

MAXIM MAHEUX

**STRATÉGIES ANALYTIQUES PAR CHROMATOGRAPHIE
LIQUIDE AVEC DÉTECTION EN SPECTROMÉTRIE DE
MASSE AFIN D'ÉVALUER L'ACTIVITÉ DE NEUF
ENZYMES DU CYTOCHROME P450**

Mémoire présenté
à la Faculté des études supérieures et postdoctorales de l'Université Laval
dans le cadre du programme de maîtrise en chimie
pour l'obtention du grade de Maître ès Sciences (M.Sc.)

DÉPARTEMENT DE CHIMIE
FACULTÉ DES SCIENCES ET DE GÉNIE
UNIVERSITÉ LAVAL
QUÉBEC

2012

Résumé

Durant les dernières décennies, de nombreux cas d'interactions pharmacocinétiques drogue-droque ont été répertoriés, menant parfois à des pathologies sérieuses et permanentes. Pour l'industrie pharmaceutique, il s'est alors avéré essentiel de bien caractériser l'activité métabolique de composés en phase clinique. Un des outils développé et utilisé en première ligne lors de la caractérisation des voies impliquées dans la métabolisation d'une drogue est l'essai *in-vitro* du cytochrome P450. Cet essai, utilisant une préparation hépatique, permet entre autres d'identifier la ou les enzymes responsables lors de la biotransformation d'un médicament.

Parmi les différentes techniques d'analyse impliquées lors de la quantification de l'activité des enzymes du cytochrome P450, la chromatographie liquide avec détection en spectrométrie de masse demeure certes la plus utilisée et la mieux documentée. Toutefois, une grande diversité de paramètres d'analyse recensés dans la littérature rend la tâche ardue à l'analyste non aguerri. De plus, aucune méthode simple et standardisée, permettant d'évaluer l'activité de l'ensemble des neuf enzymes responsables de la métabolisation de la majorité des médicaments, n'est répertoriée.

Dans cette optique, l'objectif du présent projet de maîtrise consistait au développement de stratégies analytiques en chromatographie liquide avec détection par spectrométrie de masse, pouvant être appliquées dans n'importe quel laboratoire possédant des instruments d'ancienne ou de nouvelle génération. Pour ce faire, une séparation tant en chromatographie liquide haute performance (HPLC) qu'en chromatographie liquide ultra performance (UPLC) a été mise au point. De surcroît, l'utilisation de spectromètres de masse à simple (MS) ou à triple quadripôle (MS/MS) a été étudiée, dans le but de quantifier les métabolites des différents essais.

Abstract

In recent decades, many cases of drug-drug pharmacokinetic interactions have been reported, sometimes leading to serious and permanent diseases. For the pharmaceutical industry, it has been essential to characterize the metabolic activity of compounds in clinical phase. One of the tools developed and used on the front line in the characterization of metabolism pathways of a drug is in-vitro cytochrome P450 assays. These assays, using hepatic microsomal preparations, allow the identification of the enzymes involved in the biotransformation of a drug.

Among the different analytical techniques available for the quantification of cytochrome P450 enzyme activities, liquid chromatography coupled with mass spectrometry detection remains certainly the most widely used and well-documented. However, a variety of analysis parameters identified in the literature makes it difficult for the inexperienced analyst. In addition, no simple and standardized method to assess the activity of all nine enzymes responsible for drug metabolism is listed.

From this perspective, the objective of this master was to develop analytical strategies by liquid chromatography coupled with mass spectrometry detection that can be applied in any laboratory using old or new generation instruments. To do this, a separation on both high performance liquid chromatography (HPLC) and ultra performance liquid chromatography (UPLC) instruments has been developed. In addition, the use of a simple quadrupole mass spectrometer (MS) and a triple quadrupole (MS / MS) was studied in order to quantify the metabolites of the various assays.

Avant-propos

Premièrement, je tiens à remercier le professeur Denis Boudreau de m'avoir donné la chance de réaliser de mes études graduées sous sa tutelle. La pleine confiance accordée de sa part, quant au contexte de mes études a été grandement appréciée. Sincèrement M. Boudreau, un gros merci !

Deuxièmement, je veux remercier l'équipe de TransBIOTech pour son support durant mon projet de maîtrise. Sans TransBIOTech, je n'aurais pu réaliser mes études graduées, puisque les instruments utilisés lors du développement des méthodes analytiques ont été gracieusement mis à ma disposition. Un merci plus spécial à Denis Beaumont, qui a cru en mon projet et m'a supporté à chaque étape, afin de mener à bien mes études. Mes plus profonds remerciements à un collègue et ami personnel, Claude-Paul Lafrance, qui est toujours là pour m'appuyer dans mon travail quotidien. Je tiens aussi à remercier Esther Millette et Johanie Lépine, deux collègues qui m'ont transmis leur savoir et m'ont appris beaucoup en biochimie et en pharmacologie. Je ne peux passer outre le travail de Julie De Grandmont, une technicienne avec qui j'ai beaucoup d'affinités professionnelles et personnelles. Merci à tous de votre support !

Finalement, je tiens à remercier mes proches pour leur appui. Merci à mes parents et à mon frère, je vous aime fort. Des remerciements spéciaux à Marie-Hélène, pour croire en moi comme tu le fais et m'aider à avancer, et à Dave, pour ton support quotidien.

*Aux membres de ma famille, pour leur appui quotidien,
à Denis, pour m'avoir fourni tous les moyens nécessaires à la réalisation de ce projet,
et, à Marie-Hélène et Claude-Paul, pour croire en moi plus que moi-même.*

Table des matières

INDEX DES FIGURES.....	IX
INDEX DES TABLEAUX.....	XI
INDEX DES ÉQUATIONS	XII
INDEX DES SCHÉMAS.....	XIII
INDEX DES SYMBOLES ET DES ABRÉVIATIONS.....	XIV
CHAPITRE 1 : MISE EN CONTEXTE.....	1
CHAPITRE 2 : PRINCIPES THÉORIQUES	4
1 LA CHROMATOGRAPHIE LIQUIDE	4
1.1 LES BALBUTIEMENTS DU GPC VERS LE HPLC.....	4
1.2 ÉVOLUTION DES PARTICULES DE SILICE ET DES COLONNES DE HPLC VERS CELLES D'UPLC ..	6
1.3 ACRONYMES, PHASES MOBILES ET PHASES STATIONNAIRES UTILISÉS EN CHROMATOGRAPHIE LIQUIDE	8
1.4 CONFIGURATION DES INSTRUMENTS EN CHROMATOGRAPHIE LIQUIDE	17
1.4.1 SYSTÈMES DE POMPAGE EN CHROMATOGRAPHIE LIQUIDE	17
1.4.1.1 SYSTÈME EN MODE ISOCRATIQUE.....	17
1.4.1.2 SYSTÈME EN MODE GRADIENT.....	18
1.4.1.3 SYSTÈME AVEC POMPE QUATERNAIRE ET MÉLANGE À BASSE PRESSION	18
1.4.1.4 SYSTÈME AVEC POMPE BINAIRE ET MÉLANGE À HAUTE PRESSION.....	19
1.4.1.5 TYPES DE POMPE	19
1.4.1.6 RÉGULATION DU DÉBIT	20
1.4.2 SYSTÈMES D'INJECTION	21
1.4.3 SYSTÈMES DE DÉTECTION.....	23
1.4.3.1 DÉTECTEUR UV-VISIBLE.....	23
1.4.3.2 DÉTECTEUR À INDICE DE RÉFRACTION.....	24
1.4.3.3 DÉTECTEUR À FLUORESCENCE	24
1.4.3.4 DÉTECTEUR À DIFFUSION DE LUMIÈRE ET AUTRES TYPES DE DÉTECTION	25
1.4.3.5 DÉTECTION PAR SPECTROMÉTRIE DE MASSE	26
1.5 PARAMÈTRES DE CHROMATOGRAPHIE.....	26
1.6 ÉQUATION DE VAN DEEMTER.....	29
2 LA SPECTROMÉTRIE DE MASSE	36
2.1 HISTORIQUE DE LA SPECTROMÉTRIE DE MASSE ET DE SON INTERFAÇAGE AVEC LA CHROMATOGRAPHIE LIQUIDE	36

2.2	LES PRINCIPES D'IONISATION EN SPECTROMÉTRIE DE MASSE.....	40
2.4.1	L'impact électronique	40
2.4.2	L'ionisation chimique.....	41
2.4.3	L'ionisation à pression atmosphérique (API-ES, APCI et APPI).....	42
2.3	LA SÉLECTION DE MASSE.....	45
2.4.1	La spectrométrie de masse à analyseur simple.....	45
2.4.2	La spectrométrie de masse tandem.....	49
2.4.3	Les détecteurs.....	54
3	LE CYTOCHROME P450	55
3.1	INTERACTIONS ENTRE MOLÉCULES BIOACTIVES.....	57
CHAPITRE 3 : EXPÉRIMENTATION.....		60
1	SUBSTRATS ET STANDARDS INTERNES UTILISÉS POUR LE DÉVELOPPEMENT	60
2	PARAMÈTRES DE SÉPARATION ET DE DÉTECTION SÉLECTIONNÉS	61
2.1	STRATÉGIE HPLC-MS.....	62
2.1.1	Instrumentation.....	62
2.2.2	Conditions chromatographiques	62
2.2.3	Détection en spectrométrie simple quadripôle.....	63
2.2	STRATÉGIE UPLC-MS/MS	64
2.2.1	Instrumentation.....	64
2.2.2	Conditions chromatographiques	655
2.2.3	Détection en spectrométrie de masse tandem	655
3	PRÉPARATION DES SUBSTRATS ET DES STANDARDS.....	677
4	CONDITIONS D'INCUBATION	688
5	CONTRÔLE ET VALIDATION DE LA MÉTHODE	699
CHAPITRE 4 : RÉSULTATS ET DISCUSSION.....		71
1	CHOIX DES SUBSTRATS ET DES STANDARDS INTERNES	71
2	PARAMÈTRES DE SÉPARATION ET DE DÉTECTION.....	75
2.1	PERFORMANCES CHROMATOGRAPHIQUES.....	75
2.2	SPECTROMÉTRIE DE MASSE.....	79
3	OPTIMISATION DES CONDITIONS D'ARRÊT	82
4	VALIDATION ET CONTRÔLE DE LA MÉTHODE	85
CHAPITRE 5 : SYNTHÈSE ET CONCLUSIONS.....		88

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES	91
RÉFÉRENCES DES FIGURES	95

Index des figures

Figure 1 : Structure d'une particule BEH.....	15
Figure 2 : Structure macroporeuse (gauche) et mésoporeuse (droite) d'une colonne monolithique	16
Figure 3 : Structure d'un polymère polystyrène-divinylbenzène	17
Figure 4 : Configuration instrumentale d'un système de chromatographie liquide isocratique	18
Figure 5 : Configuration d'un système quaternaire.....	18
Figure 6 : Configuration d'un système binaire à haute pression	19
Figure 7 : Schéma d'une pompe avec mélange à basse pression.....	20
Figure 8 : Schéma d'une pompe binaire avec mélange à haute pression.....	20
Figure 9 : Schéma d'un <i>pulse damper</i> à diaphragme	21
Figure 10 : Schéma de fonctionnement d'une boucle d'échantillonnage	21
Figure 11 : Principe de fonctionnement d'un injecteur sans boucle d'échantillonnage ..	22
Figure 12 : Schéma des composantes d'un détecteur UV-visible à filtre	23
Figure 13 : Composantes d'un détecteur à barrette de diodes.....	24
Figure 14 : Configuration d'un détecteur en fluorescence	25
Figure 15 : Fonction H obtenue par la combinaison des termes A, B et C de l'équation de Van Deemter.....	30
Figure 16 : Différences entre les chemins empruntés par des analytes de même nature	31
Figure 17 : Comparaison des temps d'analyse en HPLC et en UPLC pour des résolutions identiques	35
Figure 18 : Comparaison des courbes de Van Deemter pour différentes tailles de particules	35
Figure 19 : Plaque photographique représentant les premiers travaux enregistrés sur spectrogramme de masse	37
Figure 20 : Chromatographe gazeux construit à Dow Chemical en 1955.....	38
Figure 21 : GC-TOF utilisé dans les laboratoires de spectroscopie de Dow Chemical en 1957.....	38
Figure 22 : Spectres de masse respectifs de l'acétone, du benzène et du toluène	38
Figure 23 : L'un des premiers appareils commerciaux de Finnigan.....	39
Figure 24 : Schéma des composantes d'une source à impact électronique	40

Figure 25 : Relation entre la polarité d'un composé, sa masse moléculaire et le type de source permettant son ionisation	42
Figure 26 : Schéma du principe d'ionisation en <i>electrospray</i>	43
Figure 27 : Schéma du principe d'une source <i>APPI</i>	45
Figure 28 : Schéma représentant les principales composantes d'un spectromètre de masse à simple quadripôle	46
Figure 29 : Schéma représentant les principales composantes d'un spectromètre de masse à temps de vol	47
Figure 30 : Schéma d'une trappe ionique classique 3D	48
Figure 31 : Schéma des quadripôles d'une trappe ionique linéaire	49
Figure 32 : Schéma des composantes typiques d'un triple quadripôle	50
Figure 33 : Schéma de la configuration interne d'un spectromètre de masse Orbitrap..	52
Figure 34 : Analyseur de masse Orbitrap.....	52
Figure 35 : Schéma représentant les composantes principales d'un Q-TOF.....	53
Figure 36 : Mécanisme catalytique d'insertion d'un oxygène par les CYP450.....	56
Figure 37 : Diagramme présentant le pourcentage de métabolisation des molécules exogènes à l'organisme par les neufs enzymes principales du cytochrome P450	58
Figure 38 : Substrats utilisés pour le développement analytique.....	60
Figure 39 : Exemples de chromatogrammes en HPLC-MS (droite) et en UPLC-MS/MS (gauche) obtenus pour des mélanges d'incubation. 1 : acétaminophène (CYP1A2), 2 : tobutamide (SI), 3 : méthoxymorphinane (CYP3A4/5), 4 : paclitaxel (SI), 5 : hydroxytestostérone (CYP3A4/5), 6 : corticostérone (SI), 7 : hydroxytolbutamide (2C9), 8 : phénacétine (SI), 9 : hydroxyméphénytoïne (2C19), 10 : tolbutamide (SI).....	77
Figure 40 : Exemple de droite d'étalonnage et de paramètres reliés à cette droite pour la quantification de l'acétaminophène (CYP1A2) par HPLC-MS	86
Figure 41 : Exemple de droite d'étalonnage et de paramètres reliés à cette droite pour la quantification de l'acétaminophène (CYP1A2) par UPLC-MS/MS	86

Note : Les références pour chacune des figures tirées d'autres ouvrages ou de sites internet sont présentées à la fin de cet ouvrage sous Référence des figures

Index des tableaux

Tableau 1 : Principales différences entre les technologies HPLC et UPLC.....	8
Tableau 2 : Polarité de différents solvants couramment utilisés en chromatographie liquide phases inverses	10
Tableau 3 : Tampons couramment utilisés en chromatographie liquide.....	11
Tableau 4 : Gradient linéaire de séparation pour l'analyse des CYP450 par HPLC.....	63
Tableau 5 : Fragments m/z utilisés en mode SIM pour le dosage des métabolites et de leurs standards internes en HPLC-MS.....	64
Tableau 6 : Gradient linéaire utilisé en UPLC afin de doser chaque marqueur en conditions acide ou basique.....	65
Tableau 7 : Paramètres en MRM utilisés pour la quantification des traceurs CYP450 en UPLC-MS/MS	66
Tableau 8 : Plages de concentrations des standards utilisés pour la quantification en HPLC-MS des essais CYP450, ainsi que leurs temps de rétention respectifs	67
Tableau 9 : Plages de concentrations des standards utilisés pour le dosage en UPLC-MS/MS des essais CYP450, ainsi que leurs temps de rétention respectifs	68
Tableau 10 : Constantes de Michaelis-Menten (K_m) répertoriées pour chaque substrat des CYP450	68
Tableau 11 : Linéarité, limites de quantification (LDQ) et de détection (LDD) et contrôle qualité pour l'analyse des essais par HPLC-MS	87
Tableau 12 : Linéarité, limites de quantification (LDQ) et de détection (LDD) et contrôle qualité pour l'analyse des essais par UPLC-MS/MS	87

Index des équations

Équation 1 : Paramètres régissant la résolution chromatographique	26
Équation 2 : Équation de la sélectivité	26
Équation 3 : Paramètres influençant le nombre de plateaux théoriques	27
Équation 4 : Équation régissant la pression d'un système de chromatographie liquide.	28
Équation 5 : Équation de Van Deemter développée	29
Équation 6: Forme simplifiée de l'équation de Van Deemter.....	29
Équation 7 : Paramètres influençant C_m	33

Index des schémas

Schéma 1 : Réaction générale utilisée pour le <i>end-capping</i> des colonnes.....	13
Schéma 2 : Réaction de synthèse des particules BEH	15
Schéma 3 : Formation de l'ion primaire ammonium	41
Schéma 4 : Formation d'ion moléculaire par transfert de proton.....	41
Schéma 5: Formation d'adduit d'ammonium.....	41
Schéma 6 : Réactions de formation d'espèces réactives en <i>APCI</i> mode positif.....	44
Schéma 7 : Absorption d'un photon par une molécule.....	44
Schéma 8 : Ionisation d'une molécule via la libération d'un électron.....	44
Schéma 9 : Équation générale de conversion d'une molécule (RH) en métabolite oxydé (ROH) sous l'action des CYP450.....	56

Index des symboles et des abréviations

CYP ou CYP450 :	Cytochrome P450
<i>In vivo</i> :	À l'aide d'un organisme vivant normal et complet
<i>In vitro</i> :	À l'aide d'une partie d'un organisme isolée de son contexte habituel
RMN :	Résonance magnétique nucléaire
HPLC :	<i>High Pressure Liquid Chromatography</i> ou <i>High Performance Liquid Chromatography</i>
UPLC :	<i>Ultra Performance Liquid Chromatography</i>
UHPLC :	<i>Ultra High Performance Liquid Chromatography</i>
LC :	<i>Liquid Chromatography</i>
NP-HPLC :	<i>Normal Phase-High Performance Liquid Chromatography</i>
RP-HPLC :	<i>Reverse Phase-High Performance Liquid Chromatography</i>
UV-visible :	Ultraviolet au visible
DAD :	<i>Diode Array Detection</i>
MS :	<i>Mass Spectrometry</i>
TOF :	<i>Time-Of-Flight</i>
MS/MS :	<i>Mass Spectrometry of Mass Spectrometry</i>
QQQ :	<i>Triple Quadrupole Mass Spectrometry</i>
MS ⁿ :	<i>Multiple Stage Mass Spectrometry</i>
LC-MS :	<i>Liquid Chromatography-Mass Spectrometry</i>
GC-MS :	<i>Gas Chromatography-Mass Spectrometry</i>
GC-MS/MS :	<i>Gas Chromatography-Mass Spectrometry of Mass Spectrometry</i>
GC-TOF :	<i>Gas Chromatography-Time-Of-Flight</i>
Q-TOF :	<i>Quadrupole-Time-Of-Flight Mass Spectrometry</i>
EI :	<i>Electron Ionization</i>
CI :	<i>Chemical Ionization</i>
NCI :	<i>Negative Chemical Ionization</i>
API :	<i>Atmospheric Pressure Ionization</i>
API-ESI :	<i>Atmospheric Pressure Ionization-Electrospray Ionization</i>
ESI+ et ESI- :	<i>Positive Electrospray Ionization et Negative Electrospray Ionization</i>
APCI :	<i>Atmospheric Pressure Chemical Ionization</i>
APPI :	<i>Atmospheric Pressure Photoionization</i>
CID :	<i>Collision-Induced Dissociation</i>

nm :	Nanomètre ou 1×10^{-9} mètre
μm :	Micromètre ou 1×10^{-6} mètre
mm :	Millimètre ou 1×10^{-3} mètre
cm :	Centimètre ou 1×10^{-2} mètre
μL :	Microlitre ou 1×10^{-6} litre
mL :	Millilitre ou 1×10^{-3} litre
mL/min. :	Millilitre par minute
L/hre :	Litre par heure
g :	Gramme
μg :	Microgramme
mg/mL :	Milligramme par millilitre
g/mol :	Gramme par mole
mmol/L ou mM:	Millimole par litre ou millimolaire
μM :	Micromole par litre ou micromolaire
U/mL :	Unité par millilitre
$\mu\text{mol/m}^2$:	Micromole par mètre carré
ppm :	Partie par million
m/z :	Rapport masse sur charge
$h\nu$:	Énergie d'un photon
ω :	Fréquence axiale de l'ion
V :	Volt
eV :	Électronvolt
kV :	Kilovolt
scan :	Mode balayage
SIM :	<i>Single Ion Monitoring</i>
MRM :	<i>Multiple Reaction Monitoring</i>
ddp :	Différence de potentiel
r^2 :	Corrélation
S/N :	<i>Signal to Noise</i> ou signal sur bruit
% :	Pourcentage
K_m :	Constante de Michaelis-Menten
°C :	Degré celsius
BEH :	<i>Bridged Ethyl Hybrid</i>
ODS ou C18:	Octadécylsilyl ou <i>Octadecylsilyl</i> en anglais

C8 :	Octyle ou <i>Octyl</i> en anglais
PEEK :	<i>Poly-Ether-Ether-Ketone</i>
HDPE :	<i>High-Density-Poly-Ethylene</i>
PP :	<i>Poly-Propylene</i>
PTFE :	<i>Poly-Tetra-Fluoro-Ethylene</i> ou communément appelé Teflon
pKa :	Constante de dissociation de l'acide
R ou R_s :	Résolution
t_r , t_a ou t_b :	Temps de rétention d'un analyte
t_v :	Temps de rétention d'un composé non-retenu
$w_{1/2}$, w_a ou w_b :	Largeur à mi-hauteur
W_a :	Largeur à la base
N :	Nombre de plateaux théoriques
α :	Sélectivité
k :	Facteur de rétention
σ :	Déviation standard du pic
H ou <i>HEPT</i> :	Hauteur des plateaux théoriques
d_p :	Taille des particules
L :	Longueur de la colonne
ΔP :	Différence de pressions
η :	Viscosité
K° :	Perméabilité
μ :	Vélocité linéaire
λ :	Forme des particules
Terme A :	Diffusion d'Eddy
Terme B :	Diffusion longitudinale
Termes D , D_m et D_s :	Coefficient de diffusion due au transfert de masse
LDQ :	Limite de quantification
LDD :	Limite de détection
AP :	Acétaminophène
OH-CM :	Hydroxycoumarin
^2H :	Deutérium
^{13}C :	Carbone treize
^{15}N :	Azote quinze

MM :	Méthoxymorphinane
OH-TS :	Hydroxytestostérone
NV :	Nirvanol
OH-PT :	Hydroxypaclitaxel
OH-TB :	Hydroxytolbutamide
OH-MP :	Hydroxyméphytoïne
DX :	Dextrométhorphan
OH-CZ :	Hydroxychlorzoxazone
ACN :	Acétonitrile
IPA :	Isopropanol
THF :	Tétrahydrofurane
MeOH :	Méthanol
NH ₃ :	Ammoniaque
CH ₄ :	Méthane
C ₄ H ₁₀ :	Butane ou isobutane
BPC :	Biphényle polychloré
H ₂ O :	Eau
O ₂ :	Oxygène
M ⁺ :	Molécule chargée positivement
M ⁻ :	Molécule chargée négativement
[M+H] ⁺ :	Molécule chargée positivement par ajout d'un proton
[M-H] ⁻ :	Molécule chargée négativement par perte d'un proton
PS-DVB :	Polystyrène-divinylbenzène
SI :	Standard interne
ARC :	Association pour la recherche collégiale
CCTT :	Centre collégial de transfert technologique
ASMS :	<i>American Society for Mass Spectrometry</i>
NADP ⁺ ou NADPH:	<i>Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate</i>
1/[c] ² :	Régression linéaire par moindres carrés
\$:	Dollar

Chapitre 1 : Mise en contexte

L'espérance de vie de la population mondiale a, depuis quelques décennies, augmentée significativement. Un intérêt grandissant envers une saine alimentation est certes un des facteurs ayant contribué à cette augmentation¹. La médecine a, elle aussi, fait de grands pas et ses techniques modernes contribuent à l'amélioration générale de la qualité de vie des gens. Le domaine pharmaceutique y est sans contredit pour quelque chose, puisque de nouveaux médicaments prometteurs sont introduits sur le marché chaque année. Pour qu'un médicament devienne disponible auprès de la population, des phases d'évaluation précliniques et cliniques rigoureuses doivent être réussies. L'une des phases précliniques implique l'étude de la métabolisation des drogues, dans le but de fournir des informations précises quant aux voies d'élimination de ces molécules, ainsi que pour les métabolites engendrés. Il est alors essentiel d'utiliser une méthodologie découlant d'une science moderne et émergente, appelée métabolomique.

La métabolomique, nom proposé par Olivier et al en 1998², désigne l'étude globale du métabolome, qui peut être défini comme une finalité découlant de l'expression des gènes. Le métabolome, découlant du protéome, est beaucoup plus limité que celui-ci, ce qui le rend plus facile à caractériser et à comprendre. Toutefois, le métabolome demeure complexe, avec une estimation de l'ordre de 15 000 métabolites pour une espèce animale donnée et 200 000 métabolites différents pour tout le royaume végétal^{3, 4}. La métabolomique, qui est l'étude de l'ensemble des métabolites, permet de comprendre l'ensemble du métabolome⁵⁻⁹. Le terme métabolite a ici été défini comme une petite molécule de poids moléculaire inférieur à 1000 g/mol. Bien que certains métabolites aient été identifiés et étudiés en GC-MS lors des années soixante-dix¹⁰⁻¹², la métabolomique a fait un bond considérable durant la dernière décennie. Cette rapide évolution est principalement due aux avancées de l'appareillage analytique, qui ont permis, entre autres, le développement de méthodes appliquées à la métabolomique en résonance magnétique nucléaire (RMN)¹³⁻¹⁵ et en chromatographie liquide avec détection en spectrométrie de masse (LC-MS)¹⁶⁻¹⁸. Il a d'ailleurs été démontré que ces deux techniques analytiques peuvent être utilisées de façon complémentaire, afin d'élucider la structure de molécules complexes¹⁹⁻²¹.

L'approche métabolomique a récemment suscité l'intérêt de l'industrie pharmaceutique. Certaines techniques de métabolomique ont été utilisées pour faire le criblage de drogues

et de leurs métabolites pour des échantillons *in vivo*. Par exemple, Rook *et al*²² ont utilisé une approche ciblée en chromatographie liquide couplée à une détection par spectrométrie de masse (MS) à triple quadripôle, afin d'identifier et de quantifier douze drogues pharmaceutiques et leurs métabolites dans le plasma humain. Petrovic *et al*²³ et Kratzsch *et al*²⁴ ont, quant à eux, mis à profit des techniques de détection MS par quadripôle-temps de vol (Q-TOF) et par trappe ionique (TI), dans le but de caractériser des composés pharmaceutiques et leurs métabolites retrouvés dans des échantillons d'eaux usées et de plasma humain.

Les études pharmaceutiques menées de façon *in vitro* ont aussi tiré profit des récentes avancées de la métabolomique. L'un des défis posé par la découverte de nouveaux composés thérapeutiques est de prédire les interactions pharmacocinétiques drogue-drogue influençant la clairance d'un médicament et menant parfois à des toxicités²⁵. Plusieurs drogues, comme le Posicor ou le Seldane, ont dû être retirées du marché, car de trop grandes interactions pharmacocinétiques étaient engendrées lors de la prise de ces médicaments^{26, 27}. La mesure *in vitro* de l'inhibition et de l'induction des enzymes du cytochrome P450 (CYP450) par de nouvelles drogues mises sur le marché devient alors essentielle durant les études précliniques et cliniques. Les essais CYP450 ont une grande incidence pour le volet clinique pour deux raisons majeures²⁸⁻³⁰. Premièrement, ces essais peuvent permettre de démontrer qu'une molécule thérapeutique n'entraîne aucune ou très peu d'interactions pharmacocinétiques, afin de valider la poursuite de ces études en phases cliniques. Deuxièmement, les données générées lors d'une réponse positive pour des essais CYP450 permettent d'établir une stratégie en phases cliniques dans le but de minimiser le nombre d'études requises.

Plusieurs essais CYP450 *in vitro* ont été développés et adaptés pour la mesure des interactions drogue-drogue. Ces essais diffèrent selon certains paramètres : soit la source et la composition des enzymes utilisées, les substrats employés ou le mode de détection. Les enzymes des essais CYP450 peuvent provenir de microsomes de foie humain ou animal, ou alors de protéines recombinantes, isozymes du CYP450. Les substrats peuvent être des drogues, marquées ou non, ou encore des dérivés du coumarin. Le choix du substrat influencera la détection, puisque la radioactivité, la fluorescence, la luminescence ou la spectrométrie de masse ne pourront être utilisés dans tous les cas²⁵. Les deux types d'essai CYP450 les plus couramment utilisés sont les protéines recombinantes avec des

substrats dérivés du coumarin en détection fluorimétrique^{31, 32} et les microsomes de foie humain combinés à des drogues analysées en LC-MS³³.

Les deux approches, par fluorescence^{31, 34-38} et spectrométrie de masse³⁹⁻⁴⁴ sont présentées en détails dans *Current Protocols in Pharmacology*⁴⁵, qui est un ouvrage incontournable dans le secteur pharmacologique. La détection en fluorescence permet de traiter un volume d'échantillon important, de l'ordre de 100 à 1000 par jour, et est souvent employée lors des étapes initiales de recherche où des milliers de composés sont criblés. Parce qu'aucun dérivé du coumarin n'est spécifique à un seul CYP450, un isozyme CYP450 recombinant pur, spécifique à un seul enzyme, doit être utilisé lors de chaque essai, ce qui ne représente pas un cas idéal. La détection par spectrométrie de masse permet de traiter un nombre modéré d'échantillons, soit 10 à 100 par jour, et est sollicitée lors d'étapes ultérieures de développement de médicaments. Cette approche permet l'utilisation lors des essais d'un homogénat de foie, contenant plusieurs CYP450, ce qui reproduit plus justement les modèles *in vivo*. Plusieurs études ont d'ailleurs tenté d'établir un parallèle entre ces deux types d'essais en fluorimétrie et en spectrométrie de masse et les résultats sont plutôt disparates, montrant parfois de bonnes corrélations et d'autres fois de très mauvaises^{25, 36, 46-49}. L'approche en détection par spectrométrie de masse est considérée dans la littérature comme beaucoup plus fiable, puisque de nombreux questionnements ont été soulevés quant à l'utilisation de substrats fluorescents^{36, 48, 50-52}.

Comme mentionné auparavant, les essais CYP450 sont bien documentés^{42-45, 53}. Cependant, la vaste gamme de paramètres répertoriés rend la tâche ardue pour un scientifique désirant implanter des essais CYP450 simples dans son laboratoire. Selon la littérature, quatre à cinq différents substrats sont proposés pour chacun des neuf CYP450, ainsi qu'une multitude de conditions analytiques. Les nombreuses conditions chromatographiques, c'est-à-dire colonnes et phases mobiles de toutes sortes, couplées à divers mode de détection, entraînent des écarts d'une technique à l'autre et complexifient les mesures en laboratoire. Le présent mémoire présente des stratégies simples utilisant la chromatographie liquide, soit par chromatographie liquide haute-performance (HPLC conventionnel) ou par chromatographie liquide ultra-performante (UPLC), ainsi qu'une détection par spectrométrie de masse à simple quadripôle (MS) ou à triple quadripôle (MS/MS). Les méthodes décrites sont très spécifiques aux substrats sélectionnés et permettent d'évaluer l'activité de neuf enzymes CYP450 responsables de la métabolisation de la majorité des médicaments disponibles sur le marché⁵⁴⁻⁵⁶. L'approche

proposée met en jeu une seule phase stationnaire en combinaison avec deux phases mobiles, simplifiant considérablement la tâche du chimiste analyste. Les deux méthodologies ont finalement été validées à l'aide d'essais de microsomes de foie humain, afin d'en assurer la robustesse.

Chapitre 2 : Principes théoriques

1 La chromatographie liquide

La chromatographie est un terme général utilisé en laboratoire ou en usine pour désigner une technique de séparation de mélange. Cette technique implique une phase mobile passant à travers une phase stationnaire, ce qui permet une séparation des composantes d'un mélange par partition entre ces deux phases. Une légère différence de coefficient de partition d'une molécule par rapport à une autre rend alors possible la séparation de ces composés d'un mélange.

La chromatographie liquide est une technique de séparation où la phase mobile est une solution liquide, souvent constituée d'un mélange de solvant, et la phase stationnaire est un solide. En HPLC ou en UPLC, un mélange est entraîné à de fortes pressions par une phase mobile liquide à travers une colonne remplie de particules sphériques ou irrégulières, par exemple de la silice. La première section de ce chapitre sera consacrée à établir l'historique de la chromatographie liquide, afin de mieux comprendre son origine et les principes théoriques reliés à son évolution, qui ont conduit cette technique de séparation vers les puissantes avancées technologiques récemment mises en marché.

1.1 Les balbutiements du GPC vers le HPLC^{57,58}

La chromatographie liquide, inventée par Mikhail Tsvett en 1903 pour la séparation de pigments végétaux passant au travers d'une colonne de carbonate de calcium, est devenue très utilisée dans les années 1950 afin de séparer les constituants de mélanges, notamment pour des synthèses de produits organiques. Cependant, la technique n'avait guère évolué en 50 ans, utilisant toujours la gravité pour entraîner les solvants dans une colonne remplie de phase stationnaire dans le but d'accomplir la séparation. Parallèlement, en 1955, le premier chromatographe en phase gazeuse apparaissait sur le

marché, dont le principe avait été suggéré par Martin et Synge, détenteurs du prix Nobel de 1952 pour leur invention de la chromatographie de partage. Ce chromatographe a été commercialisé par la compagnie Perkin-Elmer, sous le nom de « Model 154 Vapor Fractometer ».

L'essor de la technique de HPLC est dû essentiellement aux travaux de Csaba Horvath et de James Logan Waters durant les années 1960. Horvath, un ingénieur d'origine hongroise, immigré aux États-Unis en 1963, développa la théorie sur la chromatographie de partage et construisit un premier appareil de HPLC de recherche pour l'expérimenter. C'est toutefois à Jim Waters qu'on doit l'éclosion technologique et commerciale de cette technique pour la séparation des mélanges de composés non-volatils. En 1963, Waters mit d'abord sur le marché le GPC-100, le premier appareil de perméation sur gel, développé en fonction des besoins de John Moore, un scientifique de *Dow Chemical Company*. Celui-ci avait inventé un procédé de fabrication de résine de polystyrène-divinylbenzène (PS-DVD). Le GPC-100, qui permettait de déterminer la distribution de masses de polymères, connut une réussite commerciale immédiate, en cette époque d'expansion fulgurante des matières plastiques. Suite à ce succès, *Waters* fut approché par une compagnie de recherche et développement, afin mettre au point un appareil de chromatographie liquide. Utilisant des composantes similaires et adaptant les idées de Horvath, la compagnie *Waters* présente à la *Pittsburgh Conference* de 1968 le premier appareil commercial de HPLC, le ALC-100.

En 1968, le HPLC de *Waters* utilise une pompe *Milton-Roy*, qui ne permet d'atteindre que des pressions d'environ 35 bars. Malgré tout, le « P » de l'acronyme signifie alors « pression ». Jim Waters est conscient que le développement de cette technique analytique requiert une meilleure pompe. En 1973, *Waters Associates* présente la première pompe conçue pour HPLC, qui permet d'atteindre des pressions de 400 bars avec des fluctuations mineures en débit. Peu après, ils présentent un injecteur compatible avec un système HPLC fonctionnant à des pressions équivalentes, le U6K. Durant ces années, la compagnie *Waters* développe également, en collaboration avec *Mallinckrodt*, des procédés de purification de solvants pour HPLC. La présence d'impuretés ou les concentrations mal dosées d'agents stabilisants dans les solvants causaient des maux de tête aux chimistes, qui observaient des fluctuations parfois importantes dans les temps de rétention des composés de leurs analyses.

1.2 Évolution des particules de silice et des colonnes de HPLC vers celles d'UPLC

En 1974, la compagnie *Waters* innove à nouveau avec un procédé de production de particules de silice de 10 μm de diamètre, commercialisées sous le nom de *μ Porasil*. Les analyses HPLC se font encore presque exclusivement en « phases normales », c'est-à-dire avec des solvants organiques comme phase mobile et de la silice ou de l'alumine comme phase stationnaire. Encore une fois, la compagnie *Waters* mène la voie dans la transition vers la HPLC en « phases inversées » avec la silice *μ Bondapak C18*, où des chaînes à 18 carbones sont fixées sur la silice.

La technique de HPLC devient une ressource majeure pour les analyses de mélanges de composés non-volatils vers la fin des années 1970 et durant la décade suivante. Les années 1980 sont marquées par l'apparition des particules de silice de 5 μm de diamètre et par la prise de contrôle des instruments par des ordinateurs. La diminution de la taille des particules permet d'obtenir une efficacité de séparation semblable à celle des particules de 10 μm , mais à l'aide de colonnes plus courtes. La durée des analyses est réduite en conservant la qualité de séparation chromatographique. Alternativement, en conservant une même longueur de colonne, on arrive à séparer des composés qui étaient co-élus avec des colonnes de particules de plus grande taille.

Les années 1980 à 2000 ont vu une diversification des compagnies œuvrant dans le domaine de la chromatographie liquide, qu'il s'agisse de fabricants d'instruments, de pièces, d'accessoires, de tubulures, de colonnes et de phases stationnaires. Parmi ces compagnies qui s'imposent, notons *Hewlett-Packard*, dont la section de chimie analytique devient *Agilent Technologies* au début des années 2000. Détenant déjà un fort marché dans le domaine de la chromatographie en phase gazeuse, *HP-Agilent* réussit à gagner beaucoup de place dans celui du HPLC à la fin des années 1990 avec ses instruments de la série 1100, fiables et bien pensés. Dans le domaine des colonnes et phases stationnaires, la compagnie californienne *Phenomenex* se crée aussi une part de marché importante par la qualité de ses produits qui, il faut le souligner, semblent souvent suivre les tendances dirigées par la *Waters Corporation*.

Durant les années 1990, différentes compagnies développent des procédés de production de particules de silice de 3 μm , puis de 2,5 μm . Ces colonnes imposent une nouvelle difficulté aux instruments de HPLC, en raison des pressions d'opération plus élevées.

Avec des particules de 3 μm , la pression dans le système est environ trois fois plus grande qu'avec des particules de 5 μm . La qualité de la séparation l'emporte toutefois dans la majorité des cas, quitte à diminuer le débit « classique » d'environ 1,5 mL/minute à moins de 1,0 mL/minute.

Vers 2004, plusieurs compagnies, dont *Waters* et *Agilent* annoncent la production de particules de silice de moins de 2 μm (1,7 à 1,8 μm). Des colonnes de 2,5 ou de 5 cm de longueur peuvent maintenant remplacer des colonnes de 10 à 25 cm à particules de 5 μm , pour permettre de réduire de façon radicale la durée des analyses. Il y a cependant une difficulté : la pression très élevée dans le système chromatographique, même à des débits de 0,5 mL/min. Les méthodes chromatographiques aussi doivent être adaptées : on passe du méthanol à l'acétonitrile. Auparavant, les deux solvants étaient couramment utilisés, mais de fortes pressions sont générées avec des méthodes en gradient eau – méthanol, en raison des ponts hydrogènes qui augmentent la viscosité du mélange, ce qui incite à choisir dorénavant l'acétonitrile en remplacement.

En 2005, *Waters Corporation* annonce un bond en avant pour la chromatographie en phase liquide : c'est l'avènement du UPLC, l'*Ultra Performance Liquid Chromatography*. Le nouvel instrument développé par cette compagnie, le *Acquity UPLC*, tolère des pressions jusqu'à 1000 bars, soit deux fois et demie la limite des instruments de la génération précédente. Pour arriver à un tel résultat, les ingénieurs de *Waters* ont dû repenser chaque composante, dont évidemment les pompes.

- Le volume injecté en UPLC est plus petit que celui en HPLC. L'injecteur utilise une aiguille très fine de prélèvement, qui glisse dans une aiguille plus rigide, dont le rôle se limite à percer le septum des vials à échantillons.
- Afin que la composition de l'éluant programmée se rende dans la colonne chromatographique le plus rapidement possible, l'instrument est configuré avec une pompe binaire avec mélange à haute pression.
- Avec l'optique de diminuer les temps d'analyse en mode gradient, le volume mort doit être diminué. L'*Acquity* possède un volume mort de 80 μL , en comparaison d'environ 400 à 1000 μL pour les systèmes HPLC modernes de génération précédente.

- La chambre de mélange des éluants occupe d'ailleurs 50 des 80 μL du volume mort du UPLC *Acquity*. La flexibilité d'opération des pompes quaternaires de HPLC est conservée par la possibilité d'utiliser deux ensembles de solvants, A1–A2 ou B1–B2.
- Les tubulures d'acier « ordinaires » de HPLC présentent des stries sur leur diamètre extérieur qui provoquent des fuites et une irrégularité du diamètre intérieur qui perturbe le débit. Un nouveau procédé d'extrusion de tubulures a été développé.
- Avec des largeurs de pics de quelques secondes, comparables à celles observées en GC, l'électronique des détecteurs doit devenir plus rapide. Il faut un minimum d'environ 10 à 15 points de mesure dans un pic pour permettre une intégration correcte et reproductible.
- La technologie de production des particules de silice doit être modifiée pour obtenir des particules d'une solidité suffisante pour résister aux pressions jusqu'à 1000 bar. Le procédé de remplissage et de compaction des colonnes chromatographiques doit aussi être adapté.

Le tableau suivant résume les principales différences entre les technologies HPLC et UPLC :

Tableau 1 : Principales différences entre les technologies HPLC et UPLC

Paramètre	HPLC	UPLC
Longueur des colonnes (cm)	10, 15, 20, 25	5, 10, 15
Diamètre des colonnes (mm)	2,1 – 4,6	1,0 – 2,1
Taille des particules (μm)	3 – 5	1,7 – 2,5
Débit (mL/min.)	1,0 – 1,5	0,2 – 1,0
Volume d'injection (μL)	5 – 20	0,2 – 5,0
Pression d'opération (bar)	< 350	< 900

1.3 Acronymes, phases mobiles et phases stationnaires utilisés en chromatographie liquide

Cette technique est désignée par l'acronyme anglais *HPLC*, pour « High Performance Liquid Chromatography ». L'initiale « P » de l'acronyme a longtemps signifié « pression »,

en raison des pressions élevées qui sont atteintes dans des systèmes HPLC, de l'ordre de plusieurs dizaines à plus d'une centaine d'atmosphères. Une nouvelle technologie introduite par la compagnie *Waters* en 2004 est désignée par l'acronyme de *UPLC*, pour « Ultra Performance Liquid Chromatography », bien que le principe de cette technique soit similaire au HPLC.

Il faut souligner qu'à la différence de la chromatographie en phase gazeuse, les composés à séparer en HPLC interagissent non seulement avec la phase stationnaire, mais aussi avec la phase mobile. Celle-ci est généralement composée d'un mélange d'au moins deux solvants, ce qui permet d'en faire varier la polarité. Cet ajustement de la polarité du liquide porteur constitue le principal paramètre à ajuster pour obtenir une bonne séparation pour une analyse HPLC avec une colonne chromatographique donnée. Lors du choix des solvants, leur miscibilité doit être considérée, de façon à éviter une séparation de phases dans le système chromatographique.

En HPLC en phases normales, sous l'acronyme anglais *NP-HPLC*, la phase stationnaire est polaire et la phase mobile, qui est non-polaire, est un mélange de solvants organiques. On doit utiliser un mélange qui ne soit pas un trop bon solvant pour les composés à séparer, de façon à favoriser leur rétention sur la colonne. Le nombre de solvants disponibles est vaste, on peut donc choisir en fonction des coûts, des risques environnementaux liés aux déchets d'analyse. Par contre, il faut toujours respecter la miscibilité.

En chromatographie liquide en phases inverses, désigné selon l'acronyme anglais *RP-HPLC*, la phase stationnaire est non-polaire et la phase mobile, polaire, est un mélange d'une phase aqueuse et d'un solvant miscible avec celle-ci. Le méthanol (MeOH) et l'acétonitrile (ACN), miscibles en toutes proportions avec l'eau, sont les plus couramment utilisés. Le Tableau 2 ci-dessous présente la polarité des principaux solvants utilisés en chromatographie liquide phases inverses, afin de prédire le comportement chromatographique des analytes lors de la séparation. De nos jours, la très grande majorité des analyses sont effectuées en *RP-HPLC*, dû à la qualité des séparations obtenues.

Tableau 2 : Polarité de différents solvants couramment utilisés en chromatographie liquide phases inverses

Solvant	Indice de polarité
Eau	9,0
Acétonitrile (ACN)	5,8
Méthanol (MeOH)	5,1
Isopropanol (IPA)	3,9

Les séparations par HPLC peuvent être effectuées en mode isocratique, lorsque la composition en solvants de la phase mobile demeure constante, ou en mode gradient, c'est-à-dire que la composition de la phase mobile varie durant l'analyse. Lors de l'utilisation d'un gradient, on débute toujours par une composition de phase mobile de polarité opposée à celle de la phase stationnaire, pour évoluer vers une polarité qui tend vers celle de la phase stationnaire. Ainsi, en *RP-HPLC*, on commence la séparation avec un mélange de solvants polaire, donc à plus grande teneur en phase aqueuse, ce qui permet aux analytes de demeurer retenus sur la colonne chromatographique. On augmente ensuite graduellement la proportion de la phase organique.

Les colonnes HPLC pour analyses en phases inversées, de caractère hydrophobe, donnent souvent des résultats peu reproductibles quand une très forte teneur en eau est utilisée, au-dessus d'approximativement 95%. Il a été démontré qu'à basse pression, lorsque la pompe est arrêtée, le liquide est expulsé des pores de la phase stationnaire, qui contient la plus grande fraction des chaînes hydrophobes. Ce phénomène de démouillage peut expliquer, au moins en partie, les fluctuations de temps de rétention qui sont observées lorsqu'un éluant à près de 100 % en eau sert pour les analyses. Au redémarrage des analyses, les analytes ne peuvent entrer en contact qu'avec une petite fraction de la phase stationnaire et ne sont donc à peu près plus retenus. Bien que certaines colonnes *RP-HPLC* tolérant le travail à 100% d'eau aient été développées depuis quelques années, la grande majorité des phases stationnaires ne doivent pas être utilisées avec un pourcentage d'eau excédant 95 %.

Il est souvent important d'ajuster le pH de la phase aqueuse. Les composés qui présentent un caractère acido-basique, comme des acides carboxyliques, phénols,

amines, peptides, etc., peuvent exister sous plusieurs formes : protonée, non-protonée, zwitterion, etc. Si plusieurs formes coexistent au pH auquel se fait la séparation, ces différentes formes migrent à des vitesses différentes dans la colonne chromatographique, ce qui cause l'asymétrie des pics chromatographiques, leur élargissement et une perte de résolution. Comme présenté au Tableau 3, le pH est fréquemment ajusté en utilisant de l'acide formique, de l'acide acétique, de l'acide citrique ou des phosphates.

Tableau 3 : Tampons couramment utilisés en chromatographie liquide

Tampon	pK	Domaine de pH
Phosphate	pK ₁	2,1
	pK ₂	7,2
	pK ₃	12,3
Citrate	pK ₁	3,1
	pK ₂	4,7
	pK ₃	5,4
Formate		3,8
Acétate		4,8

Certains composés ionisables sont difficiles à analyser par HPLC en phases inversées. C'est le cas, entre autres, de plusieurs composés basiques, qui se retrouvent sous forme de cations aux pH généralement utilisés avec les colonnes à support de particules de silice, à des pH entre 2 et 8. Ces ions ne sont pas retenus par la phase stationnaire, qui est non-polaire. Une des solutions consiste à ajouter à la phase mobile un composé qui fournit un contre-ion qui s'associe aux analytes ionisables, de façon à former des paires d'ions, appelé chromatographie liquide de pairage d'ions. Pour l'analyse de composés basiques, un sel d'acide alkyl-sulfonique est souvent utilisé ($\text{CH}_3(\text{CH}_2)_n\text{SO}_3^-\text{M}^+$). Pour l'analyse des composés acides, des sels d'amines quaternaires ($\text{CH}_3(\text{CH}_2)_n\text{N}^+\text{A}^-$) sont ajoutés à la phase mobile. La longueur des chaînes alkyle peut être choisie en fonction de la rétention désirée sur la colonne, en général on utilise des réactifs avec des chaînes C5 à C12. La concentration de ces réactifs est de l'ordre de 5 mmol/L.

Lorsque des sels sont ajoutés à une phase aqueuse, pour ajuster le pH de la phase mobile ou en mode de pairage d'ions, on doit vérifier au préalable que ces sels demeurent en solution lorsque la phase aqueuse est mélangée aux autres solvants utilisés pour l'analyse. La meilleure méthode consiste à mélanger dans un bécher la phase aqueuse et le ou les solvants organiques dans les proportions correspondant à la plus petite teneur en eau utilisée lors de l'analyse. Si un précipité est observé, il faut modifier la méthode, soit en diminuant la concentration des sels ou la teneur maximale en solvants organiques.

Les particules de silice de 10 μm de diamètre sont apparues vers 1975. L'utilisation de ces particules dans les colonnes HPLC a permis de quintupler le nombre de plateaux théoriques par rapport à ce qui se faisait antérieurement. On obtenait ainsi environ 10 000 plateaux pour des colonnes de 25 cm de longueur. La production de particules de 5 μm , qui date d'environ 1985, a doublé le nombre de plateaux par unité de longueur, alors que les particules de 3 μm , apparues vers 1992 permettent d'obtenir environ 35 000 plateaux théoriques pour une colonne de 25 cm. À efficacité équivalente, il est avantageux d'utiliser une colonne plus courte, puisque la diffusion est minimisée et le temps d'analyse est diminué. On retrouve donc maintenant sur le marché des colonnes de 3 ou 5 cm qui permettent des séparations aussi efficaces que des colonnes de 25 cm. Les petites particules présentent une surface spécifique beaucoup plus grande que les grosses particules, ce qui accroît donc la disponibilité de la phase stationnaire. De plus, le compactage des particules dans la colonne est meilleur, ce qui réduit la possibilité de création de chemins préférentiels pour le liquide porteur et qui minimise ainsi la diffusion, phénomène qui sera expliqué lors de la Section 1.6 ayant trait à l'équation de Van Deemter.

Comme mentionné, les colonnes HPLC à base de silice doivent être utilisées entre des pH de 2 et 8. Hors de ces limites, la phase stationnaire se dégrade. Aux pH acides, les liaisons Si-O-Si sont hydrolysées, ce qui détache la phase stationnaire de la surface du support. Aux pH basiques, la silice se solubilise. La phase stationnaire est greffée chimiquement par réaction entre les groupements silanol de surface et un réactif dérivé du chlorosilane. Les colonnes les plus couramment utilisées en *RP-HPLC* portent des groupements :

- Octadécyle (ODS) ou C18 : $-(CH_2)_{17}CH_3$. Ces colonnes non-polaires offrent une bonne rétention des analytes non-polaires et peu-polaires. Elles sont également utilisées en chromatographie de pairage d'ions.
- Octyle ou C8 : $-(CH_2)_7CH_3$. Ces colonnes offrent une sélectivité comparable à celle des phases C18, mais avec moins de rétention. Notons que les manufacturiers offrent aussi des colonnes C12, C4, C3... Dans tous les cas, la longueur relative de la chaîne carbonée détermine la rétention.
- Phényle : $-(CH_2)_nC_6H_5$. Ces colonnes non-polaires offrent une sélectivité différente des colonnes de type alcane, utile notamment pour la séparation d'analytes aromatiques.
- Nitrile, « cyano » ou cyanopropyle : $-CH_2CH_2CH_2CN$
- Amine, « amino » ou aminopropyle : $-CH_2CH_2CH_2NH_2$
- Diol ou glycéropropyle : $-CH_2CH_2CH_2OCH(OH)CH_2OH$

Un des problèmes en HPLC en phases inversées demeure la présence de groupements silanol sur la surface du support après le greffage de la phase stationnaire. La silice chromatographique porte typiquement $8 \mu\text{mol}/\text{m}^2$ de groupements silanol. Environ la moitié de ces groupements seulement peuvent être greffés, l'accès aux silanol restants étant gêné par l'*encombrement stérique*, c'est-à-dire que les chaînes volumineuses de la phase greffée bloquent l'accès de la surface de la silice au réactif.

Les groupements silanol, de caractère acide, interagissent avec de nombreux composés, ce qui cause souvent des traînées de pics. L'interaction avec la pyridine sert souvent pour évaluer la performance des colonnes pour la chromatographie de mélanges contenant des composés basiques. Une solution, appelée *end-capping*, consiste, après le greffage de la phase active, à faire réagir tous les groupements silanols restants avec du triméthylchlorosilane selon l'équation suivante:



Schéma 1 : Réaction générale utilisée pour le *end-capping* des colonnes

D'autres façons d'éliminer les interactions entre les silanols résiduels et les analytes sont utilisées par les fabricants de colonnes HPLC :

- L'atome de silice du chlorosilane utilisé pour fixer la phase stationnaire porte des groupements isopropyle ou isobutyle qui bloquent l'accès à la surface de la silice par encombrement stérique.
- La réaction avec des dérivés de di- ou trichlorosilane en présence de traces d'eau conduit à des groupements fonctionnels qui bloquent l'accès du liquide porteur à la surface de la silice.
- L'incorporation d'un segment polaire dans la chaîne de la phase stationnaire mène à des groupements qui interagissent avec les silanols pour en réduire l'activité. Ainsi, par exemple, on retrouve des phases stationnaires où le groupement greffé en surface de la silice contient un lien éther : $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{O}-\text{C}_6\text{H}_5$.

La phase stationnaire « classique » de *NP-HPLC* est composée de particules de silice de 1,8 à 10 μm de diamètre. Ce sont les groupements silanols de la surface du solide qui interagissent alors avec les analytes. Il est aussi possible de travailler en phases normales avec des silices greffées avec des substituants polaires : les phases cyano, amino et diol, décrites plus en *RP-HPLC*, peuvent aussi être utilisées en phases normales.

La compagnie *Waters* a introduit en 2003 une seconde génération de colonne hybride, les colonnes BEH (Bridged Ethyl Hybrid). Ils ont été en mesure de ponter certains liens Si-O-Si en remplaçant l'oxygène par un groupement éthyle, comme le présente la Figure 1. Cette technologie de particules a été développée en utilisant la réaction de synthèse organique de l'**Erreur ! Source du renvoi introuvable.** Ce type de particules possède plusieurs avantages par rapport à la silice conventionnelle. Premièrement, c'est une des technologies de silice qui a permis l'essor de la chromatographie ultraperformante, puisque cette particule peut être soumise à des pressions plus élevées sans se déformer. Deuxièmement, cette particule est beaucoup plus stable chimiquement, car elle résiste à des pH de l'ordre de 1 à 11 à une température de 50°C. La stabilité de ces particules est explicable par le fait que les liaisons Si-O-Si sont facilement hydrolysables à des pH extrêmes, principalement sous conditions basiques au-dessus de pH 8. L'hydrolyse de ces liens mène à l'espèce $\text{Si}(\text{OH})_4$, qui est hautement soluble dans l'eau. Pour une particule BEH, six liaisons Si-O-Si doivent être hydrolysées, car les liens Si-CH₂-CH₂-Si sont très stables chimiquement. Il devient alors beaucoup plus difficile d'affecter la structure de ce

polymère, ainsi la particule est plus stable. Finalement, la particule BEH possède un caractère plus hydrophobe que la silice conventionnelle, explicable par la présence d'un pont éthyle, ce qui permet, entre autres, d'obtenir une meilleure symétrie de pics lors de la chromatographie de composés basiques. Ce procédé de synthèse de particule réduit la présence de liens OH libres, ce qui permet de minimiser les interactions des bases avec cette fonction à caractère acide.

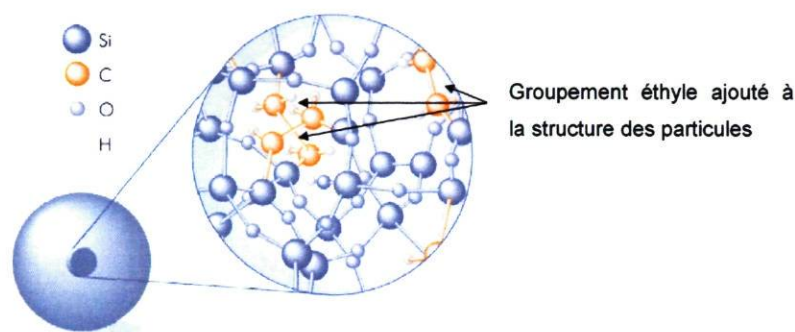


Figure 1 : Structure d'une particule BEH

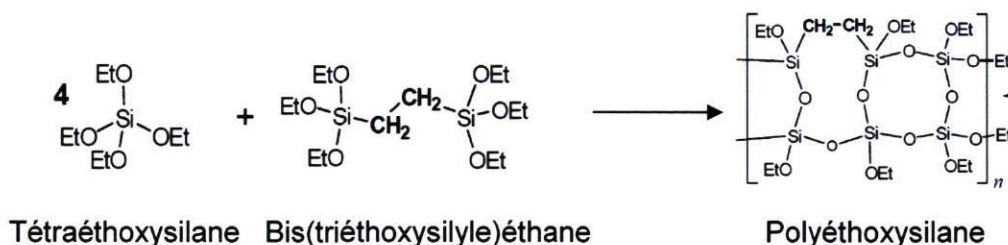


Schéma 2 : Réaction de synthèse des particules BEH

La compagnie allemande *Merck* a mis au point au début des années 2000 des colonnes de silice polymère formant des tiges poreuses, appelés colonnes monolithiques. La phase stationnaire continue de ces colonnes consiste en un matériel polymérique poreux généré à partir de silice ou de monomères comme l'acrylamide, le styrène, l'acrylate ou le méthacrylate. Ces colonnes sont ensuite enrobées d'un polymère de grande résistance mécanique, le polyéther-éther-cétone (*PEEK*), pour s'assurer qu'il n'existe aucun volume mort entre la tige et son enveloppe. Les tiges de silice possèdent à la fois un réseau de

macropores au travers duquel les liquides peuvent circuler aisément, et un réseau de *mesopores* qui lui donnent une surface spécifique très élevée. La silice poreuse présente beaucoup moins de résistance au passage des solvants que les billes de silice compactées des colonnes habituelles, ce qui permet d'utiliser des débits plus élevés, jusqu'à 10 mL/min, avec des pressions comparables à celles rencontrées avec les colonnes conventionnelles. La Figure 2 présente des photographies prises en microscopie électronique de ce type de colonnes, montrant leur porosité.

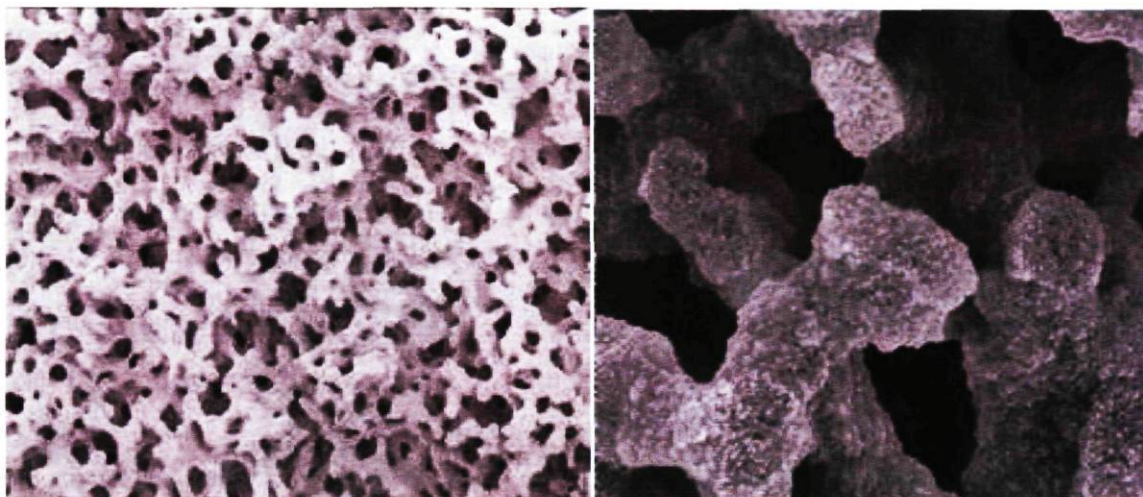
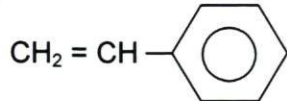


Figure 2 : Structure macroporeuse (gauche) et mésoporeuse (droite) d'une colonne monolithique

Pour des analyses qui doivent se faire au-delà du domaine de stabilité de la silice, des résines polymères de polystyrène-divinylbenzène peuvent aussi servir de support stationnaire. Ces résines forment une structure polymère *réticulée*, c'est-à-dire un réseau en trois dimensions, très rigide, qui permet de supporter les fortes pressions imposées sur la phase stationnaire lors de la préparation des colonnes. Les phases stationnaires *PS-DVD* présentent, sans fonctionnalisation, une sélectivité comparable aux phases phényles greffées sur silice. On retrouve également sur le marché des phases stationnaires *PS-DVB* greffées portant différentes fonctions : nitrile, amino, glycéropropyle, etc. Une illustration d'un support de polystyrène – divinylbenzène (PSDVB) est présentée à la Figure 3.

Styrène :



Divinylbenzène :

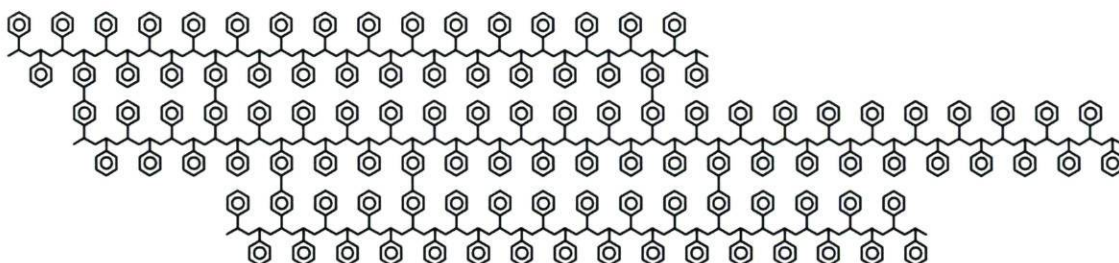


Figure 3 : Structure d'un polymère polystyrène-divinylbenzène

1.4 Configuration des instruments en chromatographie liquide

En règle générale, les tubulures et raccords en amont du module de la pompe sont en polymère HDPE (*High Density PolyEthylene* – Polyéthylène Haute Densité), PP (*PolyPropylene* – Polypropylène) ou de type fluoré comme le PTFE (Teflon). En aval de la pompe, tubulures et raccords sont en acier inoxydable ou de polymère PEEK (*PolyEther Ether Ketone* – Polyéther éther cétone), et de la plus petite section possible. Il est essentiel de minimiser le volume du système afin d'éviter la diffusion, qui se manifeste par un élargissement des pics chromatographiques. Les tubes ont généralement un diamètre intérieur de moins de 0,2 mm de diamètre et il est important de chercher à minimiser la longueur des tubulures entre l'injecteur et le détecteur du chromatographe.

1.4.1 Systèmes de pompage en chromatographie liquide

1.4.1.1 Système en mode isocratique

En mode *isocratique*, la composition de la phase mobile demeure constante durant toute l'analyse chromatographique. Si on travaille toujours dans ces conditions, on peut utiliser un système qui ne comporte qu'un seul canal pour le solvant, provenant d'une seule bouteille. Une illustration de ce système est présentée à la Figure 4.

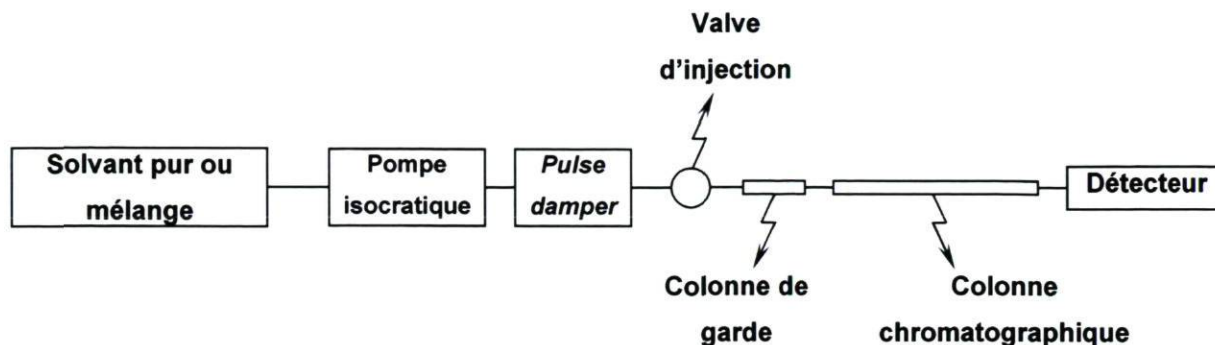


Figure 4 : Configuration instrumentale d'un système de chromatographie liquide isocratique

1.4.1.2 Système en mode gradient

Les appareils de chromatographie liquide, HPLC ou UPLC, permettent de faire des analyses chromatographiques en mode *gradient*, c'est-à-dire en faisant varier la composition du liquide porteur en cours d'analyse, en pompant les solvants contenus dans 2 à 4 réservoirs. On distingue alors deux méthodes de mélange.

1.4.1.3 Système avec pompe quaternaire et mélange à basse pression

Les proportions de chacun des liquides sont contrôlées par une valve électronique de mélange placée avant la pompe, ce qui fait qu'on qualifie cette configuration d'instruments de « mélange à basse pression ». Un schéma de ce système est présenté à la Figure 5. Il existe aussi des instruments de ce type avec pompe binaire et avec pompe ternaire.

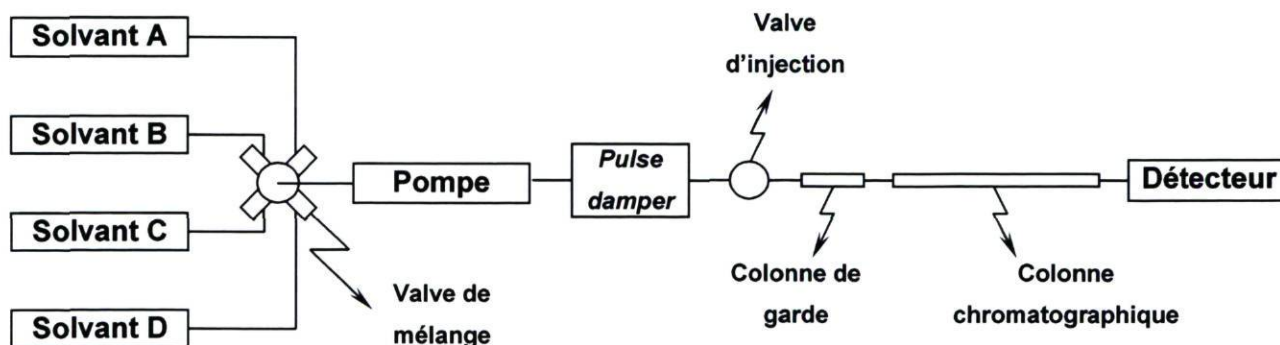


Figure 5 : Configuration d'un système quaternaire

1.4.1.4 Système avec pompe binaire et mélange à haute pression

Avec ce type de système, une pompe est dédiée à chaque solvant et le mélange de ceux-ci se fait en aval des pompes. L'avantage, par rapport aux systèmes de mélange à basse pression, réside dans le volume mort de mélange plus petit. Ceci permet d'obtenir plus rapidement la composition désirée lors du travail en mode gradient, particulièrement aux petits débits, typiquement $< 0,5 \text{ mL/min}$. Un schéma de ce système est présenté à la Figure 6.

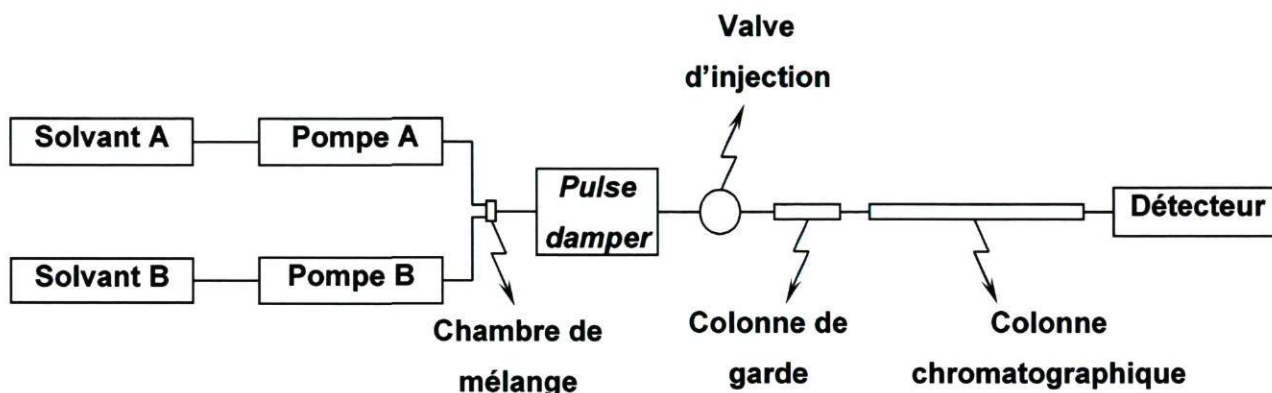


Figure 6 : Configuration d'un système binaire à haute pression

1.4.1.5 Types de pompe

Les pompes sont généralement des pompes à deux pistons fonctionnant en alternance (mouvement déphasé). On distingue les montages en parallèle et les montages en série. Pour les modèles en série, le premier piston doit pomper deux fois plus de liquide que le second, soit par un diamètre plus grand, soit par une course plus grande. Les débits généralement utilisés dans les systèmes HPLC varient entre $0,5$ et 2 mL/min , pour des pressions de l'ordre de plusieurs dizaines à plus d'une centaine d'atmosphères. La Figure 7 et la Figure 8 présentent les principaux constituants d'une pompe avec mélange à basse pression et mélange à haute pression, respectivement.

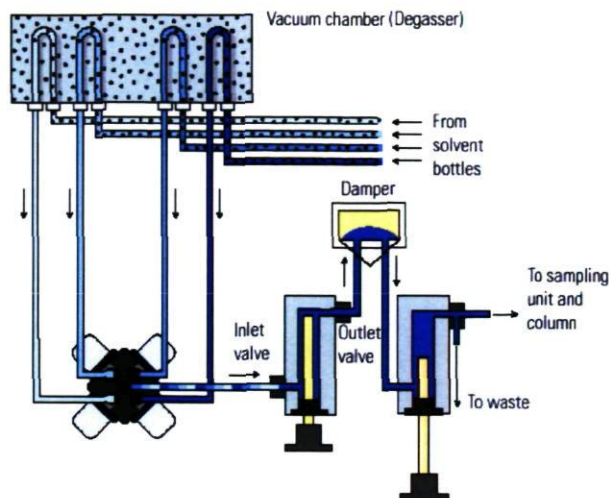


Figure 7 : Schéma d'une pompe avec mélange à basse pression

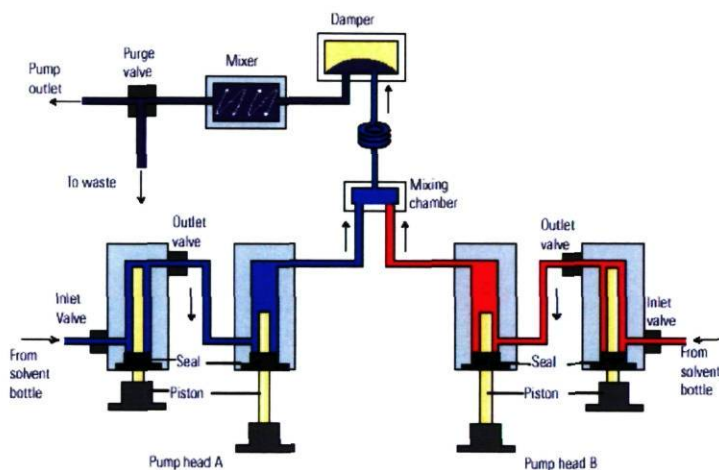


Figure 8 : Schéma d'une pompe binaire avec mélange à haute pression

1.4.1.6 Régulation du débit

Malgré l'utilisation de pompes à deux pistons, le débit à la sortie du système de pompage est forcément irrégulier, puisqu'il se produit une interruption quand les pistons arrivent en bout de course. Afin de régler ce problème, on intercale à la sortie de la pompe un atténuateur de pulses, désigné en anglais sous le nom de *pulse damper*. Il existe deux types de *pulse dampers* : à boudin (*coil dampers*) et à diaphragme (*diaphragm dampers*). Lorsque les pistons poussent le liquide porteur, le ressort en boudin ou le diaphragme se déforment sous la pression et leur relâchement lorsque les pistons s'arrêtent compense pour les irrégularités du débit. Un schéma d'un *pulse damper* est présenté à la Figure 9.

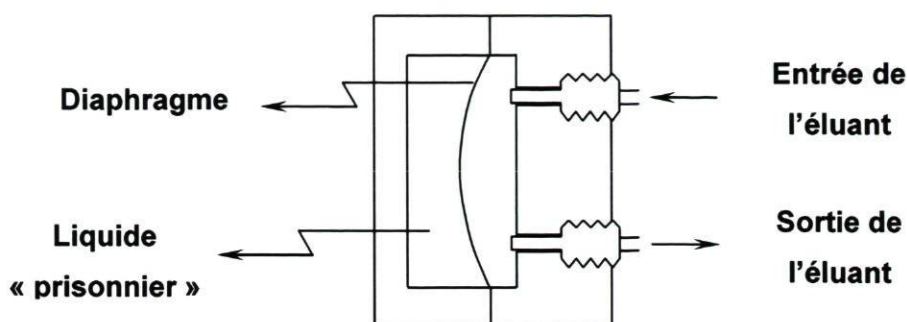


Figure 9 : Schéma d'un *pulse damper* à diaphragme

1.4.2 Systèmes d'injection

On retrouve deux types de système d'injection. Celle-ci peut être faite à l'aide d'une boucle, petite longueur de tubulure métallique ou de *PEEK*, dont le volume varie typiquement entre 10 et 100 μL , fixée sur une vanne d'injection. En position chargement, l'éluant circule directement de la pompe vers la colonne chromatographique, alors que la boucle est isolée. L'échantillon est alors injecté dans la boucle à l'aide d'une seringue. Le volume ainsi injecté doit dépasser le volume de la boucle afin de bien vider celle-ci et de la rincer, de façon à s'assurer que la composition du liquide injecté dans le système chromatographique est bien identique à la composition de l'échantillon. Quand la vanne est ensuite placée en position injection, le liquide porteur passe dans la boucle, entraînant l'échantillon vers la colonne chromatographique. La Figure 10 présente le mode de fonctionnement d'une boucle d'échantillonnage.

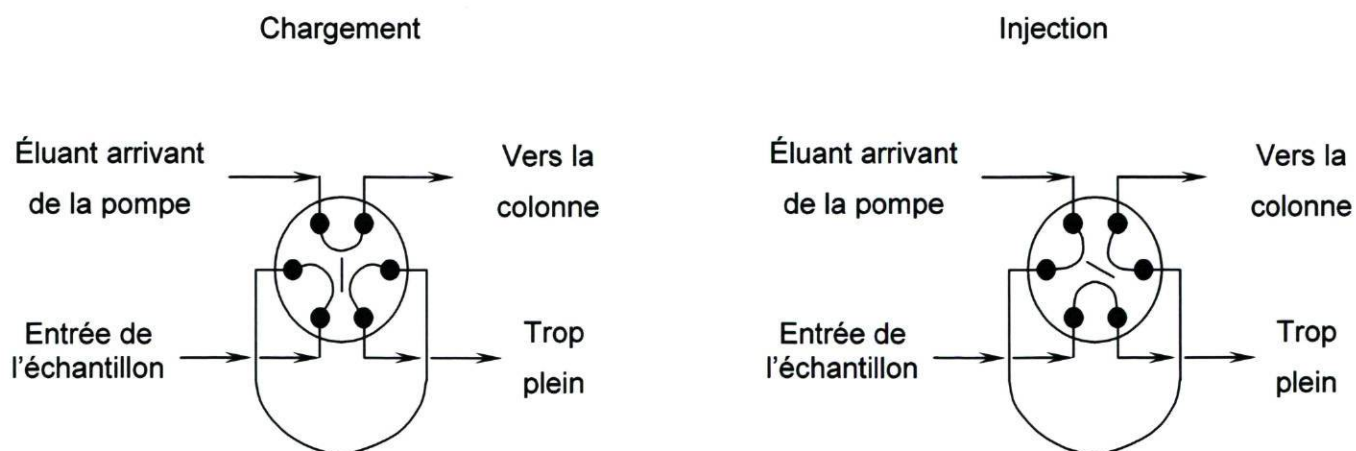


Figure 10 : Schéma de fonctionnement d'une boucle d'échantillonnage

Les chromatographes liquides modernes sont en général automatisés et utilisent plutôt un injecteur automatique, dont la séquence de fonctionnement est programmée. Certains de ces instruments n'utilisent pas de boucle d'échantillonnage, mais plutôt un piston, comme présenté en Figure 11. L'illustration 1 présente un système d'injection type *flow through* lors d'une analyse, c'est-à-dire avant ou après injection. Lors de l'injection, le piston de l'injecteur est initialement poussé, comme présenté par l'illustration 2, et l'aiguille de l'injecteur vient ensuite prélever un volume d'échantillon (illustration 3). Finalement, l'échantillon est inséré dans le système et le débit de l'instrument, en passant par l'injecteur, pousse l'échantillon, comme montré par l'illustration 4. La reproductibilité des injections est assurée par l'utilisation de moteurs électriques pas-à-pas pour contrôler le piston du système d'injection. Chaque pas du moteur correspond à un très petit volume, de l'ordre du nanolitre. Ainsi, pour des injections de l'ordre de la dizaine de microlitres, le moteur parcourt plusieurs centaines ou milliers de pas, ce qui assure des injections très reproductibles.

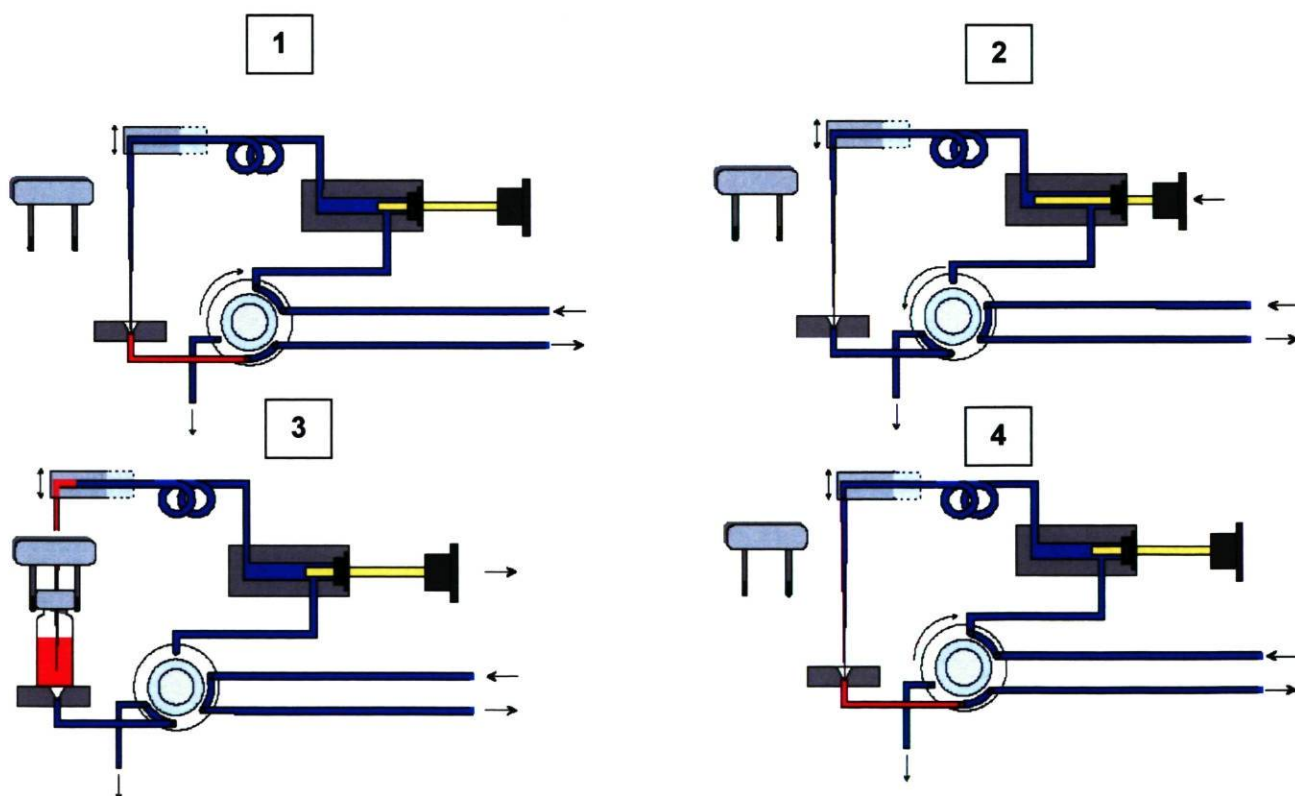


Figure 11 : Principe de fonctionnement d'un injecteur sans boucle d'échantillonnage

1.4.3 Systèmes de détection

1.4.3.1 Détecteur UV-visible

Différents systèmes de détection sont disponibles en chromatographie liquide. Le détecteur UV-visible est l'un des plus utilisés en chromatographie liquide. Le principe est fondé sur la loi de Beer-Lambert, qui relie l'absorbance optique d'un composé à sa concentration. Les détecteurs de base permettent de faire la détection à une seule longueur d'onde à la fois, donc avec une radiation monochromatique. Il faut alors, préalablement à l'analyse, connaître le spectre d'absorption UV-visible du ou des composés à analyser. Comme présenté à la Figure 12, ce type de détecteurs nécessite l'utilisation de filtres afin de sélectionner la longueur d'onde requise à l'analyse.

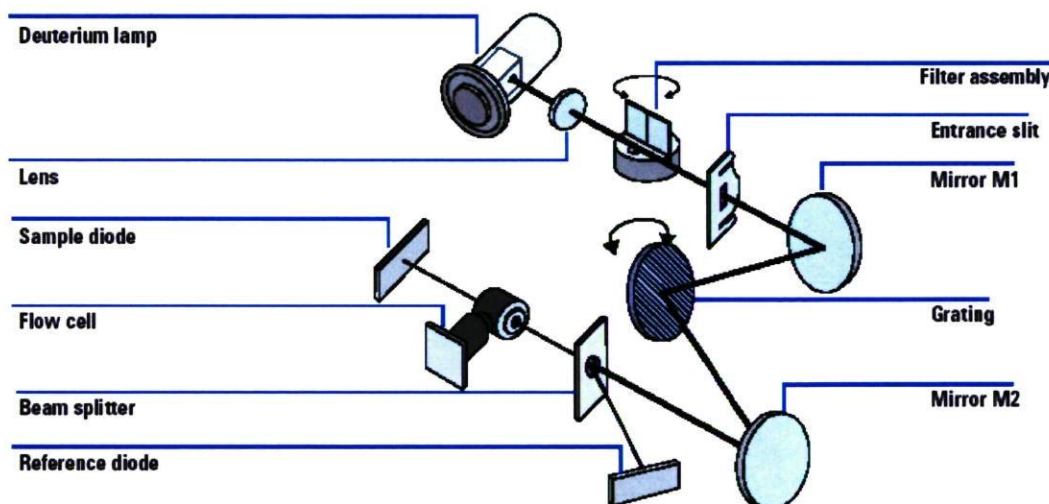


Figure 12 : Schéma des composantes d'un détecteur UV-visible à filtre

Plusieurs appareils modernes offrent une détection multicanaux ou opèrent avec une barrette de diodes de détection (DAD), qui permettent de mesurer l'absorbance à plusieurs longueurs d'onde simultanément. Un schéma général d'un détecteur à barrette de diodes est présenté à la Figure 13.

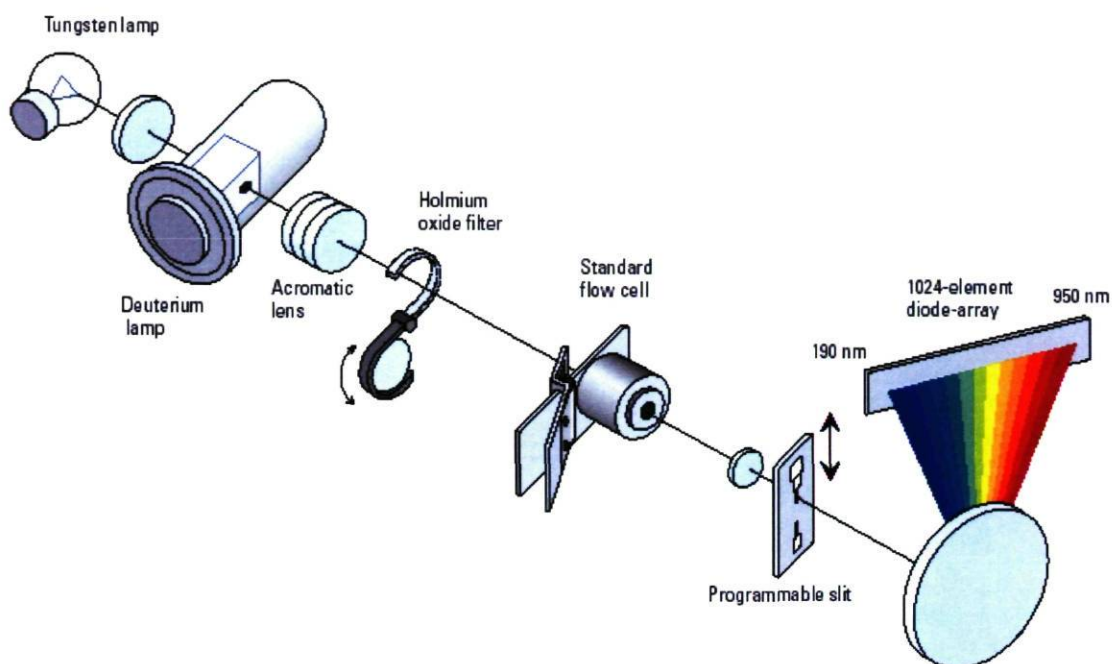


Figure 13 : Composantes d'un détecteur à barrette de diodes

1.4.3.2 Détecteur à indice de réfraction

Ce détecteur, peu sensible, ne peut être utilisé qu'en mode isocratique puisque la variation de composition du liquide porteur, entraînant la variation de son indice de réfraction, pourrait masquer ou fausser la réponse instrumentale pour les analytes. Les pics chromatographiques peuvent être positifs ou négatifs. Le détecteur doit être thermostaté à $\pm 0,01^\circ\text{C}$.

1.4.3.3 Détecteur à fluorescence

La fluorimétrie est une technique de détection très sensible et très spécifique. Il est possible d'élargir la gamme des composés analysables en additionnant des traceurs fluorescents, appelés fluorophores, qui se fixent aux molécules à analyser. La Figure 14 présente le schéma des composantes internes d'un détecteur en fluorescence.

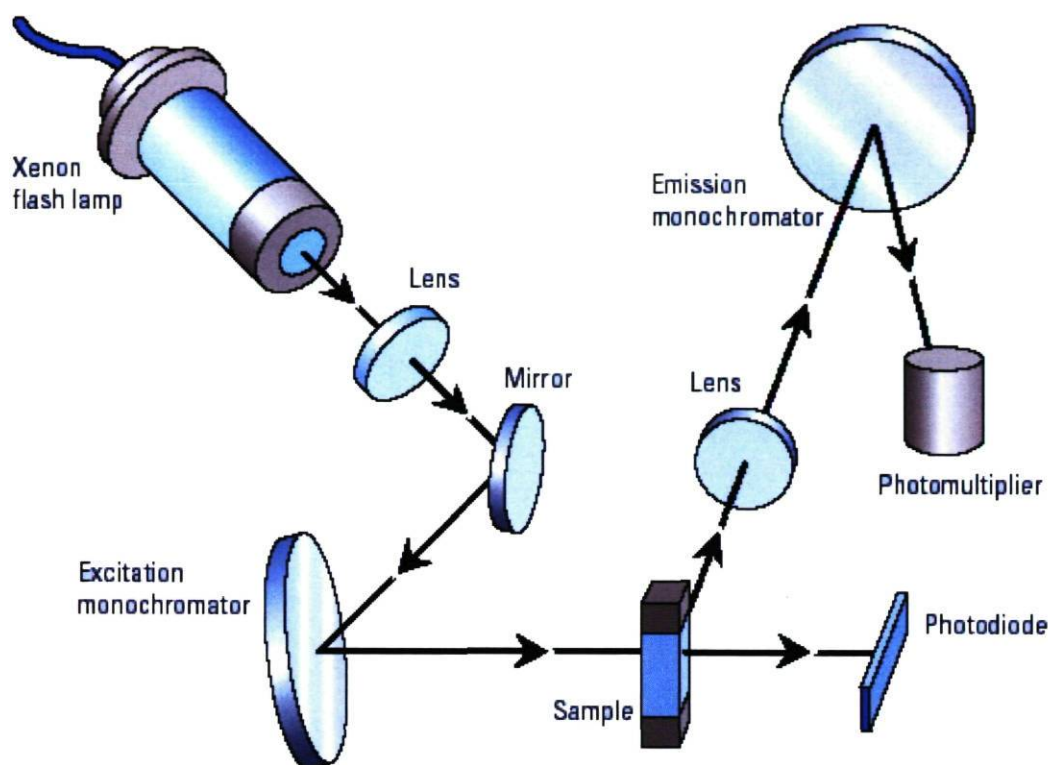


Figure 14 : Configuration d'un détecteur en fluorescence

1.4.3.4 Détecteur à diffusion de lumière et autres types de détection

Il s'agit d'un type de détecteur utilisable surtout pour les composés de haute masse moléculaire. Le liquide en sortie de colonne est vaporisé dans une chambre à haute température où le solvant est évaporé. Les analytes présents forment des agrégats, qui diffusent la lumière d'une lampe au tungstène à la sortie de la chambre et l'intensité de lumière diffusée est captée par un détecteur.

Certains autres types de détecteurs, servant à des applications beaucoup plus spécifiques, peuvent aussi être utilisés couplés à la chromatographie liquide. Par exemple, les détecteurs électrochimiques, soit en modes potentiométrie ou ampérométrie, sont très sensibles, mais peu de composés ont la capacité d'être détectés par ceux-ci.

1.4.3.5 Détection par spectrométrie de masse

Il est possible de coupler un spectromètre de masse à la sortie d'un chromatographe liquide. Les solvants doivent d'abord être éliminés par vaporisation et seuls les analytes pénètrent dans le détecteur. Cette technique de détection sera présentée en détail à la Section 2.

1.5 Paramètres de chromatographie

L'évolution des instruments de HPLC des années soixante-dix vers le UPLC introduit par Waters dans les années 2000 repose sur certains principes théoriques. Il est donc essentiel de bien définir les différents paramètres chromatographiques.

La **résolution** (R_s) représente un facteur de séparation chromatographique entre deux composés d'un mélange, c'est-à-dire deux pics de temps de rétention t_a et t_b et de largeur à mi-hauteur w_a et w_b . Une résolution de 1 indique que ces deux composés sont résolus à la ligne de base, donc totalement séparés l'un par rapport à l'autre. La résolution peut aussi être exprimée en fonction du nombre de plateaux théoriques (N) et de la sélectivité (α), comme défini par l'Équation 1.

$$R_s = \frac{2(t_b - t_a)}{w_a + w_b} = \frac{2\Delta t_R}{w_a + w_b} \quad R_s = \frac{\sqrt{N}}{4} \left(\frac{\alpha - 1}{\alpha} \right) \left(\frac{k_2}{1 + k_2} \right)$$

Équation 1 : Paramètres régissant la résolution chromatographique

La **sélectivité** (α), qui exprime la qualité de la séparation entre deux pics chromatographiques, est le rapport des **facteurs de rétention** (k') de ces pics, comme présenté à l'Équation 2. Ces derniers sont des paramètres de rétention relative, normalisés en utilisant le temps d'élution d'un composé non-retenu (t_v), l'uracile étant généralement le composé utilisé.

$$\alpha = \frac{k'_2}{k'_1} \quad k'_1 = \frac{t_1 - t_v}{t_v}$$

Équation 2 : Équation de la sélectivité

L'**efficacité** est habituellement quantifiée en utilisant le nombre de plateaux théoriques mesurés, pour un analyte donné. En pratique, on peut quantifier le nombre de plateaux théoriques à l'aide du temps de rétention (t_R) et de la largeur du pic. La largeur d'un pic peut être définie à sa base (W_b) ou à la mi-hauteur ($w_{1/2}$), puisqu'elles peuvent être reliées en approximant la forme du pic par une fonction gaussienne, où σ désigne la déviation standard du pic par rapport à une fonction gaussienne parfaite. Alternativement, le nombre de plateaux théoriques peut être calculé à l'aide de la résolution de la colonne (R) et de l'efficacité (α). La **hauteur des plateaux** d'une colonne (**H**) est quantifiée en normalisant le nombre de plateaux théoriques par rapport à la longueur de la colonne, soit N/L en unités de plateaux par mètre. Selon l'Équation 3, le nombre de plateaux théoriques peut être augmenté de façon drastique en diminuant la largeur du pic. Le nombre de plateaux et l'efficacité sont aussi reliés à la taille de la particule (d_p) et à la longueur de la colonne (L).

$$N = \left(\frac{t'_R}{\sigma} \right)^2 = 16 \left(\frac{t'_R}{W_b} \right)^2 = 5.54 \left(\frac{t'_R}{w_{1/2}} \right)^2 = \frac{16R^2}{(1 - \alpha)^2} = \frac{L}{d_p}$$

Équation 3 : Paramètres influençant le nombre de plateaux théoriques

L'une des façons les plus simples d'augmenter la résolution d'un système chromatographique est d'augmenter le nombre de plateaux théoriques en augmentant la longueur de la colonne utilisée, puisque le nombre de plateaux est directement proportionnel à cette longueur. Toutefois, l'Équation 1 stipule que R est proportionnel à la racine carrée de N et afin de doubler la résolution, il faut donc quadrupler la longueur de la colonne. Ainsi, par exemple, on doublerait la résolution d'une colonne de 250 mm en la remplaçant par une autre d'un mètre. Ceci n'est pas une solution viable, d'abord pour une question d'espace, mais aussi parce la pression d'opération est directement reliée à la longueur de la colonne. L'Équation 4 définit la relation entre la pression (ΔP), la longueur de la colonne (L), le coefficient de diffusion des analytes (D_m), la taille des particules (d_p), la viscosité de la phase mobile (η) et la perméabilité de la colonne (K°).

$$\Delta P = \left(\frac{LvDm}{d_p} \right) \frac{\eta}{K^\circ}$$

Équation 4 : Équation régissant la pression d'un système de chromatographie liquide

Une solution aux problèmes de surpression serait de développer des instruments aptes à supporter, par exemple, des pressions de l'ordre de 6000 bars, comme suggéré par certains groupes de recherche⁵⁹⁻⁶⁴. L'avènement des systèmes commerciaux UPLC ou UHPLC, apparus depuis 2005 et tolérant des pressions allant de 800 à 1200 bars, constitue un pas dans cette direction. Par ailleurs, l'**Équation 4** énonce que le différentiel en pression (ΔP) est proportionnel à la viscosité de la phase mobile (η). Ainsi, si la viscosité de la phase mobile est diminuée en augmentant la température, la pression d'opération du système peut être diminuée. Toutefois, la sélectivité est aussi affectée par la température et les analytes doivent être thermiquement stables aux températures utilisées. L'Équation 4 montre aussi que la pression est une fonction de la perméabilité de la colonne (K°). Les nouvelles colonnes monolithiques offrent une meilleure perméabilité et engendrent des pressions moins élevées, ce qui permet l'utilisation de colonnes plus longues. Enfin, en utilisant des phases stationnaires monolithiques, certains groupes de recherche ont été en mesure d'opérer des colonnes jusqu'à un mètre de longueur⁶⁵⁻⁶⁸. Cette technologie semble prometteuse pour la chromatographie liquide, mais l'encombrement du laboratoire demeure problématique.

Le nombre de plateaux théoriques et l'efficacité sont aussi en relation avec la taille des particules (d_p) dans l'Équation 4. Cette équation montre que diminuer la taille des particules augmente le nombre de plateaux théoriques et l'efficacité^{59, 61-64}. Toutefois, cette équation démontre aussi qu'une diminution de la taille des particules entraîne une augmentation en pression. Heureusement, les nouveaux appareils commerciaux de UPLC/UHPLC permettent l'utilisation de particules de taille de 1 à 2 μm . Les pompes sont conçues afin de tolérer les fortes pressions engendrées par la diminution de taille des particules. Ces instruments offrent une amélioration substantielle de la résolution avec un nombre de plateaux théoriques de l'ordre de 100 000 et une capacité de pic excédant 400⁶⁹. Une augmentation en température, découlant d'une plus forte friction à l'intérieur de ces colonnes, est toutefois constatée et peut affecter la qualité de la séparation.

1.6 Équation de Van Deemter

L'équation de Van Deemter est certes l'une des équations les plus importantes, qui permet de comprendre le passage du HPLC traditionnel vers l'UPLC et d'y relier certains des concepts chromatographiques préalablement énoncés dans la section 1.3. Cette équation fait état des mécanismes d'élargissement des bandes en chromatographie linéaire non-idéale⁷⁰. Elle relie la hauteur des plateaux théorique d'une colonne (H ou $HEPT$) à la vitesse linéaire (u) de la phase mobile en considérant les propriétés physiques, cinétiques et thermodynamiques de la séparation. L'Équation 5 présente la version développée de cette équation, qui met en relation les paramètres influençant la largeur globale des pics, proposé initialement par Van Deemter pour la chromatographie gazeuse⁷⁰.

$$H = 2\lambda d_p + 2GD_m/\mu + \omega(d_p \text{ ou } d_c)^2 \mu/D_m + Rd_f^2 \mu/D_s$$

Équation 5 : Équation de Van Deemter développée

Dans cette équation, λ représente la forme des particules en regard de la qualité du remplissage de la colonne, d_p le diamètre des particules, D_m le coefficient de diffusion de la phase mobile, d_c et d_f , le diamètre du capillaire et l'épaisseur du film de la phase stationnaire, respectivement. D_s désigne le coefficient de diffusion de la phase stationnaire, alors que G , ω et R sont des constantes. Cette équation peut être exprimée sous une forme simplifiée, présentée à l'Équation 6, plus couramment utilisée dans la littérature.

$$H = A + \frac{B}{\mu} + C\mu$$

Équation 6: Forme simplifiée de l'équation de Van Deemter

Une représentation schématisée de l'influence des termes A , B et C et de leur combinaison est présentée à la Figure 15. Cette représentation de l'équation de Van Deemter décrit trois processus contribuant à l'élargissement, représentés par des lettres A , B et C . La hauteur et l'élargissement des pics chromatographique sont gouvernés par des phénomènes cinétiques lors de la séparation sur colonne, comme la

dispersion et la diffusion moléculaire (A et B) ainsi que le transfert lent de masses (C). Chaque molécule identique voyage différemment dans la colonne par processus de probabilité.

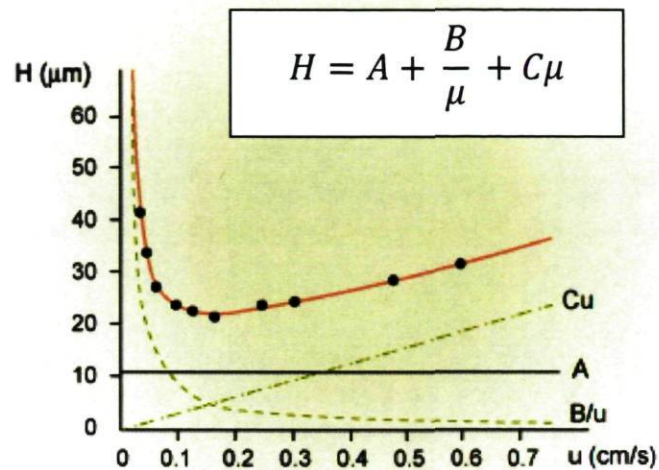


Figure 15 : Fonction H obtenue par la combinaison des termes A , B et C de l'équation de Van Deemter

Le premier terme de l'équation de Van Deemter, le terme A , est appelé diffusion d'Eddy. Ce terme décrit l'élargissement des pics chromatographiques dû à la présence de particules comme phase stationnaire dans la colonne. Comme le montre la Figure 15, ce terme ne dépend pas de la vitesse de la phase mobile dans la colonne. La diffusion d'Eddy est la conséquence de plusieurs chemins suivis par la phase mobile à travers la phase stationnaire. Ainsi, tous les analytes ne peuvent pas suivre un chemin direct à travers la colonne, comme l'illustre la Figure 16. Chaque molécule parcourt un chemin différent, ce qui cause de la dispersion de la bande injectée en tête de colonne. Certaines molécules vont voyager plus lentement et être décalées par rapport à la zone centrale du pic, tandis que d'autres vont parcourir un chemin plus court et arriver légèrement avant. Cet effet cause une légère différence de rétention entre les analytes de même nature.

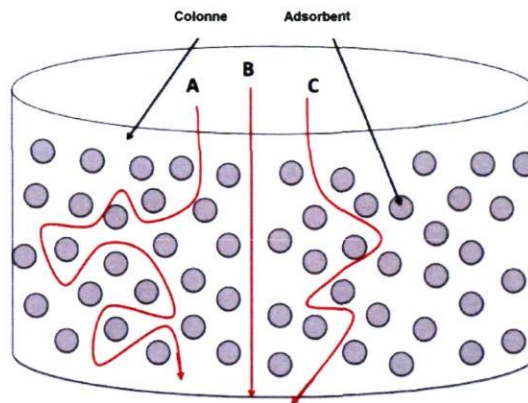


Figure 16 : Différences entre les chemins empruntés par des analytes de même nature

L'homogénéité de remplissage de la phase stationnaire dans la colonne a un effet prononcé sur le terme A. La probabilité de différences entre la longueur des chemins suivis par chaque analyte est beaucoup plus élevée dans une colonne mal remplie, puisqu'on observe un phénomène d'écoulement radial à l'intérieur des cavités. Le terme A est aussi affecté par la taille et la forme des particules de la phase stationnaire. Plus les particules sont grosses, plus les différents trajets empruntés par les molécules sont longs, ce qui entraîne une diffusion de la bande appliquée en tête de colonne et un élargissement du pic. Pour ce qui est de la forme des particules, les trajectoires suivies par des molécules à travers une colonne remplie de particules régulières, c'est-à-dire sphériques, seront plus courtes que celles à travers des particules irrégulières, puisque des particules sphériques tendent à former plus facilement un lit régulier à l'intérieur d'une colonne. À l'opposé, un lit irrégulier consiste en plusieurs trajectoires de débit de forme et de longueur variées, ce qui entraîne des différences de vitesse de la phase mobile. La diffusion d'Eddy est un phénomène important pour des colonnes de 2 à 5 mm de diamètre interne. Lorsqu'une colonne de ce diamètre est remplie de façon régulière avec de petites particules sphériques, dont la distribution de tailles est étroite, la contribution de la diffusion d'Eddy est minimale dans l'équation de Van Deemter.

Le terme B de l'équation de Van Deemter est connu sous le nom de diffusion longitudinale. Ce terme réfère à la diffusion de chaque molécule de même nature dans la phase mobile pour une direction longitudinale dans la colonne. Cette diffusion contribue à l'élargissement des pics chromatographiques seulement à des débits bas de la phase mobile, lorsque les molécules diffusent sans beaucoup avancer. Certaines molécules circulent plus rapidement et d'autres plus lentement par rapport à la vitesse moyenne, ce qui entraîne l'élargissement du pic chromatographique. Cet effet sera relativement plus

élevé lors d'un séjour long dans la colonne, à faible débit, ce qui constitue un domaine de vitesse non adéquat de la phase mobile, comme l'illustre la Figure 15. À noter que le terme B ne décrit que la diffusion moléculaire en direction longitudinale, alors que la diffusion radiale est incluse dans le terme A . La diffusion longitudinale est la cause des différences de concentration des analytes dans la phase mobile. Dans la zone centrale du pic chromatographique, la concentration de l'analyte est à son maximum, tandis qu'elle est plus faible au début et à la fin du pic. À débit plus élevé, il y aura une plus faible contribution de cet effet sur l'élargissement de la bande appliquée en tête de colonne. En pratique, il est préférable de sélectionner un débit qui minimise l'effet de diffusion longitudinale pour obtenir l'efficacité maximale d'une colonne.

Le terme B de l'équation de Van Deemter est aussi affecté par la viscosité, la température, le coefficient de diffusion et la grosseur moléculaire, qui est presque équivalente au poids moléculaire. Une augmentation de la température et du coefficient de diffusion fait augmenter le terme B , tandis qu'une augmentation de la viscosité le diminue. Les coefficients de diffusion de composés dans des liquides sont généralement très faibles. Aux débits habituels utilisés en HPLC et en UPLC, la vitesse de la phase mobile est beaucoup plus élevée que le coefficient de diffusion du composé en solution et l'influence préjudiciable du terme B est alors négligeable.

Le terme C de l'équation de Van Deemter correspond au transfert de masse, c'est-à-dire à l'échange des analytes de l'échantillon entre la phase stationnaire et la phase mobile durant la séparation. Le terme C peut être divisé en deux termes de transfert de masse, C_m et C_s . Le terme C_m , dont l'Équation 7 définit les paramètres, décrit les contributions de la phase mobile lors de l'élargissement des pics de la chromatographie. Parce que la vitesse linéaire est plus faible près des parois de la colonne et des particules de la phase stationnaire qu'au centre de la colonne et loin des particules, les analytes se déplacent à différentes vitesses. Ceci a pour effet d'élargir la bande appliquée en tête de colonne dans la phase mobile. Dans l'équation de C_m , C'' est un facteur constant relié au facteur de rétention (k') du pic d'intérêt. Le terme ω est en relation avec le volume de phase mobile dans la colonne accessible à l'intérieur des pores de la phase stationnaire et entre les particules de celle-ci. La porosité des particules et la viscosité de la phase mobile sont donc des facteurs qui affectent la valeur de C_m . Un paramètre qui affecte de façon

importante la valeur de C_m et le transfert de masse est la taille des particules, dp , puisque ce terme est au carré dans l'équation.

$$C_m = \frac{C'' \omega dp^2}{D_m} \mu$$

Équation 7 : Paramètres influençant C_m

Le terme C_s , quant à lui, décrit l'apport de la phase stationnaire dans l'élargissement des pics chromatographiques. Ce terme est déterminé par la quantité de phase stationnaire, la durée des interactions entre les molécules de l'échantillon et celle-ci et la distance que ces molécules ont à parcourir. Le terme C_s est affecté par la qualité de la phase stationnaire, c'est-à-dire le remplissage et la sphéricité des particules, le diamètre des particules, le facteur de rétention (k'), le coefficient de diffusion dans la phase stationnaire, la viscosité de la phase mobile, la température et la vitesse linéaire.

Les molécules sont retenues sur une colonne chromatographique par leurs interactions avec la phase stationnaire. Il y a ainsi un transfert de masses continu entre la phase mobile s'écoulant dans la colonne et la phase stationnaire immobile, tout au long de la séparation. Afin de maintenir un équilibre de partition, certaines molécules immobilisées sur la phase stationnaire retournent dans la phase mobile, alors que d'autres en mouvement se fixent. La résistance au transfert de masse est dépendante de la vitesse avec laquelle l'équilibre de partition entre la phase mobile et la phase stationnaire se produit. Puisque la résistance au transfert de masse n'est pas identique pour toutes les molécules de même espèce, il y aura élargissement des pics lors de la chromatographie. En effet, cette résistance au transfert de masse dépend de l'endroit dans la colonne où est situé la molécule à un temps donné, ainsi que la distance que celle-ci aura à parcourir afin d'atteindre l'équilibre de partition entre les phases.

Lorsqu'une molécule peut se déplacer rapidement de la phase mobile à la phase stationnaire, l'efficacité de la colonne est grandement améliorée. La vitesse à laquelle les analytes passent d'une phase à l'autre est reliée au coefficient de diffusion pour une phase mobile donnée. Les molécules avec un coefficient élevé de diffusion dans la phase mobile auront besoin de moins de temps pour effectuer ce passage. Le même principe

s'applique pour le passage de l'intérieur à l'extérieur des pores de la phase stationnaire. La viscosité et la température ont aussi un effet sur ce phénomène de diffusion.

Un équilibre est atteint plus facilement avec un fort coefficient de diffusion des analytes dans la phase mobile, ainsi qu'un petit diamètre de particules. Ceci signifie que la contribution de C_m et C_s à la hauteur des plateaux théoriques diminue et la séparation est plus efficace. La contribution des deux termes C à l'élargissement général des pics de la chromatographie diminue avec une augmentation de la vitesse linéaire de la phase mobile. Lors de cette augmentation de vitesse, l'échange des analytes entre la phase mobile et la phase stationnaire est assez rapide pour garder l'équilibre optimum entre ces deux phases. Si cet équilibre n'est pas maintenu, les analytes diffusent et la qualité de la séparation se détériore avec l'élargissement des pics. Il peut être remarqué sur la Figure 21, qui présente la fonction H (*HEPT*) obtenu à l'aide de la combinaison des trois termes A , B et C , qu'idéalement la pente du terme C en fonction de la vitesse doit être la plus petite possible, afin d'éviter une dégradation de la qualité chromatographique découlant d'une augmentation de la hauteur des plateaux théoriques. Une colonne remplie de particules de faible diamètre, une phase mobile de faible viscosité et une température élevée permettent de réduire significativement la pente du terme C de l'équation de Van Deemter et améliorer ainsi l'efficacité générale de la séparation.

L'équation de Van Deemter permet d'expliquer théoriquement les avantages que le UPLC a apportés à la chromatographie liquide. Comme le démontre la Figure 17, la technologie UPLC a permis de diminuer les temps d'analyses, tout en conservant la résolution, puisque la vitesse linéaire optimale couvre une plage plus étendue en débit. Le débit de la phase mobile en UPLC peut être environ augmenté d'un facteur neuf, sans qu'il n'y ait détérioration de la qualité de la séparation. Cette avancée technologique a aussi permis d'améliorer le facteur H (*HEPT*) obtenu dans l'équation de Van Deemter, en abaissant sa valeur minimale par l'utilisation de particules de tailles de 1,7 μm à 2,0 μm par rapport aux particules de 10 μm des années soixante-dix, comme présenté dans la Figure 18. Ceci a eu pour effet d'augmenter drastiquement la capacité de séparation des colonnes et a permis l'obtention d'une meilleure résolution de mélanges pour une même longueur de colonne donnée. En résumé, l'UPLC/UHPLC a connu un essor important durant les dernières années pour ses gains en résolution et en vitesse d'analyse, ce qui en explique l'engouement présentement en chimie analytique.

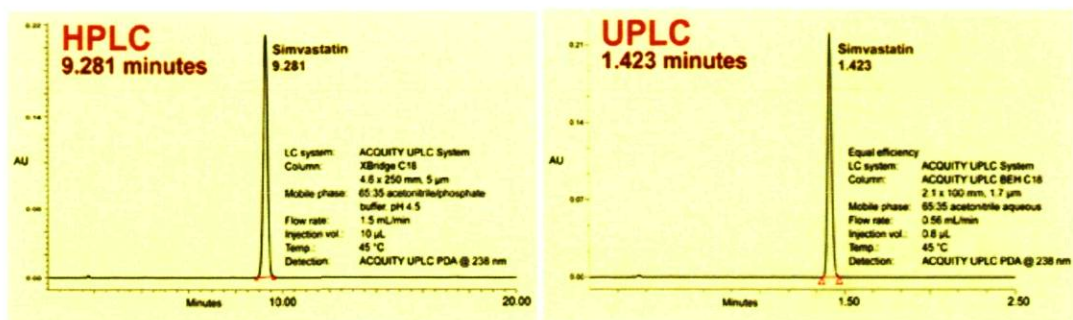


Figure 17 : Comparaison des temps d'analyse en HPLC et en UPLC pour des résolutions identiques

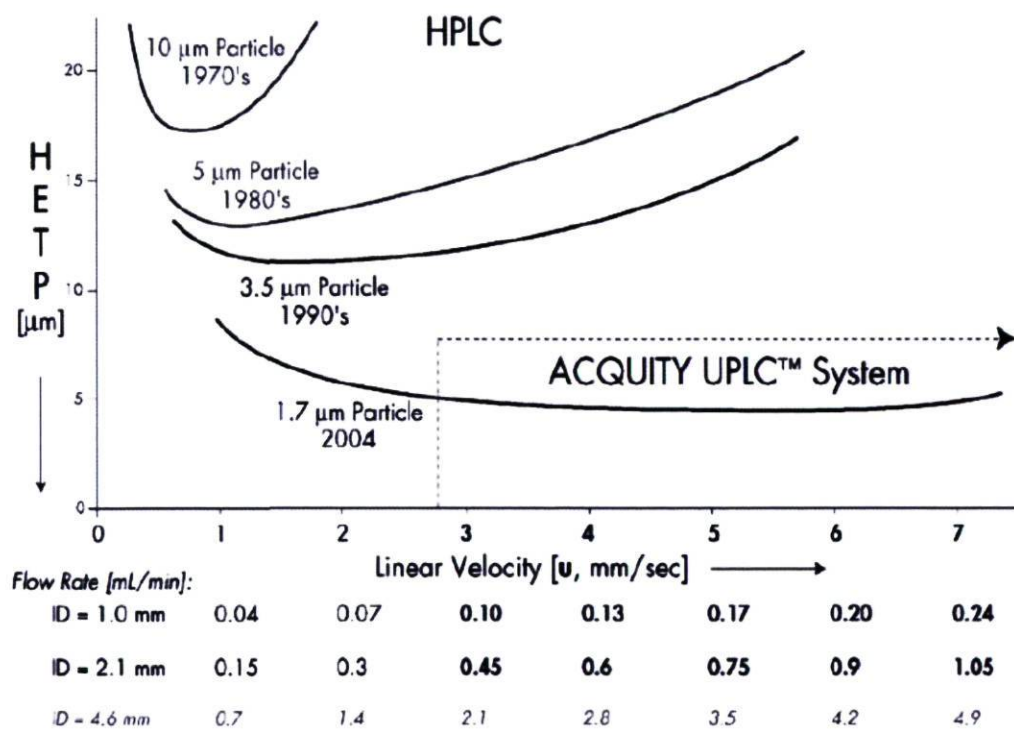


Figure 18 : Comparaison des courbes de Van Deemter pour différentes tailles de particules

2 La spectrométrie de masse

La spectrométrie de masse est une technique analytique puissante utilisée pour identifier et quantifier des composés inconnus, ainsi qu'élucider leur structure. Une détection de plusieurs molécules d'un mélange peut être accomplie, et ce, à des seuils de l'ordre de 10^{-12} à 10^{-18} g, selon la configuration de l'instrument. Cette deuxième section du chapitre traite de la spectrométrie de masse en général, des configurations d'instruments les plus populaires et porte un intérêt particulier aux techniques de détection par simple et triple quadripôle, puisque ce type de détection a été mis à profit dans le contexte de ce projet. Encore ici, un bref historique de la spectrométrie de masse et de son récent couplage à la chromatographie liquide fait état d'introduction.

2.1 Historique de la spectrométrie de masse et de son interfacement avec la chromatographie liquide

Le premier spectrogramme de masse a été obtenu en 1913 grâce à J.J. Thomson⁷¹. Lui et son assistant de recherche, F. W. Aston, effectuaient des travaux sur les électrons et les rayons cathodiques, à l'aide d'un tube sous vide muni d'électrodes et contenant une très faible pression de néon. Ils placèrent ce tube à travers des champs électrique et magnétique et se servirent d'une plaque photographique pour capturer l'image des d'atomes déviés par les champs, comme le présente la

Figure 19. Ils observèrent, entre autres, deux trainées lumineuses juxtaposées sur la plaque, qui suggéraient deux paraboles de déflexion distinctes. Ils conclurent alors que le néon devait être composé d'atomes de masses différentes, le ^{20}Ne et le ^{22}Ne , communément appelés aujourd'hui isotopes. Ce fut la première preuve d'existence d'isotopes pour un élément stable. Dans son ouvrage intitulé « Rays of Positive Electricity and Their Application to Chemical Analysis », J.J. Thomson prédit que cette nouvelle technique pourrait être profitable pour l'analyse de molécules en chimie. F. W. Aston poursuivit les recherches entreprises sur les isotopes et bâtit, de 1919 à 1937, trois spectromètres de masse de plus en plus performants. C'est d'ailleurs à lui, ainsi qu'à A. J. Dempster, que l'on doit encore aujourd'hui beaucoup de concepts utilisés en spectrométrie de masse moderne.

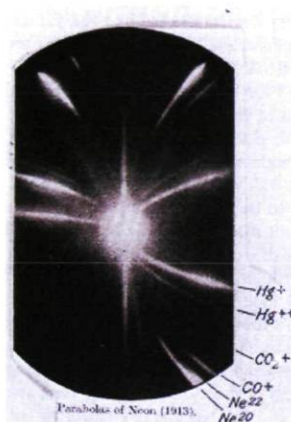


Figure 19 : Plaque photographique représentant les premiers travaux enregistrés sur spectrogramme de masse

Il faut attendre 1942 pour que le premier spectromètre de masse commercial voie le jour. Durant la première décennie après sa commercialisation, ce spectromètre de masse est utilisé presque exclusivement à la quantification d'hydrocarbures volatils⁷²⁻⁷⁴. Au début des années cinquante, les journaux scientifiques font paraître plusieurs publications répertoriant l'utilisation de la spectrométrie de masse afin de caractériser et quantifier d'autres composés. Leurs auteurs travaillent souvent pour le laboratoire de spectroscopie de Dow Chemical Company⁷⁵⁻⁸². C'est à la fin des années cinquante que les premiers travaux de chromatographie couplée à la spectrométrie de masse sont effectués^{83, 84}. En effet, en 1955, Gohlke et McLafferty couplent un chromatographe en phase gazeuse artisanal, illustré en Figure 20, à un spectromètre de masse à temps de vol (TOF) utilisé en recherche. Cette configuration de GC-MS unique permet la séparation et l'identification de composés comme le méthanol, l'acétone, le benzène, le toluène et le tétrachlorure de carbone. Plusieurs travaux novateurs en spectrométrie de masse combinés à la chromatographie gazeuse sont initialement effectués dans les laboratoires de Dow Chemical. Les Figure 21 et Figure 22 présentent un GC-TOF utilisé chez Dow en 1957 ainsi que des spectres de masse enregistrés à l'aide de cet instrument sur des films Polaroid pour de l'acétone, du benzène et du toluène, respectivement.

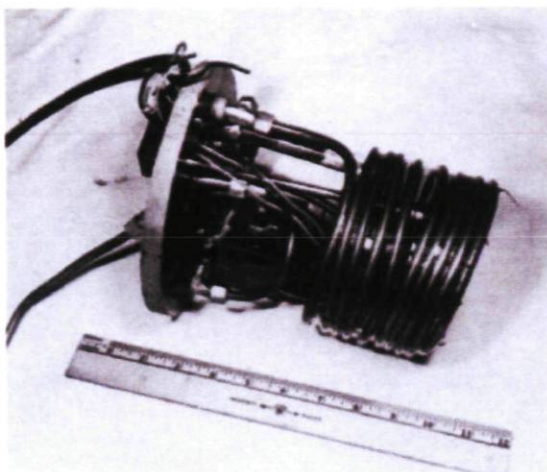


Figure 20 : Chromatographe gazeux construit à Dow Chemical en 1955

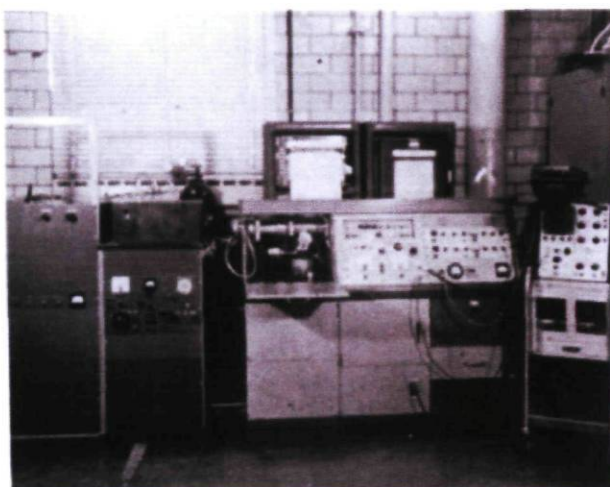


Figure 21 : GC-TOF utilisé dans les laboratoires de spectroscopie de Dow Chemical en 1957

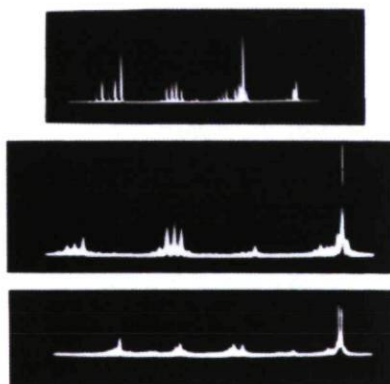


Figure 22 : Spectres de masse respectifs de l'acétone, du benzène et du toluène

Commercialement, l'interfaçage des premiers chromatographes en phase gazeuse date des années soixante par la compagnie Finnigan, tel que présenté en Figure 23. Cette combinaison permet à des analytes, déjà séparés par chromatographie en phase gazeuse, d'être détectés par leur rapport masse sur charge (m/z). Dans les années 90, l'interfaçage des instruments de GC-MS avec des ordinateurs devient omniprésent et les compagnies développent des logiciels de contrôle et de traitement de données.



Figure 23 : Le premier GC-MS commercial de Finnigan Instrument Corporation, modèle 1015

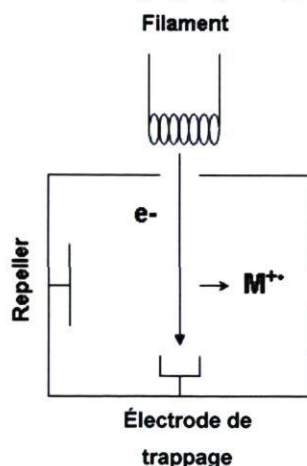
Toutefois, l'interfaçage LC-MS n'est toujours pas réalisé en raison, principalement, de la difficulté d'éliminer la phase mobile liquide avant l'entrée des analytes dans le spectromètre de masse opérant sous un vide poussé. Une percée technologique intervient suite au développement par l'équipe de John B. Fenn de l'*electrospray*, une technique où la désolvatation et l'ionisation des analytes se font de façon simultanée. J.B. Fenn a d'ailleurs reçu un prix Nobel de chimie en 2002 pour cette innovation importante, qui permet enfin le développement des appareils commerciaux de LC-MS dans les années 1990. Aujourd'hui, deux principales techniques d'ionisation sont commercialisées par la majorité des fabricants de HPLC-MS, l'ionisation par *electrospray* (API-ESI) et l'ionisation chimique à pression atmosphérique (APCI).

2.2 Les principes d'ionisation en spectrométrie de masse

L'introduction au cœur du spectromètre de masse nécessite l'ionisation des molécules entrant dans le système, puisque celles-ci sont guidées à l'aide de différences de potentiels dans l'enceinte sous vide. C'est, entre autres, grâce à ce jeu de potentiels que la sélection de masse est possible puisque la très grande majorité des composés organiques ne sont pas ioniques. Les points suivants présentent les principales sources d'ionisation utilisées en spectrométrie de masse dans le secteur de la métabolomique.

2.4.1 L'impact électronique

Les sources en impact électronique (*EI*) sont utilisées principalement en chromatographie gazeuse sur des systèmes commerciaux. Ce principe d'ionisation implique l'utilisation d'un filament, chauffé par le passage d'un courant électrique, qui émet des électrons en raison de l'agitation thermique. Ces électrons, repoussés par une différence de potentiel de 70V, bombardent les molécules pénétrant la chambre, ce qui cause leur ionisation et leur fragmentation. Une électrode désignée « *repeller* » repousse alors les ions à l'intérieur de l'analyseur de masses. La Figure 24 présente un schéma simplifié d'une source à impact électronique. Ce type d'ionisation est considéré comme agressif et est presque exclusivement utilisé en spectrométrie de masse avec simple analyseur. En *EI* mode balayage (*scan*), on observe un patron de fragmentation qui permet l'identification



de molécules par comparaison avec une banque de spectres. Cette comparaison est possible grâce à l'utilisation par tous les fabricants d'instruments d'une ddp de 70V pour le bombardement *EI*. Les impacts électroniques ont alors une énergie suffisante pour causer une certaine fragmentation, sans pour autant pulvériser les molécules. Enfin, le mode d'analyse par ions simples (*SIM-Single Ion Monitoring*) permet une détection et une quantification spécifique et sensible des composés entrant le spectromètre de masse.

Figure 24 : Schéma des composantes d'une source à impact électronique

2.4.2 L'ionisation chimique

L'ionisation chimique (*CI*) est aussi utilisée en chromatographie gazeuse. Le principe de ce mode d'ionisation réside dans l'utilisation d'un gaz, qui devient chargé dans la source et entre en contact avec les molécules pénétrant la chambre. Ces collisions permettent alors des transferts de charges du gaz aux molécules d'analyte et permet l'entrée des ions générés dans le système de sélection de masse par différence de potentiel. Les gaz couramment employés sont l'ammoniaque (NH_3), le méthane (CH_4) et l'isobutane (C_4H_{10}). Ce type d'ionisation peut généralement être décrit à l'aide de deux étapes : la formation d'un ion réactif et la formation des produits de réactions. Lors de la formation d'ions réactifs, le gaz utilisé, par exemple l'ammoniaque, est soumis à un impact électronique pour être ionisé, comme dans le Schéma 3 ci-dessous. L'ion ammonium est alors disponible pour la seconde étape, la formation de produits de réactions par collision avec les analytes (M) entrant dans la source. Il y a alors, soit formation de l'ion moléculaire protoné (Schéma 4), soit la formation d'un adduit d'ammonium (Schéma 5). Certains ions négatifs peuvent aussi être formés, en mode négatif désigné sous l'acronyme anglais *NCI*, par transfert d'un proton de l'analyte (M) à certaines espèces ioniques réactives provenant du gaz ou des analytes ($[M-H]^-$), ou par perte d'un électron dans la source (M^-). La technique *NCI* peut être utilisée pour des composés comme les pesticides ou les biphényles polychlorés (BPC) et permet d'atteindre de basses limites de détection.

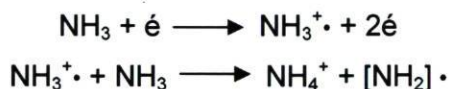


Schéma 3 : Formation de l'ion primaire ammonium



Schéma 4 : Formation d'ion moléculaire par transfert de proton



Schéma 5: Formation d'adduit d'ammonium

Ce principe d'ionisation est considéré comme doux et peut être utilisé en spectrométrie de masse à simple analyseur ou en spectrométrie de masse tandem. En effet, puisque les ions sont fragmentés à deux reprises en spectrométrie de masse tandem, il est essentiel de préconiser un principe d'ionisation doux lors de l'entrée dans le spectre de masse. En GC-MS/MS, le premier analyseur sélectionne l'ion moléculaire, présent en grande quantité grâce à l'ionisation CI douce. Cet ion est ensuite fragmenté dans la chambre de collisions et les fragments caractéristiques des analytes sont alors quantifiés par le second analyseur. Si une ionisation agressive comme l'impact électronique était utilisée, une forte perte en signal serait constatée, car les molécules seraient fortement fragmentées dès leur entrée dans le système.

2.4.3 L'ionisation à pression atmosphérique (*API-ES*, *APCI* et *APPI*)

Comme le nom l'indique, ce type d'ionisation est effectué à pression atmosphérique. L'ionisation à pression atmosphérique, désignée sous l'acronyme anglais *API*, regroupe les trois modes principaux d'ionisation en chromatographie liquide : l'ionisation par *electrospray*, l'ionisation chimique et la photo-ionisation. L'utilisation d'une technique par rapport à une autre sera grandement influencée par la polarité et la masse moléculaire des molécules à analyser. La Figure 25 met en relation la polarité d'un composé, sa masse et les techniques possibles pour permettre son ionisation.

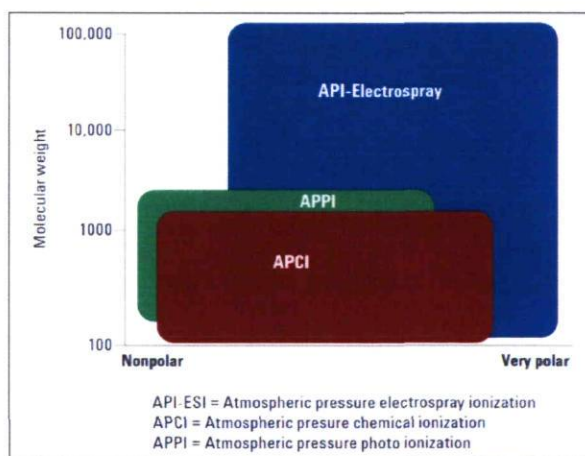


Figure 25 : Relation entre la polarité d'un composé, sa masse moléculaire et le type de source permettant son ionisation

L'ionisation par *electrospray* (*API-ES*), qui est la plus courante, implique l'utilisation d'un nébuliseur alimenté par un gaz inerte chauffé, l'azote étant presque toujours utilisé. La phase mobile du chromatographe pénètre la chambre de désolvatation et d'ionisation par l'aiguille d'un nébuliseur qui est portée à un potentiel de l'ordre de quelques kilovolts par rapport à l'enceinte de la chambre. Les fines gouttelettes chargées qui sont obtenues sont évaporées sous l'action de la chaleur et du jet de gaz. Le diamètre des gouttelettes de liquide devient de plus en plus petit tout au long de leur parcours à l'intérieur de la chambre. Alors que le diamètre des gouttelettes diminue, des molécules d'analytes s'évaporent de leur surface en entraînant une ou plusieurs charges. Enfin, lorsque les gouttelettes deviennent très petites, la force coulombienne exercée entre les mêmes charges entraîne leur explosion. Les analytes se retrouvent alors ionisés en phase gazeuse à l'intérieur de la chambre et peuvent entrer dans le spectromètre de masse. Le vide et les différences de potentiels permettent cette introduction. La Figure 26 illustre le principe d'ionisation en *electrospray*.

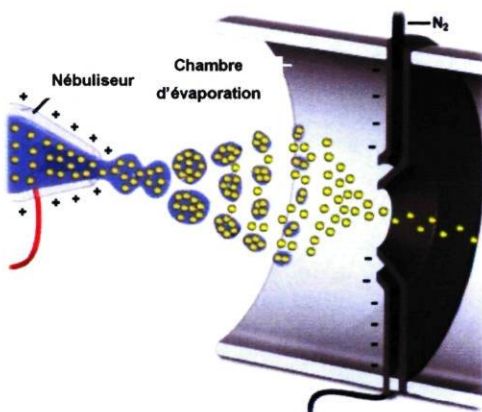


Figure 26 : Schéma du principe d'ionisation en *electrospray*

L'ionisation chimique à pression atmosphérique met en jeu (*APCI*), comme le *CI*, le transfert de charge d'une molécule à une autre. Contrairement au *CI*, la phase mobile peut aussi être le vecteur de charges lors de cette ionisation. Comme en *electrospray*, un nébuliseur est utilisé, mais la pointe de celui-ci n'est pas chargée. C'est une aiguille, appelée *corona*, placée perpendiculairement à la sortie du nébuliseur qui est responsable de l'ionisation. Une différence de potentiels élevée est appliquée sur cette aiguille et entraîne une génération de charges électriques. Ces charges permettent alors d'ioniser les gaz ambiants. Les principaux ions responsables de l'ionisation en mode positif sont

formés selon le schéma 6 ci-dessous⁸⁵. Par la suite, un transfert de charges rapide est effectué par collision entre l'espèce ionisée et l'analyte. L'ion formé peut alors pénétrer le spectre de masse. L'ionisation *APCI* est considéré comme légèrement plus agressive que l'électrospray, puisqu'elle permet d'induire dans certains cas une ionisation et une fragmentation simultanées. Toutefois, la nature de cette fragmentation est fortement dépendante de la conception de l'interface *APCI* du fabricant.

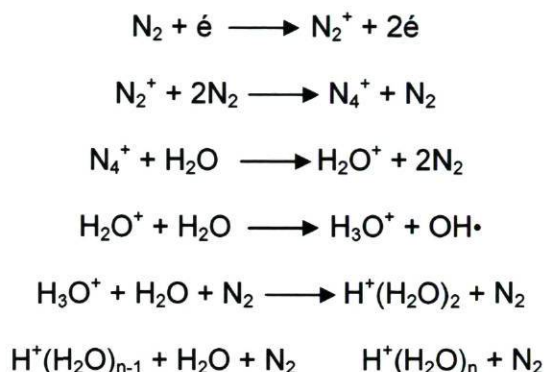


Schéma 6 : Réactions de formation d'espèces réactives en *APCI* mode positif

La photoionisation à pression atmosphérique (*APPI*), quant à elle, met en jeu des photons provenant d'une lampe à décharge pour effectuer l'ionisation (Figure 27). L'absorption d'un photon par un analyte entrant dans la chambre génère l'état excité de cette même molécule (Schéma 7). Si l'énergie d'ionisation est plus faible que $h\nu$, la molécule libérera un électron menant à la formation d'un cation à nombre d'électrons impairs (Schéma 8). Ce type de comportement est utilisé pour l'ionisation de molécules contenant une conjugaison de liaisons doubles, comme les composés aromatiques⁸⁶.

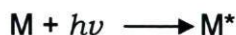


Schéma 7 : Absorption d'un photon par une molécule



Schéma 8 : Ionisation d'une molécule via la libération d'un électron

Cependant, lorsque l'énergie d'ionisation est plus grande que $h\nu$, la molécule peut passer par différents processus de relaxation, soit la photodissociation, l'émission de photon ou la relaxation via une collision avec une molécule non excitée. Dans de tels cas, l'utilisation d'une molécule qui se photo-ionise de façon préférentielle, appelé un agent dopant, est

nécessaire. L'agent dopant est utilisé en grande quantité par rapport aux analytes et permet l'ionisation par transfert de charge.

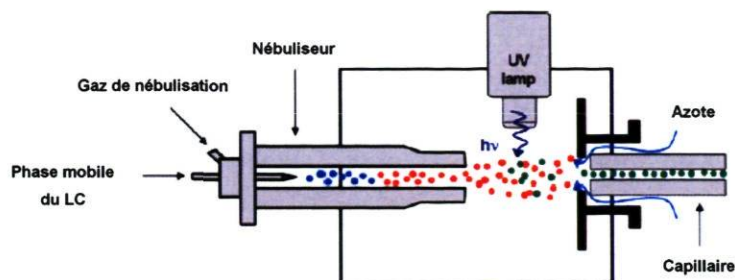


Figure 27 : Schéma du principe d'une source APPI

2.3 La sélection de masse

Il existe plusieurs types d'analyseurs de masse, qui utilisent divers principes pour séparer et identifier les rapports masse/charge (m/z). Ces systèmes opèrent sous de grands vides, de l'ordre de 10^{-5} - 10^{-7} Torr, afin de permettre le transport et la séparation des ions sous forme gazeux dans le système selon leur rapport masse/charge (m/z) par différents principes physiques. Cette technique est utilisée dans tous les domaines scientifiques pour caractériser la structure chimique et quantifier diverses molécules. On classe les spectres de masse selon le type d'expérimentation qu'ils permettent et la nature des données générées.

2.4.1 La spectrométrie de masse à analyseur simple

Pour cette catégorie d'analyseur, un seul type d'analyseur est utilisé afin de générer le spectre de masse. Ces analyseurs sont définis comme des instruments qui génèrent des spectres MS^1 , c'est-à-dire qu'aucune seconde fragmentation n'est effectuée après ionisation dans la chambre d'introduction. Par contre, certains spectromètres de masse à simple analyseur sont en mesure de générer de l'information MS^n , que l'on peut définir comme une fragmentation suivie d'un passage dans le spectromètre de masse, n fois consécutivement. Les principaux analyseurs simples utilisés en spectrométrie de masse sont présentés ci-dessous.

2.3.1.1 Le quadripôle

Le quadripôle est constitué de quatre tiges conductrices parallèles. Il agit comme un filtre pour les ions. Le potentiel des tiges est ajusté pour qu'à un instant donné seuls les ions

d'un certain rapport m/z puissent franchir la cavité au centre des tiges (Figure 28). En mode *scan*, un balayage de potentiel est effectué afin de faire la détection des ions de différents rapports m/z . La largeur de plage de balayage influence alors drastiquement la sensibilité, puisque le travail du détecteur est beaucoup plus important pour un large spectre de masses. Les quadripôles sont principalement conçus pour opérer en mode *S/M* (*Single Ion Monitoring*), un mode d'analyse où le détecteur se concentre sur quelques ions seulement. Ce mode de détection permet présentement les meilleures sensibilités pour un composé connu, c'est-à-dire dont les principaux ions caractéristiques sont connus pour la quantification. Cependant, ce type d'analyseur travaille uniquement en masse nominale, i.e. avec une précision de ± 1 , ce qui implique que la résolution de cette technique est limitée. Le quadripôle est omniprésent aussi bien en chromatographie gazeuse qu'en chromatographie liquide, lorsque la concentration d'un ou de plusieurs composés doit être mesurée.

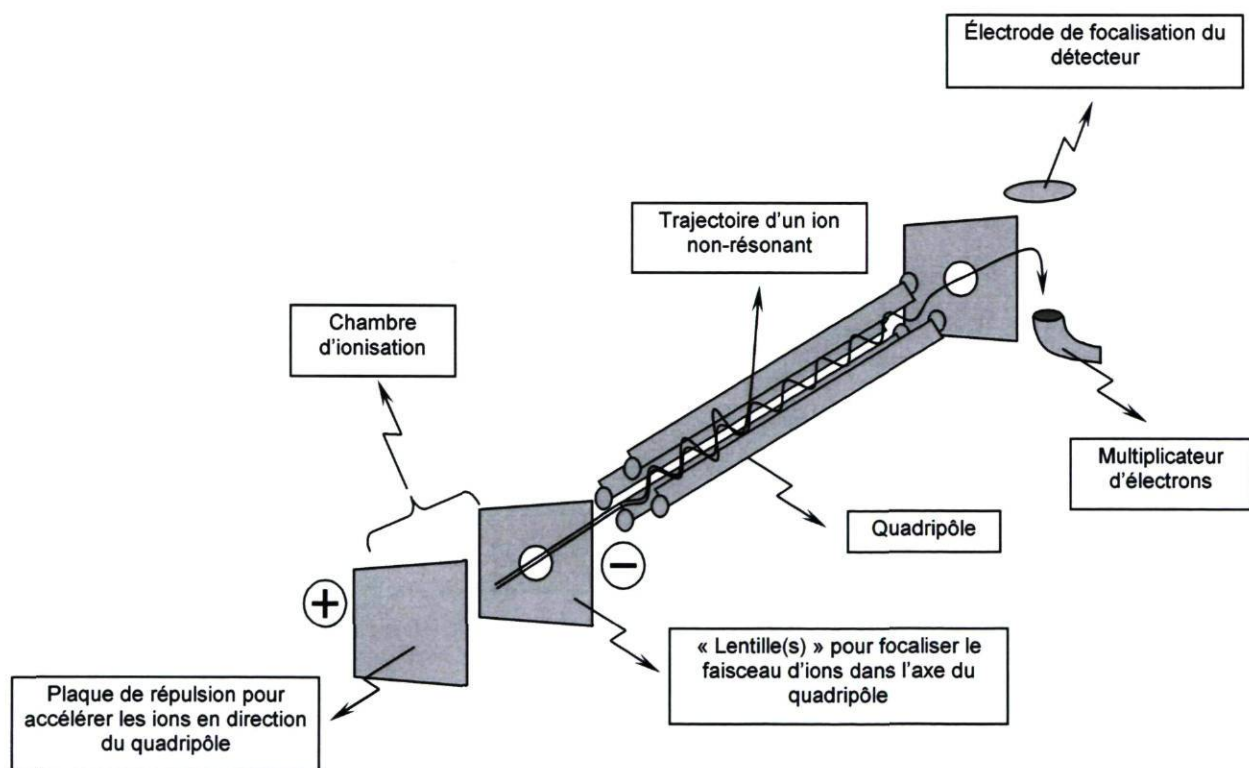


Figure 28 : Schéma représentant les principales composantes d'un spectromètre de masse à simple quadripôle

2.3.1.2 Le temps de vol

Dans les spectromètres à temps de vol, les ions sont d'abord accélérés par une impulsion de potentiel appliquée sur une plaque appelée plaque d'accélération. L'énergie cinétique acquise par tous les ions de même charge étant identique, les ions plus légers acquièrent une plus grande vitesse que les ions lourds. La séparation des ions se fait ensuite dans une zone de vol, appelée *drift tube*, d'une longueur d'environ un mètre. Au bout du tube se trouvent des électrodes qui constituent le réflectron, dont le rôle est de repousser les ions vers l'autre extrémité du tube. La trajectoire totale des ions menant au détecteur a donc une forme de V. Un des avantages de cette configuration est de doubler le temps de vol, ce qui améliore grandement la résolution. De plus, une focalisation des ions de même rapport m/z est possible au réflectron, puisqu'ils n'ont pas tous la même vitesse initiale avant d'être poussés par la plaque d'accélération à l'entrée du spectromètre de masse. Les ions plus rapides pénètrent plus loin à l'intérieur du réflectron, ce qui les retarde légèrement par rapport aux ions plus lents. Cette façon de procéder permet de s'assurer que tous les ions de même rapport m/z arrivent en même temps au détecteur. Ce type d'analyseur est extrêmement rapide et aucun compromis n'est fait en mode *scan*. Le détecteur utilisé est de nature optique, généralement un photomultiplicateur plutôt qu'un multiplicateur d'électrons, puisque ces derniers ne sont pas assez rapides pour détecter efficacement tous les ions touchant le système de détection Figure 29. Ce type de spectromètre de masse est principalement utilisé en analyse qualitative, car il génère de l'information en masse exacte. En effet, la résolution de ces systèmes permet de fournir un ratio m/z d'une précision de l'ordre du ppm, c'est-à-dire de l'ordre ± 0.0001 unité de masse pour des molécules de masses inférieures à 1000 g/mol.

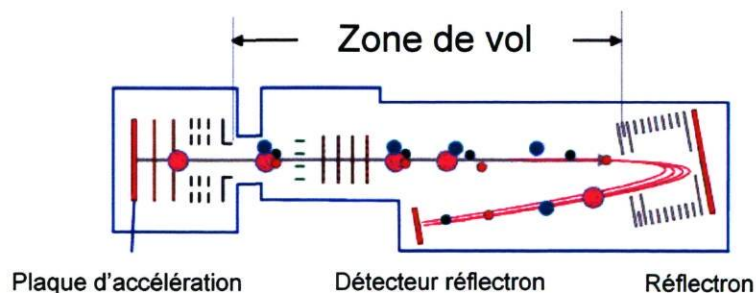


Figure 29 : Schéma représentant les principales composantes d'un spectromètre de masse à temps de vol

2.3.1.3 La trappe ionique

Il existe aujourd'hui deux types de trappes ioniques. Les trappes ioniques dites classiques, parfois désignées sous le nom de trappe 3D, sont formées de deux électrodes superposées, de forme hémisphérique, et d'une électrode centrale de forme annulaire (Figure 30). En GC, l'ionisation par impact électronique se fait à l'intérieur de la trappe. Par contre, en LC, l'ionisation se fait dans la chambre de désolvatation. Les ions, conduits par le système de transmission, pénètrent ensuite la partie centrale du filtre où une radiofréquence fixe, appliquée à l'électrode annulaire, les confine dans l'espace central. La tension des électrodes est alors augmentée, afin d'expulser les ions vers le détecteur selon leur m/z croissant. Ces trappes permettent de faire de la spectrométrie de masse multiple, MS^n . Dans ce cas, un ion d'intérêt peut être isolé dans la trappe et les autres ions sont rejetés. Cet ion percute ensuite un jet de gaz inerte, soit de l'hélium ou de l'argon, qui possède suffisamment d'énergie pour induire la fragmentation de l'ion parent. Les fragments n'ont pas la même énergie de résonance que les ions parents. Les fragments sont ensuite analysés selon le même principe d'augmentation de la tension sur les électrodes que ce qui a été décrit précédemment. Les trappes rendent ainsi possible l'utilisation successive des étapes d'isolation, de fragmentation et de détection, ce qui conduit à des spectres MS^n . Bien qu'un seul analyseur soit utilisé, l'information qui peut être obtenue de ces instruments est comparable aux spectres de masse en tandem décrits plus loin.

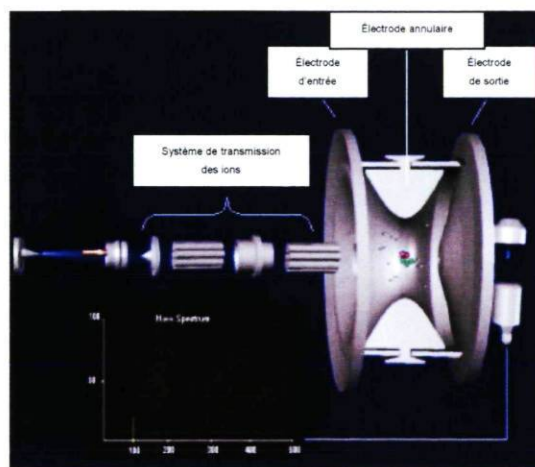


Figure 30 : Schéma d'une trappe ionique classique 3D

Le deuxième type de trappe ionique est la trappe linéaire. Elle est constituée d'un quadripôle segmenté en trois parties et ces parties sont isolées par des céramiques (Figure 31). En ajustant les potentiels sur les différentes sections, les ions peuvent être trappés dans la cavité centrale. Après une certaine durée d'accumulation des ions, qui permet d'optimiser la sensibilité des analyses, les potentiels appliqués forcent la sortie des ions vers le ou les détecteurs. Tout comme la trappe ionique 3D, la trappe linéaire permet d'obtenir des spectres MS^n .

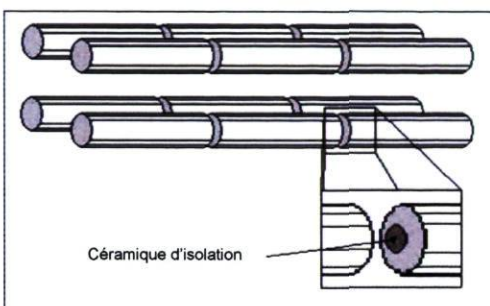


Figure 31 : Schéma des quadripôles d'une trappe ionique linéaire

2.3.1.4 Le secteur magnétique et la résonance cyclotron à transformée de Fourier

Les instruments à secteur magnétique sont les premiers spectromètres de masse qui ont été inventés. Ces instruments sont aujourd'hui très rares et utilisés principalement dans le secteur de la recherche. Toutefois, certaines compagnies comme Thermo, Waters et JEOL vendent toujours, de façon commerciale, ce type de spectromètre de masse. Ces instruments ont l'avantage d'offrir de très hautes résolutions et une bonne sensibilité.

La spectrométrie de masse résonance cyclotron à transformée de Fourier est aussi une technique mature, tout comme la spectrométrie de masse à transformée de Fourier, mais diffère de par son système de détection. Ces spectres de masses sont principalement utilisés en recherche, bien qu'il existe certains instruments commerciaux. Ce type de spectre de masse représente la performance ultime au niveau de la résolution en masse.

2.4.2 La spectrométrie de masse tandem

La spectrométrie de masse tandem consiste à combiner deux analyseurs dans un même instrument, afin de bénéficier des avantages des deux systèmes d'analyse de masse et obtenir des spectres MS/MS ou MS^2 . À l'aide de ces instruments, on sélectionne une masse de façon précise sur le premier analyseur. Généralement, une chambre de collision

est placée en aval de ce premier analyseur et fragmente l'ion sélection, appelé le parent, en plusieurs ions, appelés filles (*daughter ions*). Il existe différents principes de fragmentation, mais le plus courant est la fragmentation par collision avec un gaz inerte comme l'argon. Le deuxième analyseur peut fonctionner selon deux modes, soit le balayage ou la sélection de filles précises. Le premier mode permet d'obtenir de l'information quant à la structure du parent sélectionnée, tandis que le deuxième mode est utilisé en analyse quantitative, puisqu'une grande partie du bruit chimique de l'échantillon est éliminée de cette façon, ce qui rend cette technique très sensible. Les sections ci-dessous présentent trois systèmes couramment utilisés pour effectuer des analyses en spectrométrie de masse tandem.

2.3.2.1 Le triple quadripôle

Bien que cet instrument soit une combinaison de deux quadripôles, le triple quadripôle, souvent désigné QQQ, tire son nom des premières configurations d'appareil dans lesquelles la chambre de collisions était constituée d'un quadripôle. Aujourd'hui, la chambre de collision est une série d'électrodes successives, qui permettent la transmission des ions et leur fragmentation (Figure 32). Comme mentionné auparavant, ce type d'analyseur travaille uniquement en masse nominale, c'est-à-dire à des différences de ± 1 m/z, mais offre actuellement la meilleure sensibilité en analyse quantitative. De surcroît, la combinaison de deux quadripôles demeure la meilleure combinaison possible pour la détermination des teneurs d'un composé, puisque ces filtres de masses permettent une réduction majeure des interférences chimiques en mode sélection d'ion

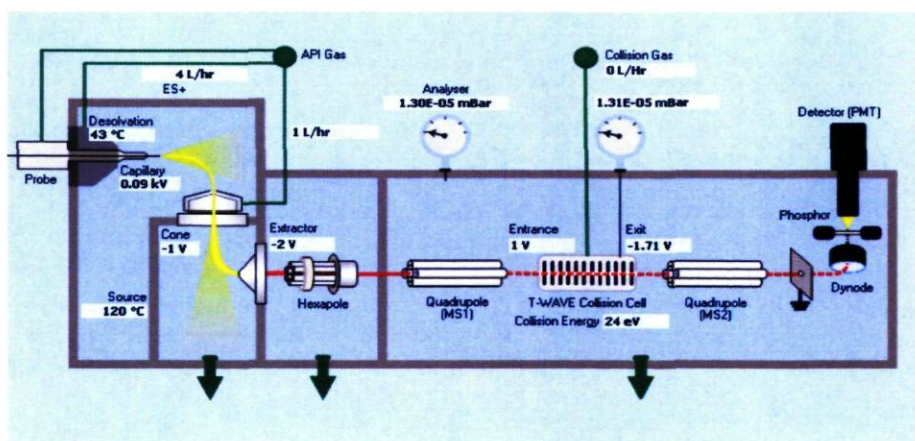


Figure 32 : Schéma des composantes typiques d'un triple quadripôle

Les spectromètres à triple quadripôle, ainsi que plusieurs autres systèmes tandem, peuvent être opérés selon quatre modes distincts : le mode MRM (*Multiple Reaction Monitoring*), le mode balayage filles, le mode balayage parents et la perte constante en masse neutre. En mode MRM, le premier quadripôle sélectionne seulement un parent désiré et l'amène à la chambre de collision. Après fragmentation, le deuxième quadripôle ne sélectionne, lui aussi, qu'un ou certains ions provenant du parent. Ce mode d'analyse est très sélectif et spécifique à ce qui est quantifié, ce qui permet d'augmenter significativement le rapport signal/bruit (S/N). Par exemple, le mode MRM est utilisé lors du dosage de stéroïdes dans l'urine des athlètes ou encore pour le suivi de molécules thérapeutiques dans le sang de patients lors d'études cliniques.

Les trois autres modes d'analyse fournissent de l'information qualitative sur ce qui est analysé. En mode balayage filles, le premier quadripôle sélectionne un ion spécifique. La cellule de collision fragmente cet ion et le second quadripôle travaille en balayage. Le spectre de masse obtenu présente les fragments caractéristiques de l'ion sélectionné au premier quadripôle, ce qui donne des informations sur la structure de celui-ci. Le mode balayage parents représente l'opération contraire du mode balayage fille. Le premier quadripôle travaille en balayage, tandis que le deuxième sélectionne des masses spécifiques. L'information générée renseigne sur tous les parents qui donnent un ou des ions filles caractéristiques lors de l'analyse. Finalement, en mode perte constante en masse neutre, les deux analyseurs balaient une gamme de masse simultanément et avec un décalage de masse constant. Le spectre établi présentera alors tous les ions parents capables de se fragmenter en générant un neutre de masse égale au décalage imposé.

2.3.2.2 L'Orbitrap

L'Orbitrap est un modèle récent de spectromètre de masse, inventé par Alexander Makarov en 1999, maintenant commercialisé par la compagnie *Thermo* (Figures 23 et 24). Cet analyseur est couplé à une trappe ionique linéaire. La trappe ionique linéaire permet des analyses dans une gamme de masse allant de 15 à 4000 m/z. Cet analyseur est constitué d'un quadripôle hyperbolique segmenté en trois parties. La géométrie de ce quadripôle offre un volume de piégeage des ions 10 à 100 fois supérieur à celui d'une trappe ionique conventionnelle. La trappe dispose de deux fentes d'éjection radiale et les ions sont détectés par deux détecteurs, permettant de doubler le rapport signal/bruit. Cette

trappe linéaire dispose de différents modes et vitesses de balayage permettant de faire un spectre MS complet, une analyse d'un ion spécifique (SIM) et de spectres MS d'ions sélectionnés après dissociation induite par collision.

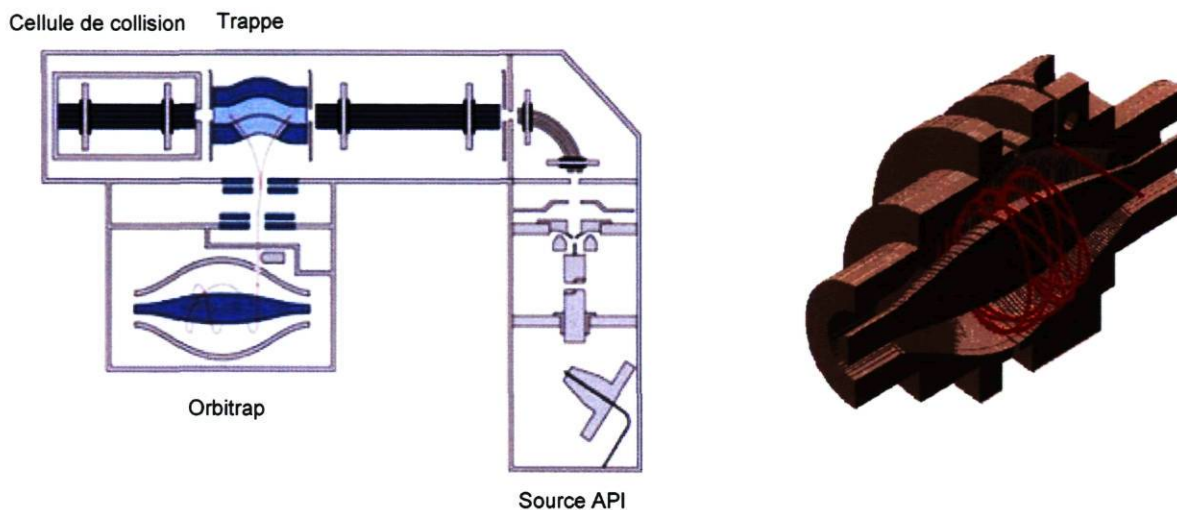


Figure 33 : Schéma de la configuration interne d'un spectromètre de masse Orbitrap

Le transfert des ions vers l'*Orbitrap* est assuré de façon axiale depuis la trappe linéaire par un octopole, qui amène les ions dans un piège intermédiaire. Les ions sont ensuite pulsés vers l'*Orbitrap*. L'*Orbitrap* est un piège à champs électrostatique, constitué d'un piège d'ions traversé par une électrode chargée. Les ions entrant dans ce piège acquièrent à la fois un mouvement de rotation autour de l'électrode et un mouvement axial le long de celle-ci. Ce mouvement axial génère un courant induit qui est enregistré par deux électrodes. Un calcul de transformée de Fourier permet de calculer la fréquence axiale des ions, (ω), elle-même dépendante du rapport m/z . L'avantage de cet analyseur est la résolution obtenue sur la masse, qui est légèrement supérieure à celle obtenue en temps de vol.

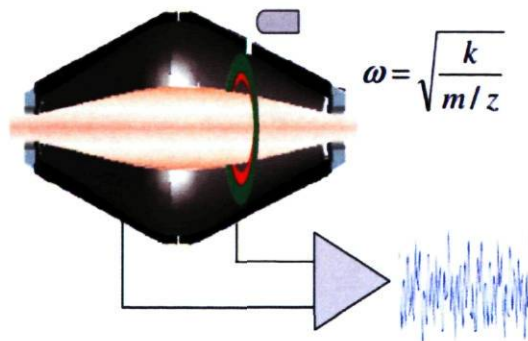


Figure 34 : Analyseur de masse Orbitrap

2.3.2.3 Le Q-TOF

Les appareils Q-TOF sont présentement en développement rapide en raison, notamment, des besoins en protéomique et en métabolomique. Un schéma d'un appareil Q-TOF est présenté à la Figure 35. Les rapports m/z des molécules à analyser sont sélectionnés par un quadripôle puis, suite à la fragmentation dans la cellule de collision, le spectromètre TOF mesure les quantités de tous les fragments. Cette combinaison d'analyseurs apporte une excellente sensibilité, une grande rapidité d'analyse et ses résolution et précision en masse sur les ions produits sont bien meilleures que ce qui peut être obtenu en triple quadripôle. Jusqu'à récemment, la limitation de ces instruments était la faible gamme dynamique du TOF. Toutefois, la dernière génération d'instruments de type Q-TOF permet la quantification sur quatre à cinq décades de concentration, ce qui les classe bons seconds par rapport aux appareils à triple quadripôle.

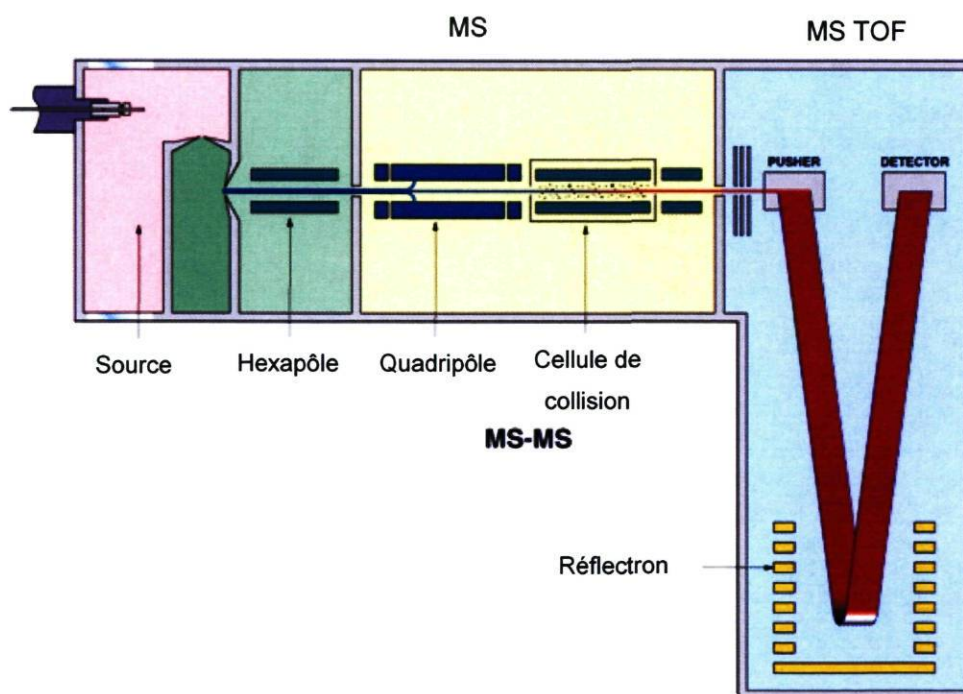


Figure 35 : Schéma représentant les composantes principales d'un Q-TOF

2.4.3 Les détecteurs

En ce qui a trait au système de détection, tout comme les sources et les analyseurs, il existe plusieurs principes physiques. Comme mentionné précédemment, les plaques photographiques sont le premier détecteur historiquement utilisé. La plaque est recouverte d'une émulsion de bromure d'argent et son noircissement donne une valeur relative de l'intensité des ions ayant touché cette plaque. Cette technique est archaïque et peu sensible.

Le multiplicateur d'électrons est l'un des détecteurs les plus utilisés en spectrométrie de masse. Le signal est amplifié par la formation d'électrons secondaires à l'aide de tubes en verre dopés au plomb, appelé dynodes. Ce détecteur possède une bonne sensibilité, mais offre une réponse trop lente pour être combiné, par exemple, à un analyseur à temps de vol. De surcroît, bien que son coût d'achat soit raisonnable, la durée de vie de ce détecteur est limitée.

Le photomultiplicateur utilise initialement le même principe que le multiplicateur d'électrons, soit la formation d'électrons secondaires à l'aide de dynodes successives. Cependant, ces électrons sont accélérés vers un écran phosphorescent, où ils sont convertis en photons. Ce sont ces photons qui sont ensuite détectés par le photomultiplicateur. Ce détecteur est sensible, puisqu'il possède une amplification forte, et il est utilisé combiné à très grand nombre d'analyseurs différents. La durée de vie du photomultiplicateur est bonne, mais son coût d'achat demeure élevé.

3 Le cytochrome P450

Le cytochrome P450 a été découvert à la fin des années cinquante^{87, 88}. Le CYP450 représente une famille de protéines qui métabolisent les substrats selon deux fonctions majeures^{89, 90}. Les CYP450 sont impliquées dans la biosynthèse, la bio-activation et le catabolisme des composés endogènes, comme les stéroïdes, les éicosanoïdes et les acides gras. Elles sont aussi impliquées dans la métabolisation des composés chimiques étrangers et des médicaments, exogènes à l'organisme. On attribue le titre enzyme CYP450 à toute protéine montrant un spectre d'absorption avec un maximum à 450 nm, provenant du complexe Fe^{2+} -monoxyde de carbone. La diversité du CYP450 est énorme, puisque ces enzymes sont retrouvées dans différentes espèces, incluant les bactéries, les moisissures, les levures, les plantes, les insectes, les poissons et les mammifères. Tous les gènes du CYP450 proviennent probablement d'un seul gène ancestral, qui a existé bien avant la différenciation entre les eucaryotes et les procaryotes⁸⁹.

Dû au large nombre d'enzymes CYP450, un système de nomenclature standardisé a été mis au point. La classification des enzymes est basée sur les homologues de la séquence en acides aminés de ces protéines. Les enzymes sont nommées CYP, représentant le cytochrome P450, suivi par un chiffre qui dénote l'appartenance à la famille, une lettre qui renseigne sur la sous-famille et un second chiffre qui représente l'enzyme individuelle. Les enzymes qui ont une séquence commune de plus de 40% en acides aminés sont considérées comme de la même famille, tandis que celles ayant une homologie en acides aminés de plus de 55% appartiennent à la même sous famille⁸⁹.

Les enzymes du cytochrome P450 ont comme principale fonction de convertir les molécules lipophiles, difficilement éliminables par l'organisme, en composés plus polaires. Cette biotransformation permet alors une excrétion directe de l'organisme ou une conjugaison subséquente par d'autres enzymes. Les produits de cette métabolisation sont beaucoup plus solubles dans l'eau, ce qui permet l'élimination via l'urine. Toutefois, certaines réactions des CYP450 peuvent transformer un composé chimique en molécule réactive, qui aura la capacité de se lier aux macromolécules et initier des réactions menant à des cancers^{90, 91}.

La métabolisation via le cytochrome P450 est décrite comme une voie phase I de bioconversion par insertion d'un atome oxygène, tandis que les phases II impliquent des

enzymes aptes à insérer un acide glucuronique (enzymes UDP-glucuronosyltransférases), un sulfate (enzymes sulfotransférases) ou encore conjuguer à un glutathione (enzymes glutathione S-transférases). La métabolisation en phase I par les CYP450 implique généralement l'insertion d'un atome d'oxygène selon le schéma 9 ci-dessous, où un équivalent réducteur du NADPH, fourni par la NADPH-CYP450 réductase, et une molécule d'oxygène entrent en jeu.



Schéma 9 : Équation générale de conversion d'une molécule (RH) en métabolite oxydé (ROH) sous l'action des CYP450

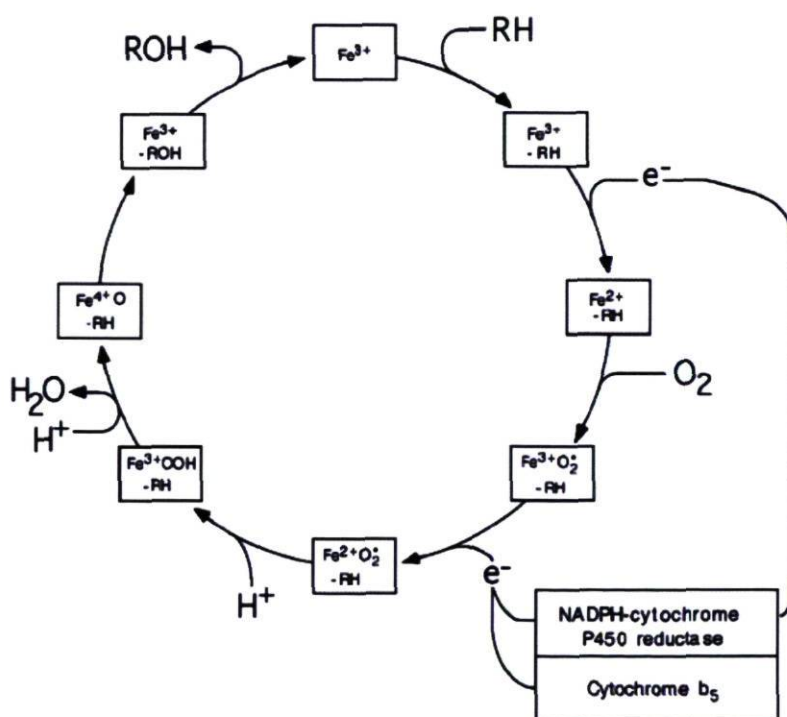


Figure 36 : Mécanisme catalytique d'insertion d'un oxygène par les CYP450

De façon schématique et plus détaillée, le mécanisme d'insertion catalytique d'un atome d'oxygène à une molécule, via les CYP450, peut être représenté selon la Figure 36. Le cycle catalytique débute lorsqu'une molécule se lie à la forme ferrique (Fe^{3+}) de l'enzyme. Le complexe enzyme-substrat est réduit par un transfert d'électron du NADPH, via la

NADPH-CYP450 réductase. Une molécule d'oxygène peut alors se lier au complexe enzyme-substrat et une espèce enzyme-O₂-substrat peut être formée suite à un second transfert d'électrons de la NADPH-CYP450 réductase ou du cytochrome b₅. L'étape suivante implique l'addition d'un proton menant à la formation du complexe enzyme-OOH-substrat. L'addition d'un second proton entraîne un clivage homolytique du lien O-O et le départ d'un oxygène sous forme d'eau. Finalement, l'atome d'oxygène retenu est inséré au substrat et le produit oxydé, c'est-à-dire le métabolite, est libéré, ce qui permet la régénération de l'enzyme sous sa forme ferrique^{92,93}.

Néanmoins, malgré la forme générale de métabolisation présentée ci-haut, il ne faut pas associer les CYP450 iniquement à des réactions d'oxydation via l'insertion d'un oxygène. En somme, les CYP450 peuvent catalyser des réactions de *N*-, *O*-, ou *S*-désalkylation, de *N*-oxydation, d'hydroxylation, d'époxydation, de désamination, de sulfoxydation, de désulfuration et de déhalogénéation oxydative⁴⁵.

3.1 Interactions entre molécules bioactives

Les molécules bioactives de provenance exogène à l'organisme sont métabolisées par neuf enzymes hépatiques, soit CYP1A2, CYP2A6, CYP3A4/5, CYP2B6, CYP2C8, CYP2C9, CYP2C19, CYP2D6 et CYP2E1. Les pourcentages associés à la métabolisation de ces composés selon chaque cytochrome P450 sont présentés selon le diagramme de la Figure 37. Il faut ainsi comprendre, selon le diagramme, que plus du tiers des molécules bioactives d'origine exogène sont métabolisés par le CYP3A4/5, ce qui en fait un des plus importants.

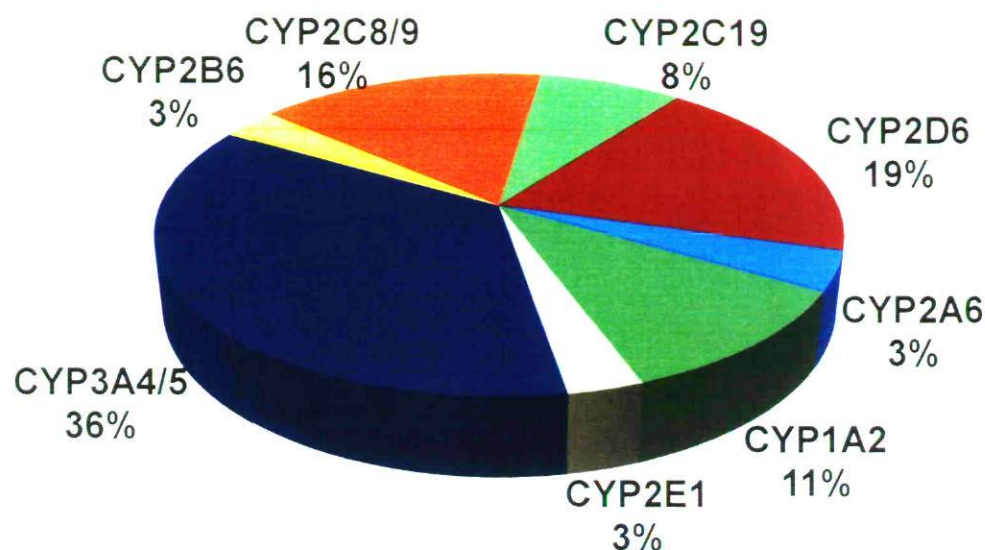


Figure 37 : Diagramme présentant le pourcentage de métabolisation des molécules exogènes à l'organisme par les neuf enzymes principales du cytochrome P450

C'est ainsi que les interactions entre molécules entrent en jeu, puisque l'alimentation conjuguée à la prise d'un ou des médicaments peut entraîner certains problèmes. Par exemple, certains médicaments ne doivent pas être pris conjointement avec du pamplemousse. Ceci découle du fait que ce médicament est métabolisé par le même CYP450 que certaines molécules bioactives contenues dans ce fruit. Les mécanismes d'inhibition et d'induction sont bien connus dans l'industrie pharmaceutique, mais moins bien documentés dans le domaine des aliments fonctionnels et des produits de santé naturels. On parle d'inhibition lorsqu'un composé est apte à diminuer significativement l'effet et la clairance d'un autre, tandis qu'on décrit l'induction comme une molécule qui vient augmenter l'effet et la clairance ainsi que diminuer la demi-vie sanguine d'une autre molécule. Dans les deux cas, ces interactions peuvent mener à de graves problèmes de santé et même entraîner la mort^{25, 94-99}.

Les interactions médicamenteuses sont bien documentées dans le domaine pharmaceutique, principalement grâce à l'utilisation d'essais *in-vivo* et *in-vitro* dans ce domaine. Les médicaments, avant de passer en phases préclinique chez les animaux et en clinique chez l'humain, sont criblés sur des préparations biologiques lors d'essais appelés CYP450. Des préparations d'enzymes ou de tissus sont commercialement disponibles, c'est-à-dire sous forme de microsomes, d'hépatocytes, de protéines CYP450

recombinantes ou de tranches de foie. Les microsomes humains, qui sont un extrait de protéines hépatiques préparées par centrifugation, sont particulièrement intéressants dans ce contexte, car ils offrent divers avantages. En effet, ces préparations permettent l'étude des inhibitions médicament-médicament, la prédiction de la clairance et le criblage de la stabilité métabolique ¹⁰⁰. Toutefois, l'utilisation d'hépatocytes, à moins grande concentration enzymatique et à stabilité limitée, demeure incontournable lors d'essais d'induction.

Chapitre 3: Expérimentation

1 Substrats et standards internes utilisés pour le développement

Afin de mener à bien les expérimentations et développer adéquatement les méthodes analytiques, une revue de littérature a été effectuée quand aux substrats à utiliser lors des essais. Des molécules, qui sont métabolisées de façon connue et spécifique pour chaque CYP450, sont bien documentées dans la littérature. De plus, comme le *Current Protocols in Pharmacology* est une référence dans ce domaine, les composés sélectionnés sont en accord avec cet ouvrage puisqu'ils sont cités dans ces protocoles.

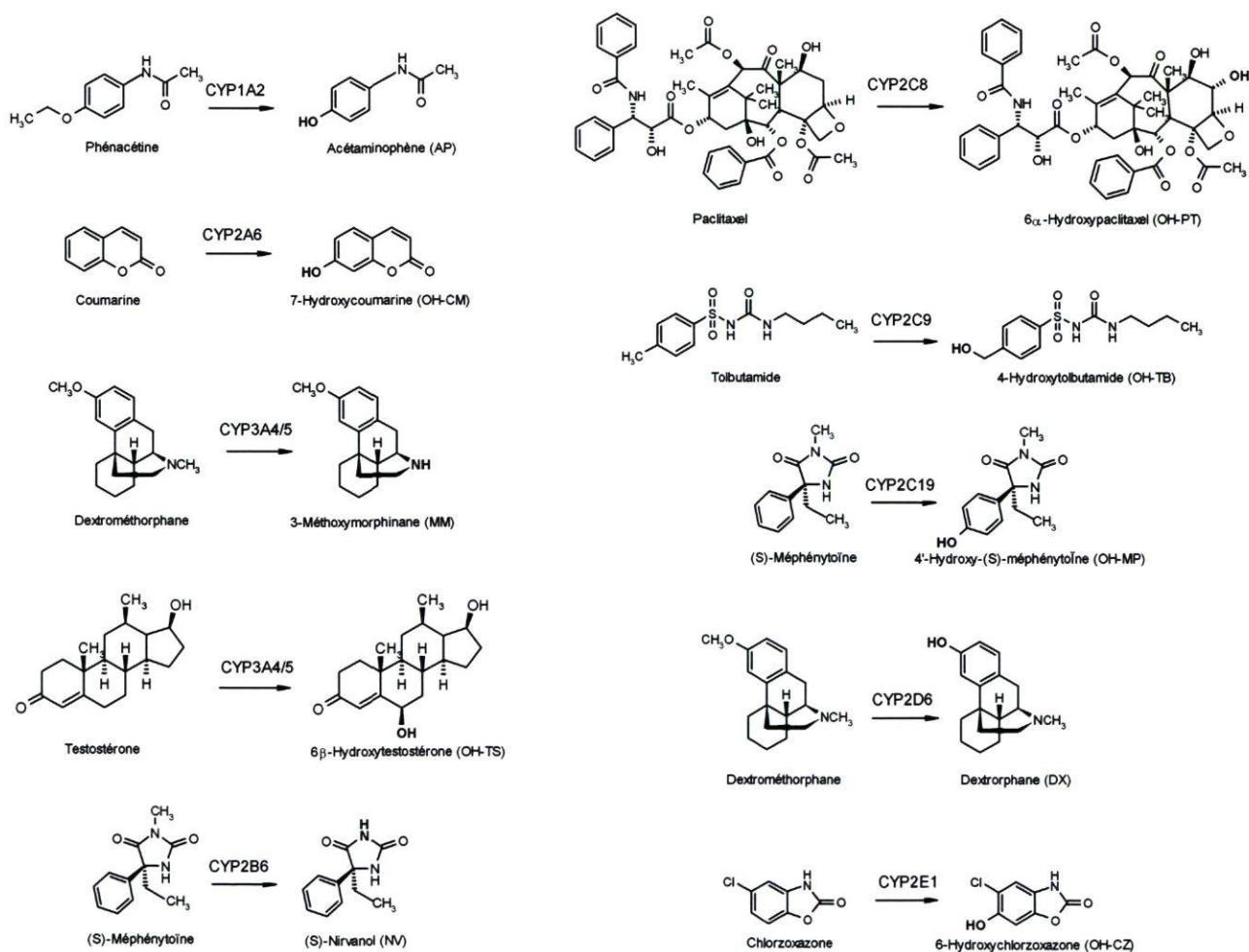


Figure 38 : Substrats utilisés pour le développement analytique

La Figure 38 présente le substrat sélectionné et le métabolite obtenu pour chacune des neuf enzymes CYP450. À noter que deux substrats ont été utilisés pour le CYP3A4/5, puisque cet enzyme est responsable d'une grande partie de la métabolisation des composés exogènes. Tous les standards utilisés lors de ce projet ont été achetés chez Sigma-Aldrich ou Alfa Aesar et sont d'une pureté supérieure à 95%, selon les fournisseurs. Pour la majorité des réactions de métabolisation présentées dans la Figure 38, l'hydroxylation est la voie de biotransformation privilégiée, soit pour la coumarine (CYP2A6), la testostérone (CYP3A4/5), le paclitaxel (CYP2C8), le tolbutamide (CYP2C9), la méphénytoïne (CYP2C19) et le chlorzoxazone (CYP2E1). La seconde voie de métabolisation des trois autres substrats, la phénacétine (CYP1A2), le dextrométhorphone (CYP3A4/5 et 2D6) et la méphénytoïne (CYP2B6), est la désalkylation, soit par déméthylation ou déséthylation.

En ce qui a trait aux standards internes, différents composés ont été testés. Puisqu'il n'y a pas d'extraction des analytes du milieu biologique avant analyse, le standard interne a comme principale fonction de contrôler les variations instrumentales. Dans cette optique, des molécules à coûts modérés et facilement disponibles ont été évaluées.

2 Paramètres de séparation et de détection sélectionnés

La chromatographie liquide avec détection en spectrométrie de masse a été sélectionnée afin d'effectuer les divers dosages lors des essais. Cette technique est polyvalente et sensible, ce qui est essentiel, compte tenu de la vaste gamme de molécules à quantifier. Deux approches analytiques seront développées. Une première stratégie a été développée sur un système HPLC-MS classique, qui est un chromatographe liquide haute performance couplé à un spectre de masse simple quadripôle. Une seconde stratégie, plus avant-gardiste, a été mise au point sur un instrument de dernière génération, un chromatographe liquide à ultraperformance avec détection en spectrométrie de masse triple quadripôle (UPLC-MS/MS).

2.1 Stratégie HPLC-MS

2.1.1 Instrumentation

La séparation en HPLC a été effectuée sur un système Agilent 1100 (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA). La configuration de l'instrument inclut un dégazeur, une pompe quaternaire, un échantillonneur réfrigéré, un chauffe-colonne, un détecteur à barrette de diodes et un spectromètre de masse simple quadripôle SL modèle G1946D, muni d'une source d'ionisation en mode *electrospray*. Afin d'améliorer la qualité de la séparation et la largeur des pics, le volume mort du système chromatographique a été optimisé. Pour ce faire, la cellule de 13 μ L du détecteur ultraviolet a été remplacée par une cellule à micro-débit de 1.7 μ L. De plus, le siège standard de l'aiguille a été substitué par un à volume réduit et le diamètre interne de la tubulure a été réduit. Un diviseur de débit à haute pression a été utilisé en sortie de colonne. Ce diviseur a été réglé afin de permettre seulement l'entrée de la moitié du débit du chromatographe dans la source d'ionisation *electrospray*, puisque ce type de source ne tolère pas des débits de plus de 0.5mL/minute. À des concentrations élevées, cette stratégie permet une analyse simultanée en ultraviolet et en spectrométrie de masse, puisque la seconde partie du débit est dirigée vers le détecteur à barrette de diodes.

2.1.2 Conditions chromatographiques

La séparation chromatographique HPLC a été menée à l'aide d'une phase stationnaire hybride octadécyle, avec une colonne *X-Bridge BEH C-18* de Waters (Waters Corporation, Milford, MA USA). Une colonne de 150 mm de longueur, de diamètre interne de 4,6 mm et de grosseur de particules de 3,5 μ m a été couplée à une colonne de garde de 20 mm afin d'effectuer la séparation. Puisque ce type de colonne résiste à des pH extrêmes (1<pH<12), deux compositions de phases mobiles ont été utilisées, dans le but d'obtenir les meilleures rétentions et formes de pics possibles. Pour les deux conditions, le débit, le volume d'injection, les températures de l'échantillonneur et de la colonne ont été ajustés à 1 mL/min., 20 μ L, 4°C et 40°C, respectivement. La barrette de diodes a accumulé de l'information tout au long de l'analyse pour des longueurs d'onde de 210 à 400 nm.

Les premières conditions développées sont en pH basique, avec un jeu de gradient d'un tampon en A de bicarbonate d'ammonium 10 mM pH=10.5 et un solvant organique en B d'acétonitrile contenant 2.5% d'hydroxyde d'ammonium. La séparation est effectuée à l'aide d'un gradient linéaire, présenté au Tableau 4. Ces conditions ont permis une séparation efficace de l'acétaminophène (CYP1A2), de l'hydroxyméphénytoïne (CYP2C19), du nirvanol (CYP2B6), de l'hydroxytolbutamide (CYP2C9), de l'hydroxytestostérone (CYP3A4/5), ainsi que de leurs substrats et standards internes respectifs (Tableau 5)

Tableau 4 : Gradient linéaire de séparation pour l'analyse des CYP450 par HPLC

Temps (min.)	% A	% B
0	95	5
4	95	5
8	80	20
15	0	100
20	0	100
21	95	5
27	95	5

Les deuxièmes conditions chromatographiques mises au point impliquent l'utilisation d'une phase mobile acide pour effectuer la séparation des autres marqueurs CYP450. Le gradient présenté au Tableau 4 est utilisé avec un tampon A de formate d'ammonium à 25 mM contenant 0,1% d'acide formique et une phase organique B d'acétonitrile contenant aussi 0,1% d'acide formique. Ces conditions ont permis une séparation adéquate du dextrophane (CYP2D6), de la méthoxymorphinane (CYP3A4/5), de l'hydroxypaclitaxel (CYP2C8), de l'hydroxychlorzoxazone (CYP2E1), de l'hydroxycoumarine (CYP2A6) et de leurs substrats et standards internes respectifs (Tableau 5).

2.1.3 Détection en spectrométrie simple quadripôle

La quantification en spectrométrie de masse simple quadripôle a été mise à profit. Pour ce faire, le dosage en mode *S/M* a permis l'utilisation, pour chaque métabolite et son standard interne, d'un rapport *m/z* spécifique, présenté au Tableau 5. L'analyse a été

menée en *electrospray*, ionisation positive (ESI+). L'azote a été utilisé comme gaz de solvation dans la source, à une température de 350°C et un débit de 12 L/minute. La pression du nébuliseur a été ajustée à 35 psig et le voltage appliqué au capillaire était de 3000V avec un fragmenteur réglé à 70V. Le débit entrant dans le spectre de masse a été dirigé vers les déchets pour les quatre premières minutes après injection, afin d'éviter l'accumulation de sels non-volatils dans la source et la suppression du signal au cours des analyses. Il faut noter que ce délai vers les déchets est différent pour l'acétaminophène, soit à 2,5 minutes, puisque ce métabolite est élué plus tôt du système chromatographique.

Tableau 5 : Fragments m/z utilisés en mode SIM pour le dosage des métabolites et de leurs standards internes en HPLC-MS

CYP	Substrat	Métabolite	Fragment SIM (m/z)	Standard Interne	Fragment SIM (m/z)
1A2	Phénacétine	Acétaminophène (AP)	152	Tolbutamide	271
2A6	Coumarine	7-Hydroxycoumarine (OH-CM)	163	Paclitaxel	854
3A4/5	Dextrométhorphan	3-Méthoxymorphinan (MM)	272	Paclitaxel	854
3A4/5	Testostérone	6β-Hydroxytestostérone (OH-TS)	305	Corticostérone	347
2B6	(S)-Méphénytoïne	(S)-Nirvanol (NV)	205	Tolbutamide	271
2C8	Paclitaxel	6α-Hydroxypaclitaxel (OH-PT)	870	Phénacétine	180
2C9	Tolbutamide	4-Hydroxytolbutamide (OH-TB)	287	Phénacétine	180
2C19	(S)-Méphénytoïne	4-Hydroxyméphénytoïne (OH-MP)	235	Tolbutamide	271
2D6	Dextrométhorphan	Dextrorphan (DX)	258	Phénacétine	180
2E1	Chlorzoxazone	6-Hydroxychlorzoxazone (OH-CZ)	187	Phénacétine	180

2.2 Stratégie UPLC-MS/MS

2.2.1 Instrumentation

Lors du développement de cette stratégie analytique, la chromatographie liquide ultraperformance a été exploitée à son plein potentiel, à l'aide d'un système *UPLC Acquity* de marque *Waters* (Waters Corporation, Milford, MA USA). Le système comprenait une pompe binaire, un échantillonneur réfrigéré, un chauffe-colonne, un détecteur à barrette de diodes et un spectromètre de masse triple quadripôle de modèle TQD, équipé d'une source d'ionisation type *electrospray*. Aucune modification n'a été faite sur cet instrument.

2.2.2 Conditions chromatographiques

La séparation UPLC a été accomplie sur une colonne *C18 BEH Acquity* de *Waters*, qui contient une silice fonctionnalisée identique à celle utilisée précédemment en HPLC. Toutefois, les particules de cette colonne étaient de diamètre de 1,7 μm et les dimensions de la colonne étaient de 100 mm de longueur et de 2,1 mm de diamètre interne. Une colonne de garde *Vanguard C18 BEH* protégeait la colonne analytique. Les mêmes phases mobiles et les mêmes températures utilisées précédemment pour chacun des métabolites et leurs standards internes ont été mis à profit lors du développement des séparations. Cependant, le débit de la phase mobile a été diminué à 0,4 mL/min., le volume d'injection a été réduit à 5 μL et le gradient linéaire a été modifié selon le Tableau 6, présenté ci-dessous. Les solvants A et B décrits pour les séparations en HPLC des différents essais CYP450 ont aussi servi en UPLC.

Tableau 6 : Gradient linéaire utilisé en UPLC afin de doser chaque marqueur en conditions acide ou basique

Temps (min.)	% A	% B
0	95	5
2	95	5
4,5	0	100
6,5	0	100
7	95	5
12	95	5

2.2.3 Détection en spectrométrie de masse tandem

Le système UPLC utilisé a été couplé à un spectromètre de masse tandem à triple quadripôle. La quantification a été effectuée en mode *MRM*, où un parent et des ions filles spécifiques ont été identifiés pour chaque métabolite et chaque standard interne. L'argon a été utilisé comme gaz de collision (mode *CID*, *Collision-Induced Dissociation*), en conjonction avec des valeurs de voltages de cône, de capillaire et de collision spécifiques à chaque analyte. Le Tableau 7 présente ces paramètres optimisés pour le dosage des traceurs des essais CYP450 en MS/MS, avec un temps de mesure de 0,1 seconde par

transition. Une interface d'ionisation de type *electrospray* a été utilisée en mode positif à une température de 150°C, à l'exception de l'hydroxychlorzoxazone qui a été ionisé en mode négatif. L'azote a été employé comme gaz de désolvatation pour la source à une température de 350°C, à un débit de 1000 L/hre et un débit de cône de 50 L/hre. Le débit pénétrant la source a été contourné vers les déchets pour les deux premières minutes après l'injection, sauf pour l'acétaminophène, où ce délai a été raccourci à 30 secondes.

Tableau 7 : Paramètres en MRM utilisés pour la quantification des traceurs CYP450 en UPLC-MS/MS

CYP	Métabolite	Transitions MRM (m/z)	Cône/Collision (eV)	Standard interne	Transitions MRM (m/z)	Cône/Collision (eV)	Voltage du capillaire (kV)
1A2	AP	152>110	20 / 15	Tolbutamide	271>155 271>172	20 / 15	2,2
2A6	OH-CM	163>107 163>119	20 / 20	Paclitaxel	899>509 899>569	15 / 20	2,2
3A4/5	MM	258>213 258>215	30 / 30	Paclitaxel	899>509 899>569	15 / 20	2,2
3A4/5	OH-TS	305>269 305>287	24 / 15	Corticostérone	347>121	30 / 20	3,8
2B6	NV	205>134	20 / 15	Tolbutamide	271>155 271>172	30 / 15	2,2
2C8	OH-PT	870>525 870>585	20 / 15	Phénacétine	180>110 180>138	30 / 15	2,2
2C9	OH-TB	187>171 287>188	30 / 15	Phénacétine	180>110 180>138	30 / 15	2,2
2C19	OH-MP	235>150	30 / 15	Tolbutamide	271>155 271>172	30 / 15	2,2
2D6	DX	258>199 258>157	30 / 30	Phénacétine	180>110 180>138	30 / 15	2,2
2E1	OH-CZ	184>120* 184>148*	25 / 20	Phénacétine	180>110 180>138	30 / 15	2,2

*Mode d'ionisation *electrospray* négatif

3 Préparation des substrats et des standards

Des solutions mères des substrats (40-50mM), des métabolites (2-5mM) et des standards internes (10-20mM) ont été préparées soit dans le méthanol ou dans l'acétonitrile, sauf pour le tolbutamide qui a été dissout dans de l'hydroxyde de sodium 100mM afin d'obtenir le sel. Toutes les solutions mères ont été conservées à -20°C jusqu'à utilisation.

Pour la droite d'étalonnage, les métabolites et les standards internes ont été préparés dans une même solution la journée même de l'analyse. La composition finale des essais a été répliquée, en ajoutant moitié-moitié de solution d'arrêt et de tampon phosphate 100mM pH 7.4 à chaque point de droite (voir section 4 de ce chapitre pour la préparation de ces deux solutions). Les concentrations en métabolites et en standards internes des droites pour les dosages en HPLC-MS et en UPLC-MS/MS ne sont pas les mêmes, puisque la sensibilité des deux méthodes est différente et que la concentration en microsomes est ajustée selon la technique utilisée. Les Tableau 8 et Tableau 9 présentent les plages de concentrations employées pour quantifier les essais, ainsi que les temps de rétention obtenus lors des analyses.

Tableau 8 : Plages de concentrations des standards utilisés pour la quantification en HPLC-MS des essais CYP450, ainsi que leurs temps de rétention respectifs

CYP	Métabolite	Plage de concentrations (μ M)	Temps de rétention (min.)	Standard interne (10 μ M)	Temps de rétention (min.)
1A2	AP	0,5 - 5	2,6	Tolbutamide	11,8
2A6	OH-CM	0,1 - 5	13,0	Paclitaxel	15,0
3A4/5	MM	0,5 - 5	12,8	Paclitaxel	15,0
3A4/5	OH-TS	0,5 - 5	12,7	Corticostérone	13,6
2B6	NV	0,1 - 5	8,9	Tolbutamide	11,8
2C8	OH-PT	0,5 - 5	14,5	Phénacétine	12,7
2C9	OH-TB	0,5 - 5	9,4	Phénacétine	12,7
2C19	OH-MP	0,1 - 5	9,2	Tolbutamide	11,8
2D6	DX	0,5 - 5	11,8	Phénacétine	12,7
2E1	OH-CZ	0,5 - 5	10,7	Phénacétine	12,7

Tableau 9 : Plages de concentrations des standards utilisés pour le dosage en UPLC-MS/MS des essais CYP450, ainsi que leurs temps de rétention respectifs

CYP	Métabolite	Plage de concentrations (μM)	Temps de rétention (min.)	Standard interne (5 μM)	Temps de rétention (min.)
1A2	AP	0,01 - 2,5	0,98	Tolbutamide	3,60
2A6	OH-CM	0,01 - 2,5	3,61	Paclitaxel	4,53
3A4/5	MM	0,01 - 2,5	4,05	Paclitaxel	4,53
3A4/5	OH-TS	0,01 - 2,5	3,93	Corticostérone	4,22
2B6	NV	0,01 - 2,5	3,20	Tolbutamide	3,60
2C8	OH-PT	0,01 - 2,5	4,11	Phénacétine	3,93
2C9	OH-TB	0,01 - 2,5	3,26	Phénacétine	3,93
2C19	OH-MP	0,01 - 2,5	3,29	Tolbutamide	3,60
2D6	DX	0,01 - 2,5	3,64	Phénacétine	3,93
2E1	OH-CZ	0,01 - 2,5	3,45	Phénacétine	3,93

4 Conditions d'incubation

Lors des essais, une dilution subséquente des substrats a été effectuée dans 50 :50 eau/solvant organique, puisque la concentration finale en solvant organique ne doit pas dépasser 2%. De plus, cette dilution avec une proportion d'eau permet d'ajouter un volume plus grand de substrat lors des essais, ce qui apporte une meilleure précision analytique. Les constantes de Michaelis-Menten (K_m) répertoriées dans la littérature ont servi à déterminer la concentration en substrat utilisé durant les essais. Cette constante, présentée au Tableau 10 pour chaque substrat, représente la concentration où l'activité des enzymes est à son apex et que le métabolite est produit à son maximum.

Tableau 10 : Constantes de Michaelis-Menten (K_m) répertoriées pour chaque substrat des CYP450

CYP	Substrat	Valeur de K_m (μM)
1A2	Phénacétine	63 ¹⁰¹ , 47 ⁴²
2A6	Coumarine	0,58 ¹⁰¹ , 0,84 ⁴²
3A4/5	Dextrométhorphan	232 ¹⁰¹ , 400 ⁴²
3A4/5	Testostérone	56 ¹⁰²
2B6	(S)-Méphénytoïne	564 ¹⁰³ , 1911 ¹⁰⁴
2C8	Paclitaxel	2,3 ¹⁰⁵
2C9	Tolbutamide	147 ⁴²
2C19	(S)-Méphénytoïne	49,6 ¹⁰¹ , 57,2 ⁴²
2D6	Dextrométhorphan	7,71 ¹⁰¹ , 4,64 ⁴²
2E1	Chlorzoxazone	26,9 ¹⁰¹ , 73,9 ⁴²

Les essais enzymatiques ont été effectués avec des concentrations finales en protéines microsomales de 60 à 700µg, dépendamment de l'approche de quantification utilisée (MS ou MS/MS), dans un volume de réaction de 300µL. Les microsomes qui ont été utilisés (XenoTech, Lenexa, KS) proviennent d'un *pool* de 200 foies humains, soit 100 foies de mâles et 100 foies de femelles. Le tampon dans lequel les microsomes ont été initialement incubés à 37°C durant 3 minutes contient 100mM de phosphate de potassium, 5mM de chlorure de magnésium, 1mM de NADP⁺ et 1U/mL de phosphate-6-glucose déshydrogénase, ajustée à pH physiologique 7,4. Après pré-incubation, la réaction enzymatique a été amorcée par l'ajout du substrat à la concentration du K_m et de 10mM de phosphate-6-glucose. Les essais ont été incubés de 15 à 60 minutes avec agitation. Après incubation à un temps donné, la réaction a été interrompue par l'ajout de 300µL de méthanol froid, contenant le standard interne. La solution résultante a été centrifugée 10 minutes à 14 000g, afin d'éliminer les protéines ayant précipité. Le surnageant a finalement été analysé directement en HPLC-MS ou en UPLC-MS/MS.

5 Contrôle et validation de la méthode

Afin de contrôler l'efficacité du processus d'incubation en présence de microsomes, ainsi que l'exactitude des paramètres analytiques, différents contrôles ont été préparés. Premièrement, afin de contrôler les paramètres instrumentaux, un blanc d'incubation a été préparé, c'est-à-dire un mélange contenant tout le mélange réactionnel, sauf le substrat. À cette solution est ajouté le métabolite et la solution d'arrêt contenant le standard interne. Après centrifugation, le contrôle positif est injecté en chromatographie liquide avec détection en spectrométrie de masse pour déterminer la précision de la méthode en pourcentage relatif. Deuxièmement, des contrôles négatifs ont été préparés, soit en omettant le NADP⁺ ou en utilisant des microsomes bouillis. Ces deux types de contrôle, en plus des essais effectués, ont permis de s'assurer que tous les paramètres expérimentaux étaient sous contrôle.

Les méthodes d'analyse par chromatographie liquide avec détection en spectrométrie de masse ont été validées. Pour construire chaque droite d'étalonnage des différents métabolites des CYP450, les ratios des surfaces du pic de métabolite par rapport au pic de l'étalon interne ont été utilisés. Ces ratios ont été mis en relation avec les concentrations en métabolite, afin d'obtenir une droite de forme $y = mx + b$. Pour la mesure d'inconnus de plus faibles concentrations, une régression linéaire par la méthode

des moindres carrés ($1/[c]^2$) est couramment utilisée, afin de donner plus de poids aux faibles concentrations de la droite et ainsi obtenir des mesures plus fiables. En effet, pour une droite d'étalonnage standard x par rapport à y , les valeurs de la pente et de l'ordonnée à l'origine sont fortement influencées par les points du haut de la courbe. Ceci entraînera une forte déviation des points du bas de la courbe, qui ont déjà une variation analytique plus élevée, de la mesure expérimentale par rapport à l'équation de la droite. Afin de corriger cet effet, certains logiciels permettent d'utiliser une régression de type $1/[c]^2$ ou $1/x^2$, appelé moindres carrés, qui donne un poids analytique plus important aux faibles concentrations sur l'équation totale de la droite. Le tout permet d'avoir une mesure plus juste lorsque des analytes sont quantifiés à faible concentration en utilisant une droite d'étalonnage calculée sur une large plage de concentrations. Pour évaluer la linéarité, cinq droites d'étalonnage ont été préparées sur cinq jours différents d'analyse et la moyenne des coefficients de corrélation linéaire a été calculée. Les ratios de signal-sur-bruit (pic-à-pic ou *peak-to-peak*) ont servi à déterminer la limite de détection, à trois fois le rapport signal-sur-bruit, et la limite de quantification, à dix fois le signal-sur-bruit, à l'aide d'un blanc d'incubation où le métabolite a été ajouté en quantité connue. La suppression ionique du signal, qui est l'effet de la matrice sur la réponse instrumentale du spectromètre de masse, a aussi été évaluée. Une comparaison des surfaces des pics d'un métabolite aux mêmes concentrations dans un tampon phosphate/solvant organique par rapport à un blanc de solution d'incubation a été effectuée. Cette comparaison a permis de déterminer si un biais était introduit par la matrice lors de l'analyse des échantillons. Finalement, un écart-type sur cinq répliques durant une séquence d'analyse a été calculé pour la méthode développée.

Chapitre 4: Résultats et discussion

1. Choix des substrats et des standards internes

Comme mentionné lors de la section précédente, la littérature contient de l'information quant aux substrats à utiliser lors des essais. Toutefois, certains groupes de recherche préfèrent utiliser un substrat par rapport à un autre pour différentes raisons. Lors des travaux effectués dans le cadre de cette maîtrise, certains critères ont orienté le choix des substrats.

Puisque les méthodes développées se voulaient faciles d'utilisation et surtout accessibles à une majorité d'utilisateur, des substrats commercialement disponibles ont été sélectionnés. Les coûts et la facilité à se procurer ces molécules ont été les principaux critères de sélection. En effet, certains substrats sont coûteux et rendent les essais très dispendieux, car une concentration importante de ces composés doit être utilisée. Le coût en matériel est un aspect très important lors de ce type d'essais, qui génère une grande quantité d'échantillons. Il devient alors primordial d'utiliser des substrats facilement disponibles et peu coûteux. Dans cette optique, tous les substrats utilisés sont disponibles à coûts modérés chez Sigma-Aldrich ou chez Alfa Aesar. Par contre, pour le CYP2C8, l'usage du paclitaxel, appelé aussi Taxol®, s'est avéré presque inévitable, malgré le prix assez élevé de la molécule purifiée. Cette molécule est un agent antitumoral utilisé lors du traitement des cancers des ovaires, du sein et des poumons. Ce substrat est principalement métabolisé par l'enzyme CYP2C8, ce qui en fait un traceur par excellence. Pour ce qui est du CYP3A4, le choix de substrat a dû être repensé, puisqu'un des composés utilisés causait problèmes.

Pour l'enzyme CYP3A4, il est important de sélectionner deux substrats lors d'évaluation de l'activité d'un nouveau composé, car ce cytochrome métabolise la majorité des composés bioactifs endogènes. Pour ce faire, le dextrométhorphan et le cortisol avaient initialement été sélectionnés pour les essais. Le dextrométhorphan répondait aisément aux critères du projet, c'est-à-dire que cette molécule est facile à se procurer et coûte presque rien. De surcroît, la sensibilité du métabolite de cette molécule en spectrométrie de masse est bonne et la conversion du dextrométhorphan en méthoxymorphine permet des mesures adéquates pour différents temps d'incubation. Le cas du cortisol s'est

avéré différent. Bien que ce composé soit disponible commercialement à de faibles coûts, le cortisol a engendré divers problèmes lors du développement.

Premièrement, la sensibilité en spectrométrie de masse du métabolite du cortisol, l'hydroxycortisol, n'est pas très bonne. En simple quadripôle, la méthode de quantification a été développée avec succès, bien que les limites de détection n'étaient pas idéales et s'avéraient être assez élevées, de l'ordre de 0,05µM. C'est en triple quadripôle que la tâche devenaient beaucoup plus ardue. En effet, l'hydroxycortisol réagissait bien lors de l'ionisation dans la source, mais la fragmentation dans la chambre de collision était problématique. Lors de la dissociation par collision dans la chambre, une multitude de fragments étaient produits, et ce, même en utilisant des paramètres générant de faibles fragmentations. Cette fragmentation élevée de l'hydroxycortisol engendrait une perte très importante en signal, car il s'avérait impossible de suivre tous les produits de collision. Ce problème avait alors des répercussions directes sur la sensibilité de la méthode d'analyse.

Deuxièmement, le cortisol possède un taux de conversion très faible en son métabolite, l'hydroxycortisol. Bien que le CYP3A4 soit une enzyme possédant une forte activité de métabolisation, le cortisol se métabolise difficilement en hydroxycortisol. Lors des essais CYP3A4, il était impossible de mesurer des teneurs en métabolites avant soixante minutes d'incubation. Conjugué avec la sensibilité médiocre obtenue en spectrométrie de masse, le faible taux de conversion rendait le suivi de ce composé problématique. Le suivi d'un métabolite du CYP3A4 seulement mesurable lors des essais après une heure d'incubation était inconcevable. Il a alors été nécessaire d'envisager un autre substrat.

Une des molécules régulièrement utilisée lors des essais CYP450 est la testostérone. Ce composé est commercialement disponible à des prix très bas, soit environ 5 à 10\$ du gramme. En revanche, il est impossible de se procurer cette molécule sans l'obtention d'un permis, puisque la testostérone est une hormone sous législation. Ce problème contrevenait alors à la philosophie de développement de ce projet, qui était d'utiliser des substrats facilement disponibles. D'ailleurs, certains substrats pour le CYP3A4 n'ont initialement pas été considérés, car un permis d'utilisation était requis. Toutefois, ce substrat est incontournable lors des essais CYP3A4 et il s'est avéré scientifiquement pertinent d'utiliser ce substrat, malgré les buts fixés lors du projet.

Le métabolite de la testostérone, l'hydroxytestostérone, s'ionise facilement en *electrospray*, ce qui lui confère une bonne sensibilité en spectrométrie simple quadripôle. Malgré certaines craintes lors de la dissociation par collision en spectrométrie de masse tandem, il s'est avéré que l'hydroxytestostérone se fragmente principalement en deux fragments. Cette caractéristique permet l'obtention d'excellentes limites de quantification, ce qui était recherché pour les essais. De surcroît, la testostérone possède un taux de conversion très élevé au CYP3A4. Il a été possible de quantifier son métabolite à des temps d'incubation aussi faibles que dix minutes, ce qui n'a pas pu être effectué pour aucun autre substrat. L'utilisation d'une molécule ayant autant d'affinité pour le CYP3A4 entraîne des avantages intéressants lors des essais pour une enzyme de cette importance. Par exemple, un nouveau composé bioactif apte à inhiber l'activité de conversion de la testostérone serait immédiatement mise de côté, puisqu'il serait un inhibiteur fort pour des médicaments faiblement convertis par le CYP3A4. La testostérone a donc été sélectionnée comme deuxième substrat pour les essais CYP3A4.

Dans presque la majorité des publications consultées, les méthodes d'analyse utilisées et les essais effectués se restreignent seulement à l'évaluation de cinq à six CYP450^{43, 44, 53, 106, 107}. Il est vrai d'affirmer que certains CYP450, comme les CYP2B6, 2A6 et 2E1, métabolisent très peu de composés bioactifs endogènes. Cependant, afin d'évaluer adéquatement un nouveau composé bioactif, il est important d'avoir la totalité des informations quant à sa métabolisation. C'est dans cet ordre d'idée, que la mise au point des paramètres d'incubation et de mesure de dix substrats, qui permettent d'évaluer l'ensemble des neufs CYP450, a été effectuée. Une approche similaire pour évaluer les neufs CYP450 a récemment été proposée par *Kim et al.*¹⁰⁸. Ce groupe n'a toutefois pas utilisé deux substrats pour l'enzyme CYP3A4, ce qui constitue une défaillance majeure dans leur méthodologie. L'inhibition ou l'induction de cet enzyme par la coadministration de médicaments a précédemment engendré certains effets secondaires importants, menant même, dans certains cas, à des décès^{25, 94-99}.

Pour la sélection des standards internes, différentes approches ont été évaluées. La première approche, très utilisée en bonne pratique de laboratoire dans le domaine de la pharmaceutique, implique l'usage d'analogues marqués au deutérium (²H), au ¹³C ou au ¹⁵N des molécules à quantifier. Cette approche a l'avantage de normaliser le signal du composé analysé, si un effet de la matrice apporte un biais à la quantification. L'isotope élue au même temps d'analyse que le composé à doser, ce qui permet d'évaluer l'effet de

la matrice à ce temps précis. La différenciation se fait au niveau de l'analyseur, le spectromètre de masse, puisque cette molécule possède une masse plus élevée que l'analyte. Cette technique apporte un grand niveau de précision et permet de suivre à la fois l'extraction et la quantification. Par contre, cette approche est très coûteuse, car les molécules marquées se vendent très chers. Aussi, très peu de composés marqués sont disponibles commercialement. L'usage de molécules marquées a donc été mis de côté pour ces deux raisons.

La deuxième approche implique l'utilisation de molécules de structure analogue aux composés à doser. Par exemple, une molécule avec un éthyle à la place d'un méthyle peut être employée. Dans ces conditions, le standard interne élue près de l'analyte, mais la correction effectuée est au niveau de l'extraction, ce qui n'est pas toujours vrai en pratique, et au niveau du contrôle des paramètres d'analyse, comme par exemple la précision du volume d'injection. Dans le contexte de ce projet, aucune extraction n'est faite. Ainsi, l'usage d'un analogue de structure par rapport à une molécule de structure différente apporte le même type de correction dans le cadre du présent projet. De surcroît, d'autres standards qui augmentent les coûts associés aux essais auraient dû être achetés. Des analogues de structure pour des molécules aussi complexes que le paclitaxel sont difficiles à se procurer et coûtent très chers.

La troisième approche met en jeu l'usage d'une « quelconque » molécule, analysable dans les mêmes conditions que l'analyte. Ce standard interne contrôle principalement la précision du volume d'injection de l'instrument et le coût de ce qui est utilisé peut facilement être maîtrisé. Il faut rappeler que seul un analogue isotopique permet de contrôler à la fois la chromatographie et la détection en spectrométrie de masse. Toutefois, dans l'optique de ce projet, la chromatographie a été mise à profit afin d'obtenir beaucoup de rétention, ce qui minimise en général l'effet de la matrice au détecteur, ce qui a ensuite été vérifié lors des essais de suppression ionique durant la validation des méthodes. L'approche des standards internes isotopiques est d'ailleurs couramment utilisée par des laboratoires qui ont des chromatographies de moins de 1 minute par raison du volume d'analyses qu'ils ont à gérer, ce qui ne correspond pas au contexte de travail de ce qui a été fait lors de ce projet.

Afin de minimiser au maximum le coût du matériel, les substrats ont servi de standards internes. Par exemple, lors d'essais avec la phénacétine, le tolbutamide a été ajouté en

quantité connue à la solution d'arrêt et ce composé a servi de standard interne lors de l'analyse. Cette approche est simple et a permis de contrôler l'analyse des essais. Il est important de mentionner que dans le cadre de ce projet, chaque essai est fait individuellement et le standard interne est ajouté à la fin, lors de l'arrêt de l'enzyme, ce qui ne permet pas à l'enzyme de métaboliser ce composé. S'il y avait contamination croisée, par exemple, un ajout de tolbutamide au début de l'essai de phénacétine, seulement le métabolite du tolbutamide est analysé spécifiquement en masse sur charge par le détecteur et ces deux composés sont transformés par deux CYP450 différents, ce qui rend les interactions pratiquement impossibles. Les méthodes analytiques développées lors de ce projet ont été utilisées dans le cadre de deux projets avec entreprises et l'utilisation de tels standards internes n'a causé aucun problème lors des analyses. Les résultats ne sont pas inclus dans ce rapport pour des raisons de confidentialité.

2. Paramètres de séparation et de détection

2.1 Performances chromatographiques

La principale caractéristique qui a orienté le travail de séparation effectué lors de ce projet est l'utilisation d'une seule colonne et de seulement deux phases mobiles différentes. Selon les procédures du *Current Protocols in Pharmacology*, chaque essai de CYP450 implique l'usage d'une colonne et d'une phase mobile spécifiques. Ainsi, pour évaluer cinq CYP450 différents, il est nécessaire d'acquérir cinq colonnes analytiques, ce qui engendre des coûts importants et beaucoup de manipulations d'une CYP450 à l'autre, afin de modifier les paramètres instrumentaux. La performance de cette approche chromatographique réside dans l'utilisation d'une seule colonne par stratégie analytique, soit HPLC ou UPLC. Cette démarche est accompagnée de l'utilisation de seulement deux phases mobiles pour évaluer les neuf CYP450. Le tout se réduit donc à aucune modification de colonne et le passage d'une phase mobile à une autre pour évaluer l'ensemble de tous les CYP450. Cette méthode rend possible un criblage des neuf CYP450 lors d'une même séquence d'analyse.

Lors du développement des méthodes de séparation, la vitesse d'analyse n'a pas été le principal critère qui a orienté la chromatographie, comme ce qui a été publié par *Testino et al.*⁵³. Bien qu'une approche en UPLC soit présentée comme un des outils analytiques pour

L'emphase portée à la chromatographie découle principalement des problèmes répertoriés dans la littérature lorsque des chromatographies rapides ont été utilisées. En effet, il a été publié que certains métabolites peuvent être fragmentés dans la source, menant à des ions [M+H]⁺ communs entre le substrat et son métabolite⁴⁴. Si ces deux espèces ne sont pas parfaitement résolues, ce phénomène entraîne un biais important lors de la quantification. La présente approche minimise ainsi l'apparition de ce genre de phénomène, en utilisant une chromatographie qui permet la résolution parfaite des analytes. Cette approche chromatographique, soit en HPLC ou en UPLC, permet aussi l'insertion de molécules ayant une activité inconnue lors des essais d'incubation tout en atténuant les possibilités de problèmes lors des analyses. La Figure 39 présente des exemples en HPLC-MS et en UPLC-MS/MS du type de séparation obtenu selon chaque stratégie analytique pour quatre CYP450. Il peut être constaté que les temps d'analyse sont relativement longs, et ce, même pour la portion UPLC du projet, puisque de trois à cinq minutes sont considérés comme temps d'élution élevé selon cette technique, exception faite de l'acétaminophène qui élue rapidement en milieu basique. Cependant,

ý□□□□□□□□□□Ú□□□□□□□□□□Ú□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□Ù□

En effet, des pics de l'ordre de quinze secondes ont été obtenus en HPLC et de l'ordre de 5 secondes, en UPLC. Cette caractéristique est importante afin d'obtenir de bonnes sensibilités. Autre mention, la spectrométrie de masse simple quadripôle est moins sélective que le tandem. Toutefois, les chromatogrammes en simple quadripôle présentent peu de bruit de fond pour les échantillons, ce qui témoigne d'un traitement en précipitation

efficace et d'une réduction des possibilités de problèmes liés à la matrice dû à une forte présence en contaminants.

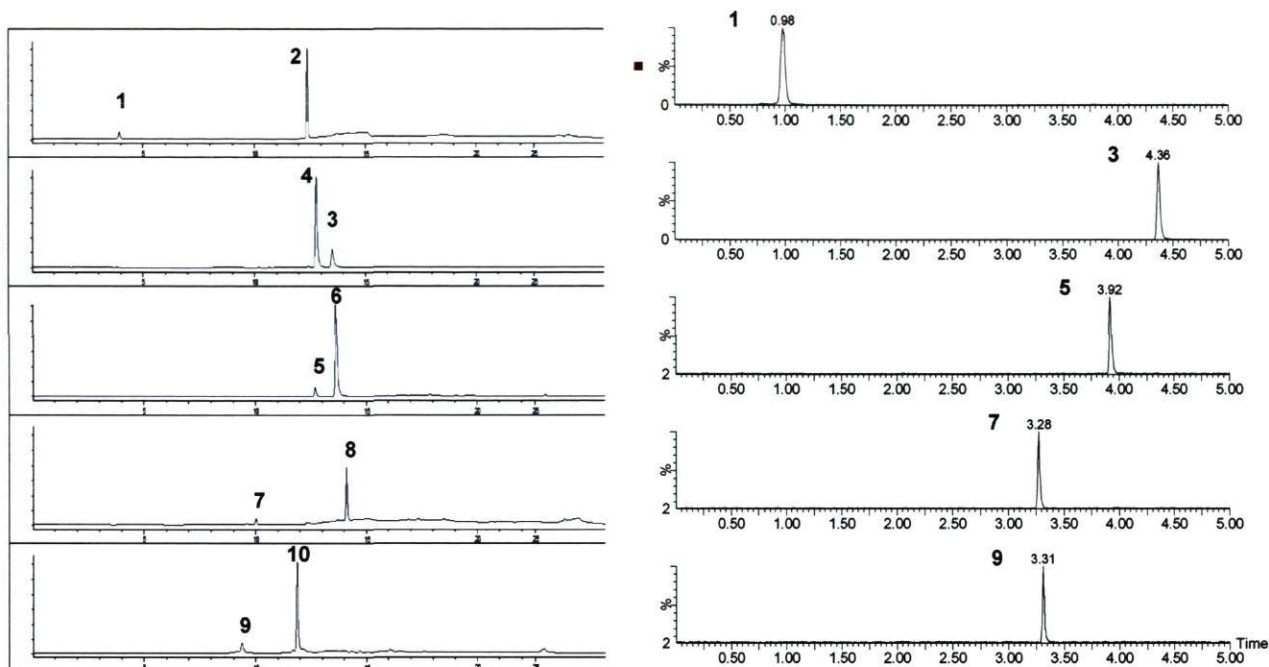


Figure 39 : Exemples de chromatogrammes en HPLC-MS (droite) et en UPLC-MS/MS (gauche) obtenus pour des mélanges d'incubation. **1** : acétaminophène (CYP1A2), **2** : tobutamide (SI), **3** : méthoxymorphinane (CYP3A4/5), **4** : paclitaxel (SI), **5** : hydroxytestostérone (CYP3A4/5), **6** : corticostérone (SI), **7** : hydroxytolbutamide (2C9), **8** : phénacétine (SI), **9** : hydroxyméphénytoïne (2C19), **10** : tolbutamide (SI)

En spectrométrie de masse, l'une des phases mobiles par excellence est un mélange d'eau et d'acétonitrile contenant 0,1% d'acide formique. Rappelons que toute phase mobile contenant un sel non-volatil, par exemple un tampon phosphate, est à proscrire en chromatographie liquide couplée à un détecteur de masse. Il est facile de comprendre que de tels sels s'accumulent dans la source d'ionisation, entraînant ainsi rapidement des problèmes lors de l'ionisation. Une phase mobile contenant un acide organique très volatil, comme l'acide formique, demeure une solution idéale pour fournir une source de proton et ainsi ioniser des composés en mode positif sous la forme $[M+H]^+$. Toutefois, bien que cet acide soit parfait en spectrométrie de masse, la phase mobile doit être compatible avec la colonne utilisée et les molécules à séparer.

Le cas de l'acétaminophène illustre bien ces contraintes, puisque la séparation qui a été développée sur la phase stationnaire BEH C18 implique l'utilisation d'un tampon très basique. En phase mobile acide, l'acétaminophène est bien retenu sur une phase stationnaire C18. Cependant, le pic obtenu est difforme et excessivement large sur certaines colonnes. Pour contrer ce problème, une forte concentration en solvant organique doit être utilisée, afin d'éluer ce composé plus tôt et ainsi diminuer son interaction avec la colonne. En augmentant la proportion de solvant organique lors de l'analyse, les autres composés du mélange d'incubation deviennent difficiles à séparer dans ces conditions. D'ailleurs, il demeure toujours plus efficace, lors de la chromatographie de plusieurs espèces en phase inverse, de débiter le gradient avec une forte teneur en tampon et augmenter progressivement le pourcentage en solvant organique durant l'analyse.

Dans cette optique, une phase mobile fortement basique, c'est-à-dire un mélange de bicarbonate d'ammonium et d'acétonitrile à pH 10,5, a été utilisé pour la séparation de l'acétaminophène de son substrat et de son standard interne. Les colonnes chromatographiques ne sont malheureusement pas toutes stables à ces pH extrêmes, ce qui n'est pas le cas de la phase hybride BEH. L'acétaminophène est une base, car son pKa est entre 9 et 10, ce qui explique partiellement son comportement en milieu acide. En effet, il est préférable d'analyser les bases en milieu basique, puisque la forme protonée en solution est contrecarrée et certaines interactions avec les silanols de la colonne sont minimisées. Le transfert des conditions acides aux conditions basiques a permis l'usage initial d'une phase mobile composée à 95% de tampon aqueux, ce qui était impossible en milieu acide sans affecter la qualité de la chromatographie.

En revanche, certains autres métabolites ont dû être analysés en milieu acide. C'est le cas par exemple de l'hydroxycoumarine et du méthoxymorphinane, qui démontraient de meilleurs comportements chromatographiques en conditions acides. Pour le cas de l'hydroxycoumarine, le caractère légèrement acide de ce composé pourrait expliquer la préférence d'utiliser une phase mobile acide. À l'inverse, on pourrait s'attendre à ce que le méthoxymorphinane soit préférablement analysé en milieu basique, ce qui n'est pas le cas en pratique. Il est clair que cette molécule n'est pas analysable en conditions basiques pH 10,5, car un pic difforme à deux têtes a été obtenu. Afin d'améliorer légèrement la séparation en milieu acide, un tampon d'acétate d'ammonium a été préféré à une simple solution d'acide formique. Un tampon possédant une plus grande charge en ions semble

avoir généralement pour effet de diminuer la largeur des pics obtenu et augmenter la résolution.

Finalement, la stratégie analytique en UPLC comporte certains avantages marqués par rapport au HPLC, malgré les coûts plus importants associés à l'achat de l'instrument et à son utilisation. Premièrement, ce système possède une capacité de résolution beaucoup plus grande que ce qui peut être obtenu en HPLC, et ce, en utilisant une même colonne sur les deux instruments. La différence réside dans le volume mort du UPLC qui est de l'ordre de 100 μL , par rapport à presque 1000 μL pour un HPLC. Cette diminution du volume interne entraîne beaucoup moins de diffusion de la bande injectée en amont et en aval de la colonne chromatographique, ce qui influence la largeur et la hauteur du pic mesuré au détecteur. La sensibilité d'analyse est régie par la hauteur du pic chromatographique par rapport au bruit de fond. Ainsi, le passage d'une méthode HPLC vers l'UPLC permet un gain direct en sensibilité, sans autre modification des conditions d'analyse.

Deuxièmement, la chromatographie liquide ultra-performante entraîne des bénéfices évidents en temps d'analyse. Comme l'évaluation d'un CYP450 nécessite plusieurs tubes d'incubation et engendre un grand nombre d'échantillons, le temps requis pour effectuer chaque analyse devient un facteur limitant. Le temps complet d'analyse en HPLC est de 27 minutes, tandis qu'en UPLC, 12 minutes sont nécessaires. Ceci implique que pour une séquence d'échantillons durant toute une journée en HPLC, soit 24 heures, l'analyse en UPLC pourra être complétée en moins de 11 heures, soit durant la nuit. Ce gain en vitesse d'analyse affecte directement la production du laboratoire, qui passera à plus du double. Dans ce contexte, il devient intéressant de sauver du temps si un criblage des neuf CYP450 doit être effectué rapidement. Pour une entreprise, à de tels bénéfices en temps sont associés directement des revenus en argent.

2.2 Spectrométrie de masse

Bien que la détection dans l'ultraviolet soit utilisée comme méthode de quantification dans le *Current Protocols in Pharmacology* et certaines publications^{109, 110}, la spectrométrie de masse a été préférée lors du développement des deux stratégies pour des raisons de sensibilité. Cependant, la configuration des deux systèmes utilisés a permis une détection simultanée en spectrométrie de masse et dans l'ultraviolet. Bien que la détection dans

l'ultraviolet ait été inutile pour la quantification des différents métabolites, ce type de détection a servi lors des étapes de développement des essais. Afin de s'assurer de la viabilité des microsomes et de l'exactitude des paramètres d'incubation, l'ultraviolet a été utilisé afin de suivre la diminution du substrat selon les temps d'incubation. Ce mode de détection a permis de s'assurer que les essais étaient sous contrôle.

Durant le développement des paramètres de détection en spectrométrie de masse, certains composés s'ionisaient mal dans certaines conditions, aussi bien en positif qu'en négatif. L'exemple de l'hydroxyméphénytoïne est l'un des plus éloquentes pour illustrer ce phénomène. Initialement, l'hydroxyméphénytoïne a été séparé et analysé en milieu acide avec le tampon d'acétate d'ammonium. Après différents réglages des paramètres de la source *electrospray*, il s'est avéré impossible d'obtenir un signal adéquat, et ce, en mode positif ou négatif.

Lors d'une revue de littérature, plusieurs informations contradictoires en ressortaient. *Zhang et al.*⁴³ ont été en mesure de quantifier adéquatement en *electrospray* mode positif l'hydroxyméphénytoïne dans un tampon d'acétate d'ammonium à une concentration en sels presque identique à ce qui a été utilisé lors des présents travaux. Pour ce faire, ils ont employé un TSQ Quantum de marque Thermo. De leur côté, *Yao et al.*¹⁰⁶ ont publié une méthode de quantification de l'hydroxyméphénytoïne en mode *electrospray* positif sur un instrument API-365 de Sciex en présence d'une phase mobile contenant 0,1% d'acide formique. À l'opposé, *Li et al.*⁴⁴ ont décrit des tentatives de quantification de cette même molécule en présence d'acide formique 0,2% et d'une source *electrospray* en mode positif. Les auteurs concluent qu'il leur est impossible de quantifier ce composé dans ce mode d'ionisation et que seul le mode *electrospray* négatif ou encore une interface (+) APCI leur rend le dosage possible. *Walski et al.*⁴², quant à eux, décrivent une méthode de quantification de l'hydroxyméphénytoïne, en présence d'un tampon d'acétate d'ammonium, à l'aide d'une source *electrospray* en mode d'ionisation négative. Ce groupe a utilisé un instrument de marque Micromass, le triple quadripôle Quattro Ultima.

Suite aux résultats disparates répertoriés d'une publication à l'autre et aux essais effectués sur les systèmes disponibles dans nos laboratoires, une réflexion s'imposait. Les spectromètres de masse sont des instruments conçus à la main par des équipes de physiciens, de chimistes et d'ingénieurs en électronique. Il est courant de voir deux instruments de même modèle, achetés en même temps, qui possèdent des sensibilités

totallement différentes. Ces sensibilités, pour un même composé dans des conditions d'analyse définie, peuvent facilement augmenter d'un ordre de grandeur de dix. De surcroît, les sources d'ionisation en spectrométrie de masse sont conçues différemment d'un fournisseur à l'autre. Chaque fournisseur vente les mérites de la conception de sa source et présente souvent des résultats à l'aide d'une molécule, qui donne un excellent rapport signal sur bruit avec sa source. La question se complique lors d'évaluations de spectromètre de masse avant achat chez les fournisseurs, car certaines applications vont fonctionner mieux sur un système qu'un autre et vice-versa. Il est alors légitime de se questionner si ce n'est pas le phénomène qui est observé ici, quant à la comparaison de l'hydroxyméphénytoïne sur plusieurs instruments de masse.

Les lacunes en sensibilité lors de la quantification de certains métabolites des essais, comme l'hydroxyméphénytoïne, ont été contournées. L'utilisation d'un tampon bicarbonate d'ammonium à haute charge en ions, soit une concentration de 2,5% en hydroxyde d'ammonium, a écarté la problématique existante. Ce tampon de chromatographie a permis d'opérer la source *electrospray* presque exclusivement en mode positif tout au cours du projet. En effet, ce tampon rend la quantification possible pour des composés comme l'hydroxyméphénytoïne, plus difficilement ionisables. Les limites nécessaires ont pu alors être atteintes et une mesure adéquate des différents métabolites, selon leur temps d'incubation, a pu être effectuée. Cette phase mobile a définitivement permis de contrecarrer les problèmes de sensibilité reliés à l'ionisation en spectrométrie de masse.

Lors des mesures, tous les métabolites ont été quantifiés en *electrospray* mode positif. Toutefois, il s'est avéré impossible de quantifier l'hydroxychlorzoxazone cette molécule dans ce mode, et ce, seulement en UPLC-MS/MS. En effet, bien que la stratégie HPLC-MS ait permis un dosage adéquat de ce métabolite en conditions acides, la source du système triple quadripôle de Waters ne donnait aucun signal dans ce mode. Dans ce contexte, il était impossible d'utiliser une phase mobile basique, puisque l'hydroxychlorzoxazone se comporte extrêmement mal dans ces conditions, menant est des doublets de pics. Le mode d'ionisation négatif a ainsi du être employé, afin d'obtenir une réponse adéquate de l'instrument. Ce métabolite est le seul ayant dû être mesuré en *electrospray* négatif et, encore ici, il est étonnant de constater que ce composé se comporte aussi différemment sur deux modèles de spectromètre de masse différents.

Pour ce qui de la comparaison entre les deux stratégies analytiques, la stratégie en UPLC-MS/MS se démarque encore ici. Bien que la spectrométrie de masse simple quadripôle soit assez sensible pour quantifier les essais selon les conditions expérimentales développées, la spectrométrie de masse tandem possède un net avantage en sensibilité. Cette constatation n'est pas une surprise, puisque la spectrométrie à triple quadripôle est reconnue comme étant la technique de quantification par excellence. Comme mentionné lors de la section théorique, un important bruit de fond est filtré au premier analyseur, ce qui augmente drastiquement le ratio signal sur bruit, ainsi la sensibilité. De surcroît, la technique en spectrométrie de masse tandem est beaucoup plus sélective, car le ou les fragments d'une masse sélectionnée au premier quadripôle sont détectés à l'analyseur. Par exemple, l'acétaminophène possède une masse sur charge (m/z) de 152 en *electrospray* positif. Dans une matrice complexe, un bon nombre de composés peuvent se fragmenter et produire un ion 152 à l'interface d'ionisation. La chromatographie devient alors très importante, puisque non seulement un ion est associé à cette molécule, mais aussi un temps de rétention en chromatographie. Pour une mesure du même composé en spectrométrie de masse tandem, il est beaucoup moins probable que la matrice contiennent une molécule qui produit un ion 152 à la source et se fragmente en ion 110 dans la chambre de collision. En additionnant le temps de rétention comme autre critère à l'analyse, la stratégie en UPLC-MS/MS demeure beaucoup plus spécifique que celle en HPLC-MS.

3. Optimisation des conditions d'incubation et d'arrêt

Les concentrations qui ont été utilisées pour les essais sont celles du Tableau 10, correspondant aux valeurs des constantes de Michaelis-Menten (K_m). Cette constante donne la concentration de substrat à laquelle est associée une production maximale de métabolite pour chaque CYP450. En fixant à une valeur sûre cette concentration, des ajustements des autres paramètres ont pu être effectués. Le premier paramètre qui a été adapté à la technique d'analyse utilisée est la concentration en microsomes.

En analyse HPLC-MS conventionnelle, une grande quantité de microsomes doit être utilisée durant les essais. Cette technique permet une détection adéquate des métabolites, mais les temps plus courts d'incubation engendrent des concentrations faibles près des limites de quantification. De plus, pour des CYP450 où le taux de conversion est plus

faible, la teneur en microsomes doit être significativement augmentée. Il est normal d'utiliser pour les essais dosés en HPLC-MS des concentrations en microsomes de 0,3 à 1,0 mg/mL en protéines, selon le CYP450 étudié et son activité.

L'approche en UPLC-MS/MS offre un double avantage lors de son utilisation pour la quantification des essais CYP450. Premièrement, une concentration plus faible en microsomes peut être utilisée, soit de 0,1 à 0,5 mg/mL en protéines. Puisque cette technique analytique est plus sensible, les temps plus courts d'incubation sont facilement mesurables à ces teneurs en microsomes. Ainsi, l'utilisation d'une moins grande quantité de microsomes entraîne des économies d'argent lors des essais, car les microsomes humains coûtent très cher. Deuxièmement, le fait d'utiliser de plus faibles concentrations en microsomes lors de l'incubation permet de réduire les interactions non-spécifiques. En effet, il a été répertorié que certains substrats, surtout ceux ayant une forte affinité pour un CYP450 donné, génèrent des résultats erronés à forte concentration¹¹¹⁻¹¹³. La forte concentration en substrat touche principalement la constante cinétique de l'enzyme et les mesures d'inhibition. Il est donc conseillé de travailler à des concentrations en microsomes les plus faibles possibles, ce qui est favorisé par une approche de mesure en UPLC-MS/MS.

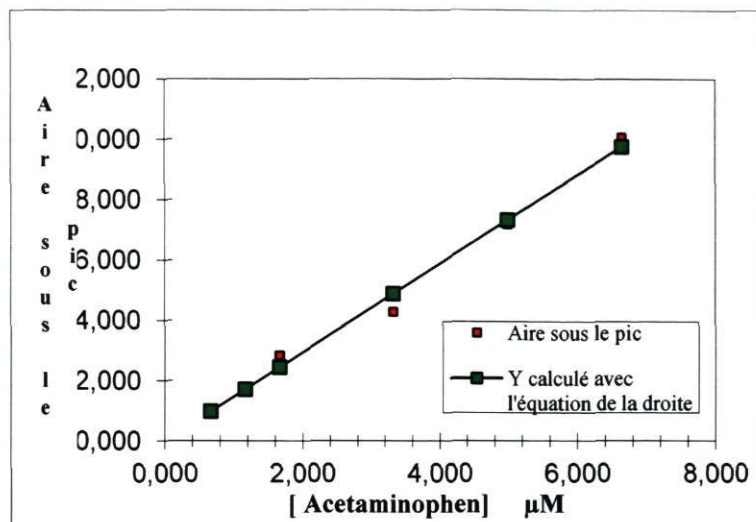
Des modifications aux procédures instrumentales du *Current Protocols in Pharmacology* ont été effectuées durant l'optimisation des essais. D'abord, un des facteurs limitant la reproductibilité des essais est la justesse du volume de substrat ajouté aux essais. Étant donné que la concentration en métabolite produit dépend de la concentration du substrat initialement dans le tube incubé, le volume de substrat doit être ajouté avec précision. Dans la procédure officielle, un volume de 1 à 2 µL d'un standard concentré est ajouté à chaque tube. Ce volume, qui est très petit, possède une grande incertitude sur sa valeur. Autrement dit, si une quantité définie de ce volume colle sur l'embout de plastique lors de l'ajout, le pourcentage de cette perte est plus important que sur un plus grand volume. Dans cet ordre d'idée, une solution en substrat dix fois moins concentrée a été préparée et des volumes de 10 à 20 µL ont été ajoutés aux essais. L'ajout d'un volume plus grand en substrat a permis de limiter l'erreur sur les variations de ce volume. Il faut toutefois garder en tête que le volume d'incubation ne doit pas contenir plus de 2% en solvant organique, car un effet sur la viabilité des enzymes est remarqué au-dessus de cette valeur.

Ensuite, l'arrêt du processus d'incubation a été modifié par rapport à ce qui est effectué dans le *Current Protocols in Pharmacology*. Selon les procédures officielles, l'arrêt s'effectue différemment pour chaque CYP450. Pour certaines incubations, l'interruption se fait par ajout d'acide phosphorique concentré, alors que pour d'autres une extraction liquide-liquide au dichlorométhane est nécessaire. Pour le premier cas, l'ajout d'une grande quantité de phosphates est à proscrire, puisque les mesures sont ensuite faites par spectrométrie de masse et que ce sel gêne énormément les analyses, en causant de la suppression ionique au cours d'une même séquence de dosage. D'ailleurs, la quantification des CYP450 qui utilise cette procédure est effectuée par détection dans l'ultraviolet. Pour le second cas, des manipulations d'extraction liquide-liquide sont laborieuses et requièrent beaucoup de temps de préparation. Ce type d'extraction conduit aussi à des variations analytiques plus grandes, dues au nombre de manipulations plus élevé. L'interruption a alors été uniformisée pour tous les essais, dans le but de simplifier l'approche. À tous les tubes d'incubation, un volume égal de méthanol contenant le standard interne a été ajouté, afin d'arrêter la réaction enzymatique. Après centrifugation, les solutions ont été injectées directement en chromatographie liquide avec détection en spectrométrie de masse. Cette approche s'est avérée simple et efficace, puisque beaucoup de temps de préparation a été sauvé et que tous les métabolites ont été retracés avec succès.

4. Validation et contrôle de la méthode

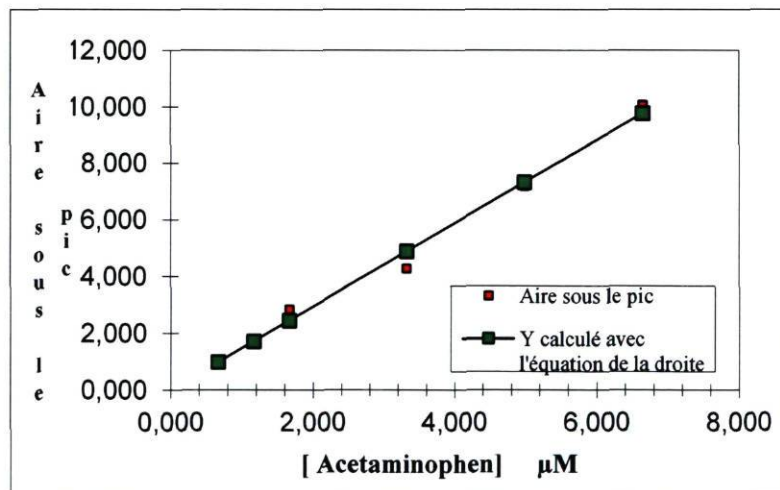
Pour ce qui est de la validation et du contrôle des méthodes analytiques, les résultats obtenus permettent d'affirmer que les méthodes développées lors de ce projet sont fiables et robustes. En effet, les blancs d'incubation analysés pour tous les métabolites n'ont pas mené à des dosages de faux positifs, ce qui confirme que la matrice des échantillons ne gêne pas la quantification. De plus, les contrôles positifs préparés à l'aide du mélange réactionnel et d'un ajout connu en standard de métabolites ont donné les résultats escomptés, c'est-à-dire la concentration attendue, comme le présente la colonne Exactitude des Tableau 11 et Tableau 12. Cette vérification est extrêmement importante, puisque parfois un phénomène de suppression ionique est observé en LC-MS, menant à une sous-estimation de la concentration d'un échantillon.

Tous les contrôles et les échantillons nécessaires à la validation des méthodes analytiques ont été préparés le jour même de l'analyse. Le Tableau 11 et le Tableau 12 présentent les résultats obtenus pour la validation des méthodes en HPLC-MS et en UPLC-MS/MS. En comparant les résultats des deux tableaux, il peut être observé que la variation des paramètres des méthodes UPLC-MS/MS est généralement moins importante. Ceci peut s'expliquer par la plus grande sensibilité obtenue en spectrométrie de masse tandem, combinée avec la fiabilité des nouveaux instruments UPLC. De façon générale, la validation a mené à des bons résultats, puisque l'exactitude et la précision relative des méthodes sont en deçà de dix pourcent et la linéarité des droites d'étalonnage est satisfaisante. Rappelons que l'exactitude relative a été mesurée à l'aide de cinq blancs d'incubation avec ajouts d'une quantité connue du métabolite et l'écart relatif entre la moyenne trouvée pour ces répliques et la concentration théorique attendue a été calculé. Pour la précision relative, l'écart-type relatif du signal pour cinq injections du même échantillon a été calculée et la moyenne est présentée dans chaque tableau. Des exemples de droites d'étalonnage obtenues en HPLC-MS et en UPLC-MS/MS sont présentés en Figures 40 et 41 et les valeurs de linéarité présentées aux Tableau 11 et 12 sont issues d'une moyenne des coefficients de corrélation linéaire calculés pour cinq droites distinctes. Finalement, les limites de détection et de quantification, évaluées en mesurant trois et dix fois l'écart-type sur le signal de fond, ont permis un dosage adéquat de chaque métabolite des essais CYP450.



Pente (m) :	1,4672
Ordonnée à l'origine (b) :	0,0100
Coefficient de corrélation (R^2):	0,99488
L'équation de la droite est : $Y =$	$1,46720x + 0,01003$

Figure 40 : Exemple de droite d'étalonnage et de paramètres reliés à cette droite pour la quantification de l'acétaminophène (CYP1A2) par HPLC-MS



Pente (m) :	10,884
Ordonnée à l'origine (b)	-0,184
Coefficient de corrélation (R^2):	0 0.9943
L'équation de la droite est : $Y =$	$10,8846 x + -0,1842$

Figure 41 : Exemple de droite d'étalonnage et de paramètres reliés à cette droite pour la quantification de l'acétaminophène (CYP1A2) par UPLC-MS/MS

Tableau 11 : Linéarité, limites de quantification (LDQ) et de détection (LDD) et contrôle qualité pour l'analyse des essais par HPLC-MS

CYP	Métabolite	Linéarité (R ²)	LDQ (μM)	LDD (μM)	Exactitude relative (%)	Écart-type relatif (%)
1A2	AP	0,9937	0,16	0,048	9,3	• 2,8
2A6	OH-CM	0,9968	0,052	0,015	7,9	1,8
3A4/5	MM	0,9995	0,19	0,057	6,8	3,3
3A4/5	OH-TS	0,9992	0,024	0,0072	4,3	2,9
2B6	NV	0,9944	0,042	0,013	8,8	5,1
2C8	OH-PT	0,9981	0,18	0,054	7,5	4,6
2C9	OH-TB	0,9988	0,12	0,036	5,3	1,5
2C19	OH-MP	0,9950	0,059	0,018	6,9	4,7
2D6	DX	0,9922	0,29	0,087	9,1	6,4
2E1	OH-CZ	0,9939	0,32	0,096	8,4	5,9

Tableau 12 : Linéarité, limites de quantification (LDQ) et de détection (LDD) et contrôle qualité pour l'analyse des essais par UPLC-MS/MS

CYP	Métabolite	Linéarité (R ²)	LDQ (μM)	LDD (μM)	Exactitude relative (%)	Écart-type relatif (%)
1A2	AP	0,9992	0,0022	0,00066	4,5	1,9
2A6	OH-CM	0,9988	0,0011	0,00033	6,1	1,6
3A4/5	MM	0,9995	0,0029	0,00087	5,8	2,4
3A4/5	OH-TS	0,9998	0,00041	0,00012	4,3	1,2
2B6	NV	0,9979	0,0031	0,00093	5,1	3,3
2C8	OH-PT	0,9985	0,00083	0,00025	4,7	2,8
2C9	OH-TB	0,9994	0,00058	0,00017	3,9	1,8
2C19	OH-MP	0,9981	0,0048	0,0014	5,4	3,8
2D6	DX	0,9991	0,00089	0,00027	7,0	4,1
2E1	OH-CZ	0,9969	0,0029	0,00087	5,5	4,4

Chapitre 5: Synthèse et conclusions

Le but principal de ce projet était de développer des stratégies analytiques en chromatographie liquide couplée à la détection par spectrométrie de masse pour évaluer les neuf principaux CYP450. Pour ce faire, des instruments HPLC-MS et UPLC-MS/MS ont été utilisés, afin de mettre au point deux approches analytiques différentes qui permettent de quantifier les métabolites des différents essais CYP450. Ces essais sont d'intérêts, puisqu'ils permettent d'évaluer les interactions pharmacologiques de composés bioactifs mis sur le marché. Toutefois, la grande diversité en paramètres analytiques recensée dans la littérature ne facilite pas l'application de ces essais en laboratoire. Une approche simple et rapide, ayant recours à une seule colonne analytique et deux phases mobiles, a été mise au point lors de ce projet. L'utilisation de systèmes d'ancienne ou de nouvelle génération, soit en HPLC-MS ou en UPLC-MS/MS, permet à tous laboratoire d'utiliser les méthodes développées et de les appliquer, afin d'évaluer l'interaction pharmacologique d'un composé bioactif d'intérêt.

De surcroît, les publications qui ont présenté une même approche pour la quantification de neuf CYP450 sont plutôt rares, ce qui rend la méthodologie développée originale. Une seule publication présentant une approche pour les neuf CYP450 majeurs est recensée dans la littérature. Par contre, les auteurs n'ont pas évalué deux traceurs pour le CYP3A4, ce qui constitue une lacune dans leur approche, puisque ce cytochrome est très souvent impliqué dans la métabolisation et que sa caractérisation adéquate est essentielle. L'approche proposée dans ce document utilise deux substrats reconnus pour le CYP3A4, en combinaison avec deux phases mobiles différentes, ce qui limite non seulement les erreurs analytiques, mais met aussi en relation les variations pharmacologiques pour un même composé. La méthodologie développée a l'avantage d'utiliser des substrats facilement disponibles commercialement et d'un faible coût d'achat. Ces caractéristiques rendent l'approche mise au point fiable et accessible à laboratoire d'analyse.

Finalement, il a été démontré que les méthodes analytiques développées sont robustes, puisqu'une validation complète a été effectuée. Cette validation a permis de contrôler l'ensemble des méthodologies et de s'assurer de la fiabilité de ce qui a été mis au point. Les résultats se sont avérés excellents et aucun biais dans les analyses n'a été répertorié.

Les méthodologies développées ont servi durant deux projets avec des entreprises, ce qui témoigne de la validité des plateformes dans un contexte appliqué. Toutefois, il a été impossible de présenter ces résultats par confidentialité face aux deux clients. Les travaux développés lors de ce projet ont aussi été présentés à certains colloques scientifiques et une publication est présentement en cours de rédaction. Les stratégies analytiques développées sont maintenant prêtes à être utilisées dans le cadre d'essais *in vitro* précliniques, afin d'évaluer les interactions pharmacologiques de nouvelles molécules à intérêt préventif ou curatif.

Références bibliographiques

- (1) BÉLIVEAU, R., DENIS GINGRAS *LES ALIMENTS CONTRE LE CANCER*, 2005.
- (2) OLIVER, S. G.; WINSON, M. K.; KELL, D. B.; BAGANZ, F. *TRENDS BIOTECHNOL* **1998**, 16, 373-378.
- (3) DIXON, R. A. *PHYTOCHEMISTRY* **2001**, 57, 145-148.
- (4) HARTMANN, T.; KUTCHAN, T. M.; STRACK, D. *PHYTOCHEMISTRY* **2005**, 66, 1198-1199.
- (5) TRETHEWEY, R. N.; KROTZKY, A. J.; WILLMITZER, L. *CURR OPIN PLANT BIOL* **1999**, 2, 83-85.
- (6) FIEHN, O.; KOPKA, J.; DORMANN, P.; ALTMANN, T.; TRETHEWEY, R. N.; WILLMITZER, L. *NAT BIOTECHNOL* **2000**, 18, 1157-1161.
- (7) TRETHEWEY, R. N. *CURR OPIN BIOTECHNOL* **2001**, 12, 135-138.
- (8) OLIVER, D. J.; NIKOLAU, B.; WURTELE, E. S. *METAB ENG* **2002**, 4, 98-106.
- (9) SUMNER, L. W.; MENDES, P.; DIXON, R. A. *PHYTOCHEMISTRY* **2003**, 62, 817-836.
- (10) THOMPSON, J. A.; MARKEY, S. P. *ANAL CHEM* **1975**, 47, 1313-1321.
- (11) WARD, M. E.; POLITZER, I. R.; LASETER, J. L.; ALAM, S. Q. *BIOMED MASS SPECTROM* **1976**, 3, 77-80.
- (12) THOMPSON, J. A. M., S. P.; MILES, B. S.; FENNESSEY, P. V. *ADV. MASS SPECTROM. BIOCHEM. MED.* **1977**, 2, 1-9.
- (13) DETTMER, K.; ARONOV, P. A.; HAMMOCK, B. D. *MASS SPECTROM REV* **2007**, 26, 51-78.
- (14) ROBERTSON, D. G.; REILY, M. D.; SIGLER, R. E.; WELLS, D. F.; PATERSON, D. A.; BRADEN, T. K. *TOXICOL SCI* **2000**, 57, 326-337.
- (15) LINDON, J. C. N., J. K.; HOLMES, E.; EVERETT, J. R. *CONCEPTS MAGN. RESON.* **2000**, 12, 289-320.
- (16) WANT, E. J.; O'MAILLE, G.; SMITH, C. A.; BRANDON, T. R.; URITBOONTHAI, W.; QIN, C.; TRAUGER, S. A.; SIUZDAK, G. *ANAL CHEM* **2006**, 78, 743-752.
- (17) PAIGE, L. A.; MITCHELL, M. W.; KRISHNAN, K. R.; KADDURAH-DAOUK, R.; STEFFENS, D. C. *INT J GERIATR PSYCHIATRY* **2007**, 22, 418-423.
- (18) NORDSTROM, A.; WANT, E.; NORTHEM, T.; LEHTIO, J.; SIUZDAK, G. *ANAL CHEM* **2008**, 80, 421-429.
- (19) DUNN, W. B., ELLIS, D. I. *METABOLOMICS: CURRENT ANALYTICAL PLATFORMS AND METHODOLOGIES. TRENDS ANAL. CHEM.* **2005**, 24, 285-294.
- (20) ROBERTSON, D. G. *TOXICOL SCI* **2005**, 85, 809-822.
- (21) LENZ, E. M., WILSON, I. D. *ANALYTICAL STRATEGIES IN METABONOMICS. J. PROTEOME RES.* **2007**, 6, 443-458.
- (22) E. J. ROOK, M. J. H., H. ROSING, J. M. VAN REE, J. H. BEIJNEN, *J. CHROMATOGR., B* **2005**, 824, 213.
- (23) PETROVIC, M.; GROS, M.; BARCELO, D. *J CHROMATOGR A* **2006**, 1124, 68-81.
- (24) KRATZSCH, C.; PETERS, F. T.; KRAEMER, T.; WEBER, A. A.; MAURER, H. H. *J MASS SPECTROM* **2003**, 38, 283-295.
- (25) ZLOKARNIK, G.; GROOTENHUIS, P. D.; WATSON, J. B. *DRUG DISCOV TODAY* **2005**, 10, 1443-1450.
- (26) ROSTAMI-HODJEGAN, A., TUCKER, G. *DRUG DISCOV. TODAY: TECHNOL.* **2004**, 1, 441-448.
- (27) TUCKER, G. T.; HOUSTON, J. B.; HUANG, S. M. *CLIN PHARMACOL THER* **2001**, 70, 103-114.
- (28) OBACH, R. S.; WALSKY, R. L.; VENKATAKRISHNAN, K.; HOUSTON, J. B.; TREMAINE, L. M. *CLIN PHARMACOL THER* **2005**, 78, 582-592.

- (29) OBACH, R. S.; WALSKY, R. L.; VENKATAKRISHNAN, K.; GAMAN, E. A.; HOUSTON, J. B.; TREMAINE, L. M. *J PHARMACOL EXP THER* **2006**, 316, 336-348.
- (30) HUANG, S. M.; LESKO, L. J.; WILLIAMS, R. L. *J CLIN PHARMACOL* **1999**, 39, 1006-1014.
- (31) CRESPI, C. L.; MILLER, V. P.; PENMAN, B. W. *ANAL BIOCHEM* **1997**, 248, 188-190.
- (32) CRESPI, C. L.; MILLER, V. P.; PENMAN, B. W. *MED. CHEM. REV* **1998**, 8, 457-471.
- (33) DIERKS, E. A.; STAMS, K. R.; LIM, H. K.; CORNELIUS, G.; ZHANG, H.; BALL, S. E. *DRUG METAB DISPOS* **2001**, 29, 23-29.
- (34) JANSEN, E. H.; DE FLUITER, P. *J CHROMATOGR* **1992**, 580, 325-346.
- (35) CRESPI, C. L. D. M. S. *J. PHARMACOL. TOXICOL. METHOD.* **2001**, 44, 325.
- (36) COHEN, L. H.; REMLEY, M. J.; RAUNIG, D.; VAZ, A. D. *DRUG METAB DISPOS* **2003**, 31, 1005-1015.
- (37) DONATO, M. T.; JIMENEZ, N.; CASTELL, J. V.; GOMEZ-LECHON, M. J. *DRUG METAB DISPOS* **2004**, 32, 699-706.
- (38) STRESSER, D. M.; TURNER, S. D.; BLANCHARD, A. P.; MILLER, V. P.; CRESPI, C. L. *DRUG METAB DISPOS* **2002**, 30, 845-852.
- (39) AYRTON, J.; PLUMB, R.; LEAVENS, W. J.; MALLET, D.; DICKINS, M.; DEAR, G. J. *RAPID COMMUN MASS SPECTROM* **1998**, 12, 217-224.
- (40) YIN, H.; RACHA, J.; LI, S. Y.; OLEJNIK, N.; SATOH, H.; MOORE, D. *XENOBIOTICA* **2000**, 30, 141-154.
- (41) CHU, I.; FAVREAU, L.; SOARES, T.; LIN, C.; NOMEIR, A. A. *RAPID COMMUN MASS SPECTROM* **2000**, 14, 207-214.
- (42) WALSKY, R. L.; OBACH, R. S. *DRUG METAB DISPOS* **2004**, 32, 647-660.
- (43) ZHANG, S.; SONG, N.; LI, Q.; FAN, H.; LIU, C. *J CHROMATOGR B ANALYT TECHNOL BIOMED LIFE SCI* **2008**, 871, 78-89.
- (44) LI, X.; CHEN, X.; LI, Q.; WANG, L.; ZHONG, D. *J CHROMATOGR B ANALYT TECHNOL BIOMED LIFE SCI* **2007**, 852, 128-137.
- (45) E. DELAPORTE, A. D. R., 2001, PP 3.9.1-3.9.32.
- (46) FAVREAU, L. V.; PALAMANDA, J. R.; LIN, C. C.; NOMEIR, A. A. *DRUG METAB DISPOS* **1999**, 27, 436-439.
- (47) BAPIRO, T. E.; EGNELL, A. C.; HASLER, J. A.; MASIMIREMBWA, C. M. *DRUG METAB DISPOS* **2001**, 29, 30-35.
- (48) NOMEIR, A. A.; RUEGG, C.; SHOEMAKER, M.; FAVREAU, L. V.; PALAMANDA, J. R.; SILBER, P.; LIN, C. C. *DRUG METAB DISPOS* **2001**, 29, 748-753.
- (49) WEAVER, R.; GRAHAM, K. S.; BEATTIE, I. G.; RILEY, R. J. *DRUG METAB DISPOS* **2003**, 31, 955-966.
- (50) WANG, R. W.; NEWTON, D. J.; LIU, N.; ATKINS, W. M.; LU, A. Y. *DRUG METAB DISPOS* **2000**, 28, 360-366.
- (51) KENWORTHY, K. E.; BLOOMER, J. C.; CLARKE, S. E.; HOUSTON, J. B. *BR J CLIN PHARMACOL* **1999**, 48, 716-727.
- (52) WIENKERS, L. C. *J PHARMACOL TOXICOL METHODS* **2001**, 45, 79-84.
- (53) TESTINO, S. A., JR.; PATONAY, G. *J PHARM BIOMED ANAL* **2003**, 30, 1459-1467.
- (54) WRIGHTON, S. A.; STEVENS, J. C. *CRIT REV TOXICOL* **1992**, 22, 1-21.
- (55) STREETMAN, D. S.; KASHUBA, A. D.; BERTINO, J. S., JR.; KULAWY, R.; ROCCI, M. L., JR.; NAFZIGER, A. N. *PHARMACOGENETICS* **2001**, 11, 349-355.
- (56) KASHUBA A.D.M., B. J. S. IN *DRUG INTERACTIONS IN INFECTIOUS DISEASES*, 2ND ED; PISCITELLI S.C., R. K. A., ED, ED.; HUMANA PRESS, 2005, PP 13-39.
- (57) ETTRE, L. S. *LC-GC NORTH AMERICA* **2005**.
- (58) ETTRE, L. S. *LC-GC NORTH AMERICA* **2005**.
- (59) MACNAIR, J. E.; LEWIS, K. C.; JORGENSON, J. W. *ANAL CHEM* **1997**, 69, 983-989.

- (60) DJORDJEVIC, N. M.; HOUDIERE, F.; FOWLER, P. *BIOMED CHROMATOGR* **1998**, *12*, 153-154.
- (61) MACNAIR, J. E.; PATEL, K. D.; JORGENSEN, J. W. *ANAL CHEM* **1999**, *71*, 700-708.
- (62) TOLLEY, L.; JORGENSEN, J. W.; MOSELEY, M. A. *ANAL CHEM* **2001**, *73*, 2985-2991.
- (63) PATEL, K. D.; JERKOVICH, A. D.; LINK, J. C.; JORGENSEN, J. W. *ANAL CHEM* **2004**, *76*, 5777-5786.
- (64) SHEN, Y.; ZHANG, R.; MOORE, R. J.; KIM, J.; METZ, T. O.; HIXSON, K. K.; ZHAO, R.; LIVESAY, E. A.; UDSETH, H. R.; SMITH, R. D. *ANAL CHEM* **2005**, *77*, 3090-3100.
- (65) QUE, A. H.; NOVOTNY, M. V. *ANAL CHEM* **2002**, *74*, 5184-5191.
- (66) LEGIDO-QUIGLEY, C.; MARLIN, N. D.; MELIN, V.; MANZ, A.; SMITH, N. W. *ELECTROPHORESIS* **2003**, *24*, 917-944.
- (67) TOLSTIKOV, V. V.; LOMMEN, A.; NAKANISHI, K.; TANAKA, N.; FIEHN, O. *ANAL CHEM* **2003**, *75*, 6737-6740.
- (68) TANAKA, N.; KIMURA, H.; TOKUDA, D.; HOSOYA, K.; IKEGAMI, T.; ISHIZUKA, N.; MINAKUCHI, H.; NAKANISHI, K.; SHINTANI, Y.; FURUNO, M.; CABRERA, K. *ANAL CHEM* **2004**, *76*, 1273-1281.
- (69) WILSON, I. D.; NICHOLSON, J. K.; CASTRO-PEREZ, J.; GRANGER, J. H.; JOHNSON, K. A.; SMITH, B. W.; PLUMB, R. S. *J PROTEOME RES* **2005**, *4*, 591-598.
- (70) VAN DEEMTER, J., FJ ZUIDERWEG, A KLINKENBERG *CHEMICAL ENGINEERING SCIENCE* **1956**, *5*, 271-289.
- (71) THOMPSON, S. J. J. *RAYS OF POSITIVE ELECTRICITY AND THEIR APPLICATION TO CHEMICAL ANALYSIS*, 1913.
- (72) O'NEAL, M. J. J. W., T. P *ANAL. CHERN* **1951**, *23*, 830-843.
- (73) BROWN, R. A. M., F. W.; YOUNG, W. S. *PET. PROCESS* **1952**, *7*, 204.
- (74) DIBELER, V. H. *ANAL. CHERN.* **1954**, *26*, 58-65.
- (75) ROCK, S. M. *ANAL. CHERN.* **1951**, *23*, 261-268.
- (76) DEMAYO, P. R., R L. *CHERN. IND (LONDON)* **1956**, 1481.
- (77) HAPP, G. P. S., D. W. *J. AM. CHERN. SOC.* **1952**, *74*, 4404-4408.
- (78) LONG, F. A. F., L. J. *AM. CHERN. SOC.* **1953**, *75*, 2832-2836; 2837-2840.
- (79) MOMIGNY, J. *BULL. SOC. ROY. SCI. LKGE* **1953**, *22*, 541.
- (80) NICHOLSON, A. J. C. *TRANS. FARADAY SOC.* **1954**, *50*, 1067.
- (81) BEYNON, J. H. *NATURE* **1954**, *174*, 735.
- (82) SHARKEY, A. C., SCHULTZ, J. L.; FRIEDEL, R.A. *ANAL. CHERN.* **1956**, *28*, 934-944.
- (83) GOHLKE, R. S. A. M., F.W. *J AM SOC MASS SPECTROM* **1993**, *4*, 367-371.
- (84) GOHLKE, R. S. *ANAL. CHERN* **1959**, *31*, 535-541.
- (85) BYRDWELL, W. C. *LIPIDS* **2001**, *36*, 327-346.
- (86) MARCHI, I.; RUDAZ, S.; VEUTHEY, J. L. *TALANTA* **2009**, *78*, 1-18.
- (87) KLINGENBERG, M. *ARCH BIOCHEM BIOPHYS* **1958**, *75*, 376-386.
- (88) GARFINKEL, D. *ARCH BIOCHEM BIOPHYS* **1958**, *77*, 493-509.
- (89) NELSON, D. R.; KOYMANS, L.; KAMATAKI, T.; STEGEMAN, J. J.; FEYEREISEN, R.; WAXMAN, D. J.; WATERMAN, M. R.; GOTOH, O.; COON, M. J.; ESTABROOK, R. W.; GUNSALUS, I. C.; NEBERT, D. W. *PHARMACOGENETICS* **1996**, *6*, 1-42.
- (90) PARKINSON, A. *TOXICOL PATHOL* **1996**, *24*, 48-57.
- (91) GUENGERICH, F. P.; SHIMADA, T. *MUTAT RES* **1998**, *400*, 201-213.
- (92) SCHLICHTING, I.; BERENDZEN, J.; CHU, K.; STOCK, A. M.; MAVES, S. A.; BENSON, D. E.; SWEET, R. M.; RINGE, D.; PETSKE, G. A.; SLIGAR, S. G. *SCIENCE* **2000**, *287*, 1615-1622.
- (93) GUENGERICH, F. P. *J BIOL CHEM* **1991**, *266*, 10019-10022.
- (94) HONIG, P. K.; SMITH, J. E.; WORTHAM, D. C.; ZAMANI, K.; CANTILENA, L. R. *DRUG METABOL DRUG INTERACT* **1994**, *11*, 161-168.

- (95) HONIG, P. K.; WORTHAM, D. C.; HULL, R.; ZAMANI, K.; SMITH, J. E.; CANTILENA, L. R. *J CLIN PHARMACOL* **1993**, 33, 1201-1206.
- (96) HONIG, P. K.; WORHAM, D. C.; ZAMANI, K.; MULLIN, J. C.; CONNER, D. P.; CANTILENA, L. R. *CLIN PHARMACOL THER* **1993**, 53, 630-636.
- (97) HONIG, P. K.; WORTHAM, D. C.; ZAMANI, K.; CONNER, D. P.; MULLIN, J. C.; CANTILENA, L. R. *JAMA* **1993**, 269, 1513-1518.
- (98) HONIG, P. K.; WORTHAM, D. C.; ZAMANI, K.; CONNER, D. P.; MULLIN, J. C.; CANTILENA, L. R. *EUR J CLIN PHARMACOL* **1993**, 45, 41-46.
- (99) HONIG, P. K.; WOOSLEY, R. L.; ZAMANI, K.; CONNER, D. P.; CANTILENA, L. R., JR. *CLIN PHARMACOL THER* **1992**, 52, 231-238.
- (100) RODRIGUES, A. D.; LIN, J. H. *CURR OPIN CHEM BIOL* **2001**, 5, 396-401.
- (101) XENOTECH, K., USA XTREME 200 LOT 0810413 DATASHEET **2009**.
- (102) BARON, J. M.; GOH, L. B.; YAO, D.; WOLF, C. R.; FRIEDBERG, T. *J PHARMACOL EXP THER* **2001**, 296, 351-358.
- (103) HEYN, H.; WHITE, R. B.; STEVENS, J. C. *DRUG METAB DISPOS* **1996**, 24, 948-954.
- (104) KO, J. W.; DESTA, Z.; FLOCKHART, D. A. *DRUG METAB DISPOS* **1998**, 26, 775-778.
- (105) HANIOKA, N.; MATSUMOTO, K.; SAITO, Y.; NARIMATSU, S. *BASIC CLIN PHARMACOL TOXICOL*, 107, 565-569.
- (106) YAO, M.; ZHU, M.; SINZ, M. W.; ZHANG, H.; HUMPHREYS, W. G.; RODRIGUES, A. D.; DAI, R. *J PHARM BIOMED ANAL* **2007**, 44, 211-223.
- (107) YAO, H. T.; CHANG, Y. W.; LAN, S. J.; YEH, T. K. *FOOD CHEM TOXICOL* **2008**, 46, 645-653.
- (108) KIM, M. J.; KIM, H.; CHA, I. J.; PARK, J. S.; SHON, J. H.; LIU, K. H.; SHIN, J. G. *RAPID COMMUN MASS SPECTROM* **2005**, 19, 2651-2658.
- (109) BOURRIE, M.; MEUNIER, V.; BERGER, Y.; FABRE, G. *J PHARMACOL EXP THER* **1996**, 277, 321-332.
- (110) EAGLING, V. A.; TJIA, J. F.; BACK, D. J. *BR J CLIN PHARMACOL* **1998**, 45, 107-114.
- (111) KALVASS, J. C.; TESS, D. A.; GIRAGOSSIAN, C.; LINHARES, M. C.; MAURER, T. S. *DRUG METAB DISPOS* **2001**, 29, 1332-1336.
- (112) MARGOLIS, J. M.; OBACH, R. S. *DRUG METAB DISPOS* **2003**, 31, 606-611.
- (113) OBACH, R. S. *DRUG METAB DISPOS* **1997**, 25, 1359-1369.

Références des figures

- Figure 1 : Gerry Hendrickx, Waters Regional Sales Manager, Central Europe, "Developments in Waters Column Chemistries : BEH Technology", Waters Corporation, 2003.
Accessible via internet à :
<http://www.kvcv.be/downloads/hplc/11h50%20BEH%20als%20nieuwe%20kolomfase.pdf>
- Figure 2 : Image tiré du site de VWR pour les colonnes Chromolith® de marque Merck
Accessible via internet à :
https://uk.vwr.com/app/catalog/Catalog?parent_class_id=4&parent_class_cd=116008&frmls=x
- Figures 7, 8, 11, 12, 13 et 14 : Schémas tirés de: Angelika Gratzfeld-Hüsken et Rainer Schuster, « HPLC for Environmental Analysis – A Primer », Hewlett-Packard Company, 1994, 111 pages.
- Figure 15: Schéma tiré du site *Chromedia – Chromatography Knowledge Base*
Accessible via internet à :
<http://www.chromedia.org/chromedia?waxtrapp=xqegzCsHqnOxmOllEcCbC&subNav=wnjedDsHqnOxmOllEcCbC>
- Figure 17: Schéma tiré du site de *Waters Corporation*
Accessible via internet à :
<http://www.waters.com/waters/promotionDetail.htm?id=10048693>
- Figure 18: Schéma tiré du site de *Waters Corporation*
Accessible via internet à :
<http://www.waters.com/webassets/cms/library/docs/720002064en.pdf>
- Figure 19: Image tirée de « Rays of Positive Electricity and their Application to Chemical Analyses », JJ Thomson, 1921
- Figures 20, 21 et 22 : Photographies tirées de : Journal of the American Society for Mass Spectrometry, 4, pp. 367-371 (1993).
- Figure 23: Photographie tirée de : David C. Brock, « A Measure of Success », Chemical Heritage Magazine, Chemical Heritage Foundation.
Accessible via internet à :
<http://www.chemheritage.org/discover/media/magazine/articles/29-1-a-measure-of-success.aspx?page=2>
- Figure 24: Image "Schematic diagram of an EI ion source.jpg", figurant sur la page Wikipedia « Electron ionization ».
Accessible via internet à :
http://en.wikipedia.org/wiki/Electron_ionization
- Figure 25: Diagramme tiré du site de *Agilent Technologies*
Accessible via internet à :
<http://www.chem.agilent.com/Library/technicaloverviews/Public/5990--7413EN.pdf>
- Figure 26: Diagramme tiré du site du *Magnet Lab – National High Magnetic Field Laboratory*, Florida State University-Los Alamos National Laboratory-University of Florida.
Accessible via internet à :
http://www.magnet.fsu.edu/education/tutorials/tools/ionization_esi.html
- Figure 27: Image tiré de : Talanta 78, 2009, pp1-18
- Figure 29: Diagramme tiré du site de *GIGA Protéomique – Université de Liège*
Accessible via internet à :
http://www.giga.ulg.ac.be/jcms/cdu_15169/maldi-tof/tof-bruker-ultraflex-ii-tof/tof-april-2005
- Figure 30: Figure tirée du site du *Centre de biophysique moléculaire - CNRS*
Accessible via internet à :
<http://cbm.cnrs-orleans.fr/spip.php?rubrique96>
- Figure 31: Figure tirée du site *e-Notes*, rubrique « Quadrupole Ion Trap »
Accessible via internet à :
http://www.enotes.com/topic/Quadrupole_ion_trap

Figure 32: Diagramme de la configuration du détecteur *Waters TQD* appartenant à *TransBIOTech*, issu du logiciel *MassLynx*.

Figure 33: Figure tirée du site de *Aston Labs – Purdue University*
Accessible via internet à :
<http://aston.chem.purdue.edu/research/instrumentation/orbitrap>
et
http://www.biotechts.com/body_lcsmms_thermo.html

Figure 34: Figure tirée du site de la *Plateforme d'ingénierie Cellulaire & Analyse de protéines – Université de Picardie*
Accessible via internet à :
<http://www.u-picardie.fr/plateforme/icap/orbitrap.html>

Figure 35: Figure tirée du site du *Thompson Mass Spectrometry Laboratory – Universidade Estadual de Campinas*
Accessible via internet à :
http://thomson.iqm.unicamp.br/instruments_details.php?cod_instrument=6

Figure 36: Figure tirée de : « *Comprehensive Summaries of Uppsala Dissertations from the Faculty of Pharmacy* », J. Bylund, 231, 2000