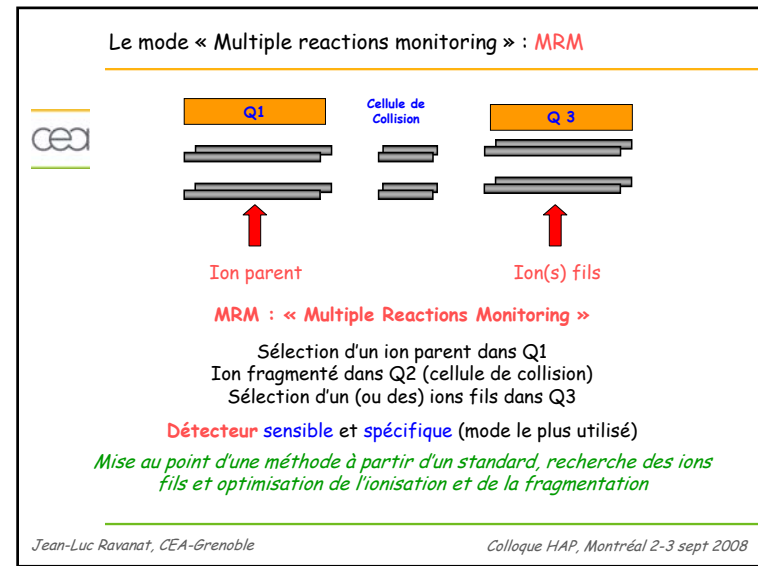
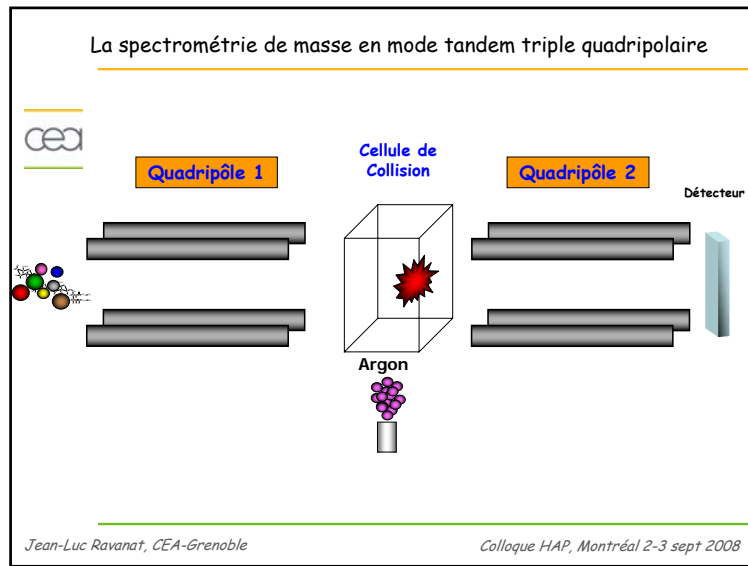
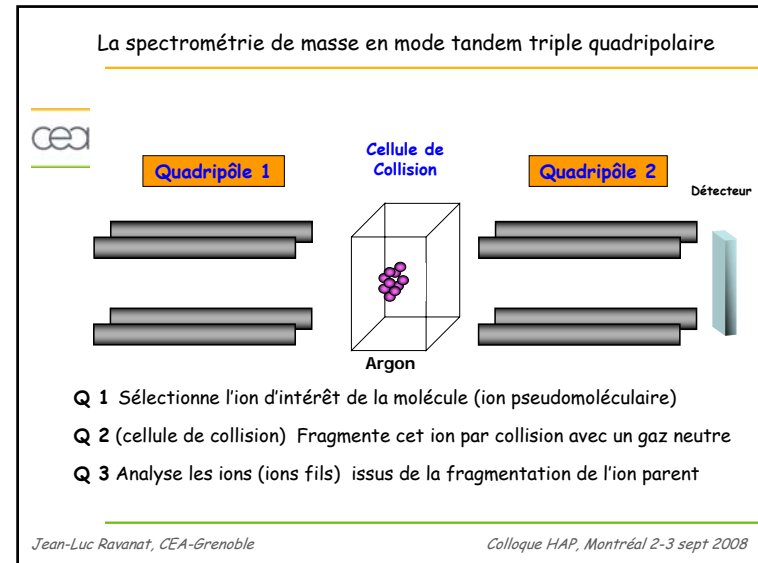
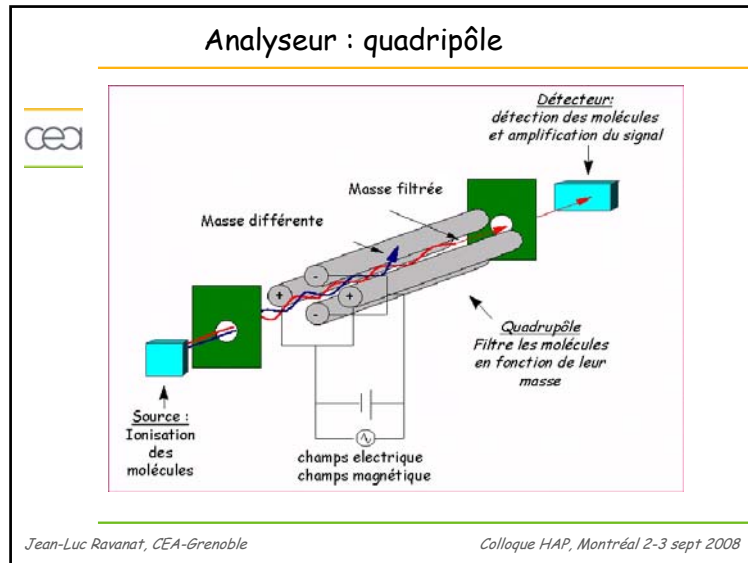
- Filtre/piège des ions dans un champs électromagnétique

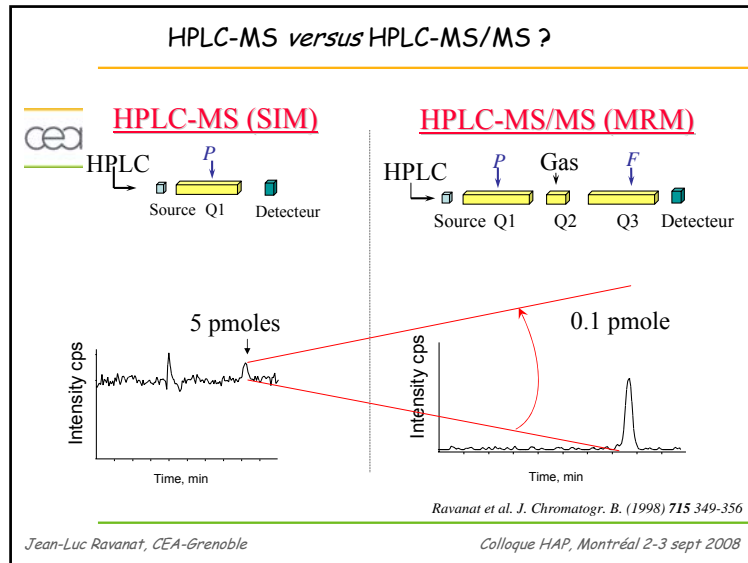
Possibilité de combiner plusieurs analyseurs

- MS/MS tripe quadripôlaire
- Q / ToF

Jean-Luc Ravanat, CEA-Grenoble

Colloque HAP, Montréal 2-3 sept 2008





HPLC-MS versus HPLC-MS/MS ?

MS/MS plus grande sensibilité !

Sensibilité = Signal/Noise (S/N)

- MRM_{signal} < SIM_{signal}
- MRM_{noise} << SIM_{noise}

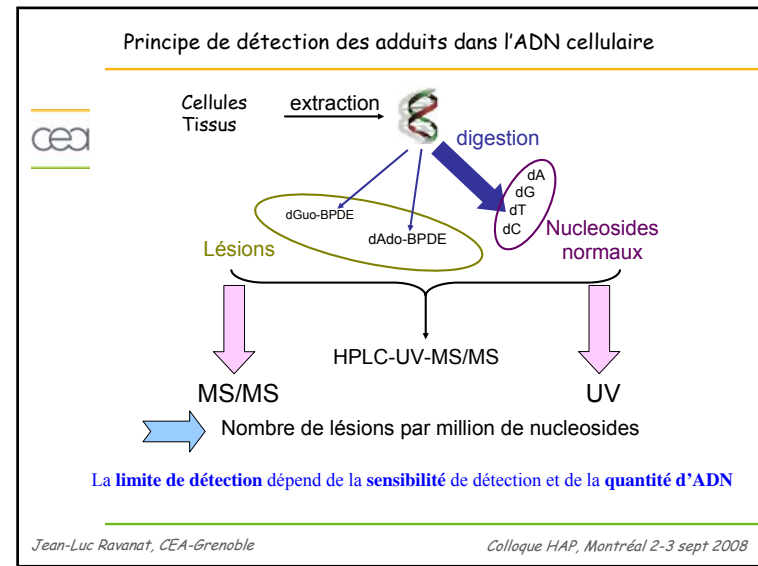
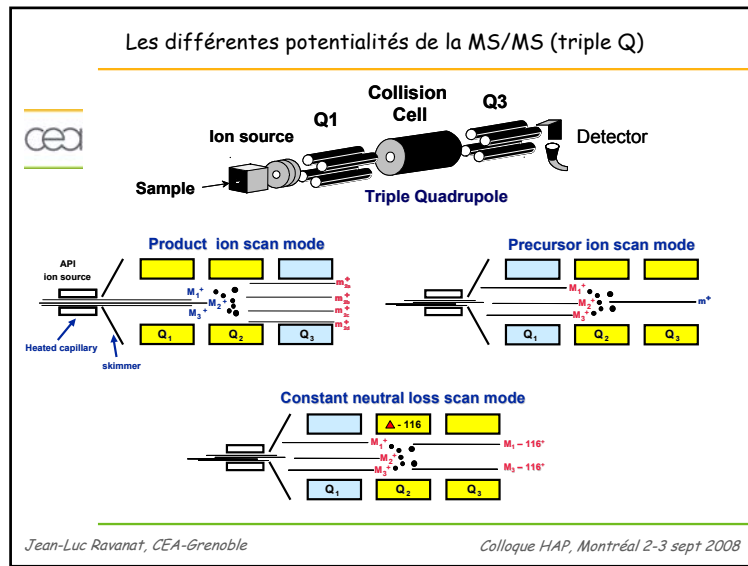
Donc MRM_{sens} >> SIM_{sens}

MS/MS plus **sensible** que MS
molécule & matrice dépendant

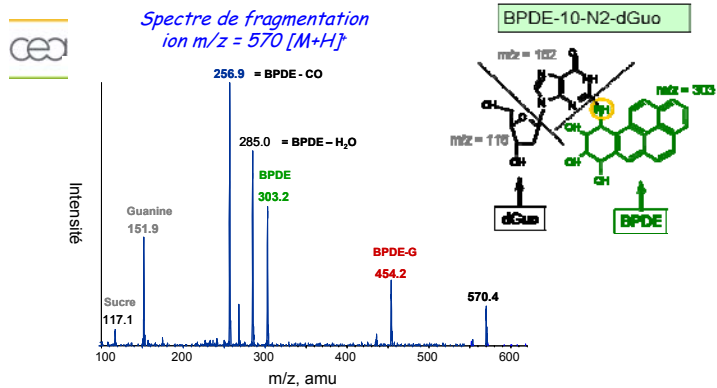
Augmentation de la **spécificité**
possibilité d'utiliser plusieurs transitions (plusieurs ions fils)

Jean-Luc Ravanat, CEA-Grenoble

Colloque HAP, Montréal 2-3 sept 2008



Application : détection de l'adduit BPDE-N₂-dGuo (PM 569)

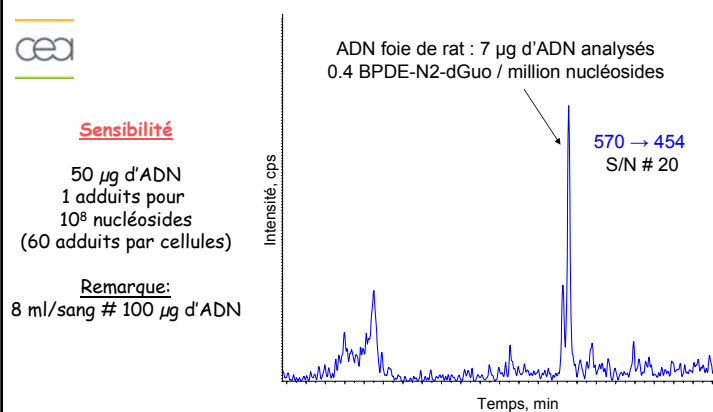


Transitions (MRM) utilisées : 570 → 454, 570 → 285 et 570 → 257

Jean-Luc Ravanat, CEA-Grenoble

Colloque HAP, Montréal 2-3 sept 2008

Application : Détection de BPDE-N₂-dGuo dans ADN de rats traités



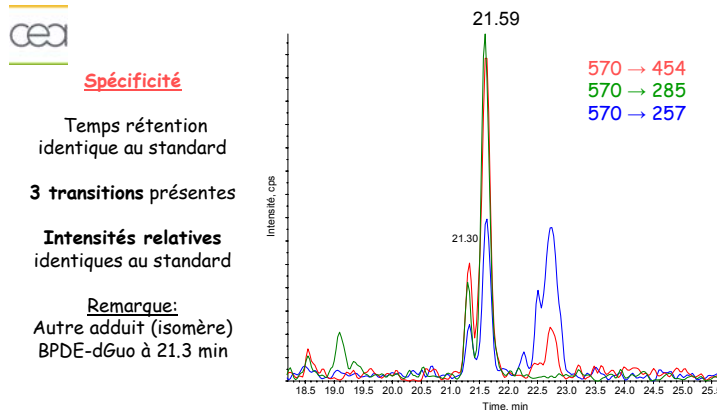
Sensibilité
50 µg d'ADN
1 adduits pour
10⁸ nucléosides
(60 adduits par cellules)

Remarque:
8 ml/sang # 100 µg d'ADN

Jean-Luc Ravanat, CEA-Grenoble

Colloque HAP, Montréal 2-3 sept 2008

Application : Détection de BPDE-N₂-dGuo dans ADN de rats traités



Spécificité

Temps rétention
identique au standard

3 transitions présentes

Intensités relatives
identiques au standard

Remarque:
Autre adduit (isomère)
BPDE-dGuo à 21.3 min

Jean-Luc Ravanat, CEA-Grenoble

Colloque HAP, Montréal 2-3 sept 2008

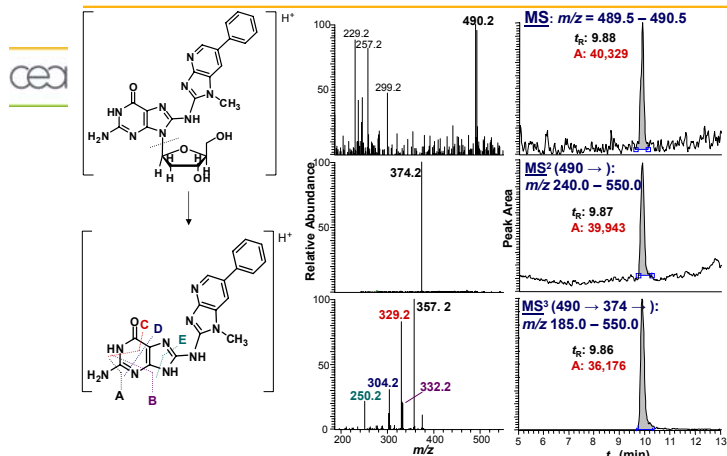
Evolution (améliorations) futures ?

- Etudes chez l'homme : augmentation de la sensibilité**
- Mesure dans les lymphocytes circulants
 - Mesure dans l'urine (reflet réparation)
- Augmenter d'un facteur 100 la sensibilité**
- L'étape limitante : l'ionisation**
- augmenter efficacité des méthodes existantes
 - augmenter la « transmission » des ions
 - nouvelles méthodes
- Laser pour HAP ?**
- Augmenter la résolution (augmente la spécificité)**
- si résolution ↑ bruit de fond ↓
 - possibilité d'utiliser la MS simple ?
- Versatilité : détection simultanée de plusieurs molécules**

Jean-Luc Ravanat, CEA-Grenoble

Colloque HAP, Montréal 2-3 sept 2008

Détection de dG-C8-PhIP sur trappe d'ions linéaire (L TQ, R. Turesky)



Jean-Luc Ravanat, CEA-Grenoble

Colloque HAP, Montréal 2-3 sept 2008

Détection de molécules apolaires : Pb ionisation

- ESI ou APCI peu efficace pour molécules aromatiques
- Problème d'ionisation limite la sensibilité

Atmospheric-pressure laser ionization: a novel ionization method for liquid chromatography/mass spectrometry

Constapel M, Schellentrager M, Schmitz OJ, Gab S, Brockmann KJ, Giese R, Benter T
RAPID COMMUNICATIONS IN MASS SPECTROMETRY (2005) 19, 326-336.

We report on the development of a new laser-ionization (LI) source operating at atmospheric pressure (AP) for liquid chromatography/mass spectrometry (LC/MS) applications. APLI is introduced as a powerful addition to existing AP ionization techniques, in particular atmospheric-pressure chemical ionization (APCI), electrospray ionization (ESI), and atmospheric pressure photoionization (APPI). Replacing the one-step VUV approach in APPI with step-wise two-photon ionization strongly enhances the selectivity of the ionization process. Furthermore, the photon flux during an ionization event is drastically increased over that of APPI, leading to very low detection limits. In addition, the APLI mechanism generally operates primarily directly on the analyte. This allows for very efficient ionization even of non-polar compounds such as polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs). The APLI source was characterized with a MicroMass Q-ToF Ultima II analyzer. Both the effluent of an HPLC column containing a number of PAHs (benzo[a]pyrene, fluoranthene, anthracene, fluorene) and samples from direct syringe injection were analyzed with respect to selectivity and sensitivity of the overall system. The liquid phase was vaporized by a conventional APCI inlet (AP probe) with the corona needle removed. Ionization was performed through selective resonance-enhanced multi-photon ionization schemes using a high-repetition-rate fixed-frequency excimer laser operating at 248 nm. Detection limits well within the low-fmol regime are readily obtained for various aromatic hydrocarbons that exhibit long-lived electronic states at the energy level of the first photon. Only molecular ions are generated at the low laser fluxes employed (similar to 1 MW/cm²). The design and performance of the laser-ionization source are presented along with results of the analysis of aromatic hydrocarbons.

Jean-Luc Ravanat, CEA-Grenoble

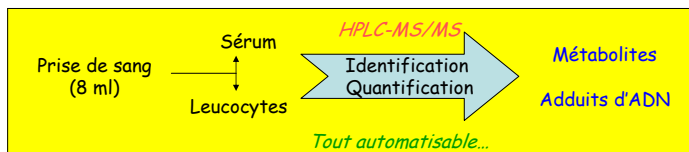
Colloque HAP, Montréal 2-3 sept 2008

Analyse de Biomarqueurs : une routine dans quelques années ?

Development of the adductome approach to detect DNA damage in humans

Kanaly RA, Hanaoka T, Sugimura H, et al.
ANTIOXIDANTS & REDOX SIGNALING (2006) 8, 993-1001.

The development of new strategies designed to detect DNA damage caused by oxidative stress and other means may advance our understanding of the roles of such types of damage in the etiology of cancers, in aging processes, and as biomarkers of exposure. A DNA adduct detection method that uses liquid chromatography coupled with electrospray ionization tandem mass spectrometry (LC/ESI-MS/MS) to detect multiple DNA adducts in human lung tissue is reported herein. This adductome analysis strategy is designed to detect the neutral loss of 2'-deoxyribose from positively ionized 2'-deoxynucleoside adducts in multiple reaction ion monitoring mode (MRM) transmitting the $[M + H]^+ \rightarrow [M + H - 116]^+$ transition over a total of 374 transitions in the mass range from m/z 228.8 to m/z 602.8. Data analysis is optimized and coupled with a comprehensive manual screening process designed to minimize the number of artifactual adducts appearing in the final analysis. In the final analysis, putative adducts were organized into an adductome map and unambiguous confirmation of selected oxidative adducts were made by stable isotope dilution and comparison to authentic standards. The future applications of this method are discussed.



Jean-Luc Ravanat, CEA-Grenoble

Colloque HAP, Montréal 2-3 sept 2008

La détection MS/MS un simple détecteur couplé à l'HPLC

Appareils de « palliase »
interface conviviale
accessible aux non-
spécialistes

Avantages:

- Spécificité
- Sensibilité
- Robustesse
- Précision
- Automatisable

Inconvénient

- Coût (# 350 k€, 500 k\$)

Nécessité

- Préparation des standards
- Solutions calibrées
- Possibilité: standard internes enrichis isotopiquement.



Jean-Luc Ravanat, CEA-Grenoble

Colloque HAP, Montréal 2-3 sept 2008