

Revue générale

Utilisation d'outils sélectifs pour l'analyse de traces dans des échantillons complexes

Selective tools for trace analysis in complex samples

Florence Chapuis-Hugon^{*}, Valérie Pichon

Laboratoire des Sciences Analytiques, Bioanalytiques et Miniaturisation, UMR PECSA 7195 CNRS-ESPCI-UPMC, École supérieure de Physique et de Chimie Industrielles (ESPCI ParisTech), 10 rue Vauquelin, 75231 Paris Cedex 05, France

Résumé – Les faibles teneurs recherchées pour des composés appartenant à des classes très diversifiées reste un réel challenge analytique quel que soit le domaine d'application (clinique, agroalimentaire, environnemental, ...). L'évolution de l'instrumentation en termes de séparation et de détection a permis d'améliorer la sensibilité des méthodes et de réduire le temps d'analyse. Cependant, les faibles niveaux de concentration et la complexité des matrices requièrent encore l'incorporation d'étapes de purification et de préconcentration avant l'analyse chromatographique. Parmi les approches possibles, des supports d'extraction mettant en jeu un mécanisme de reconnaissance moléculaire peuvent être développés. L'objectif est alors d'extraire sélectivement une molécule ou une famille structurale de molécules en l'isolant des autres constituants de l'échantillon de manière à rendre leur analyse quantitative plus fiable et plus sensible. Ainsi, il est possible d'utiliser des supports d'immunoaffinité (immunoabsorbants) fondés sur l'utilisation d'anticorps spécifiques des molécules d'intérêt. La grande sélectivité et la grande affinité de l'interaction antigène-anticorps permet alors l'obtention d'un extrait propre et de facteurs d'enrichissement élevés. Ce même mécanisme de rétention peut également être exploité par l'utilisation de polymères à empreintes moléculaires dont la voie de synthèse permet l'obtention de cavités mimant un site de reconnaissance antigène-anticorps. Enfin, des supports greffés par des aptamères ont très récemment montré leur grand potentiel pour de l'extraction sélective. Par comparaison de ces différentes approches, les principes, les avantages et les limites de ces outils d'extraction sélective seront exposés.

Mots clés : SPE, extraction sélective, IS, MIP, aptamères

Abstract – The determination of compounds at a very low level of concentration is still a real analytical challenge in the various application fields. The evolution of the instrumentation in terms of separation and detection has allowed a real improvement in the sensitivity and the analysis time. However, the very low level of concentration and the high degree of complexity of the real matrices still required a step of purification and preconcentration before the chromatographic analysis. Therefore, extraction sorbents based on a molecular recognition mechanism were developed. The use of these supports is dedicated to the selective extraction of a target molecule and its structural analogs to render the quantitative analysis more reliable and sensitive. A possible approach is the use of immunoaffinity supports (immunosorbent) based on the use of specific antibodies of the molecule of interest. The high selectivity and affinity of the antigen-antibody interactions allow a selective clean-up with high enrichment factors. This same mechanism can also be exploited by the use of molecularly imprinted polymers whose synthesis leads to the formation of specific cavities miming the recognition site of an antibody. A third selective sorbent was very recently developed and successfully applied. It consists of the use of aptamers. By comparison of these various approaches, the principles, the advantages and the limitations of these selective extraction tools are presented.

Key words: SPE, selective extraction, IS, MIP, aptamers

Reçu le 10 mars 2010, accepté après modifications le 15 avril 2010
Publication en ligne le 4 août 2010

^{*} Correspondance : Florence Chapuis-Hugon, Tél. 01 40 79 46 73, Fax. 01 40 79 47 76, florence.hugon@espci.fr

1 Introduction

L'analyse quantitative de composés recherchés à de faibles teneurs ($\text{ng}\cdot\text{L}^{-1}$) est encore à l'heure actuelle un véritable challenge analytique et ce, quel que soit le domaine d'application (clinique, agroalimentaire, environnemental...). L'évolution de l'instrumentation permet maintenant de réaliser des séparations chromatographiques rapides et efficaces couplées à une détection par spectrométrie de masse performante permettant une analyse spécifique et sensible. Néanmoins, la complexité des échantillons à traiter tels que les fluides biologiques (sang, plasma, urine...) conduit très souvent à des phénomènes de suppressions d'ions lors de la détection diminuant considérablement la sensibilité du dosage [1]. Outre l'utilisation d'étalons internes, qui est souvent coûteuse dans le cas d'étalons deutérés, l'amélioration des performances en termes de purification de l'étape de traitement de l'échantillon peut permettre de réduire grandement ces phénomènes. Une des méthodes de choix est l'extraction sur phase solide. Elle consiste à faire percoler l'échantillon sur un adsorbant généralement hydrophobe (silice greffée C_{18} , polymères...), ce qui s'apparente à un simple processus chromatographique [2]. Cependant, la rétention des composés sur les phases commercialement disponibles repose uniquement sur leur polarité, ce qui peut induire la co-extraction de nombreux interférents. À cet effet, des supports d'extraction sélective mettant en jeu un mécanisme de reconnaissance moléculaire ont été développés. L'objectif est alors d'extraire sélectivement une molécule cible et éventuellement ses analogues structuraux (métabolites) en les isolant des autres constituants de l'échantillon de manière à rendre l'analyse quantitative plus fiable. Le principe d'extraction reste analogue à une extraction sur support conventionnel. Il comporte quatre étapes (conditionnement, percolation, lavage et élution) et est décrit en figure 1. Par la spécificité apportée par le support, les composés ciblés sont retenus lors des étapes de percolation et de lavage tandis que les interférents sont élués. L'étape d'élution est assurée par la rupture des interactions développées entre les composés cibles et le support sélectif.

2 Immunoabsorbants

Il est possible d'utiliser des supports d'immunoaffinité (ou immunoabsorbants) fondés sur l'utilisation d'anticorps spécifiques des molécules d'intérêt. La forte affinité anticorps-antigène est alors exploitée pour l'obtention d'un extrait purifié et de facteurs d'enrichissement élevés. Même si la production d'anticorps spécifiques de petites molécules reste longue, elle conduit cependant à un support de fort potentiel pour l'extraction d'un composé ciblé ainsi que ses analogues structuraux tels que des métabolites dans un échantillon complexe. Ces approches ont déjà été développées avec succès pour de nombreuses classes de composés [3] (pesticides, HAPs et leurs métabolites urinaires, toxines alimentaires ou algales...). Certains de ces supports sont d'ailleurs disponibles commercialement. Les immunoabsorbants peuvent également être utilisés pour l'analyse d'une protéine ciblée. L'étude de protéines ciblées comme des biomarqueurs dans des échantillons biologiques est de nos jours un réel défi pour le diagnostic médical. D'un point de vue analytique, la chromatographie en phase

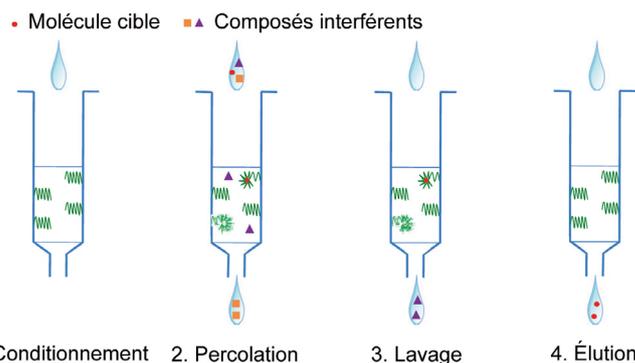


Fig. 1. Principe d'extraction sur phase sélective.

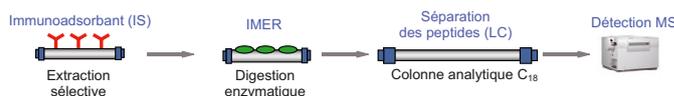


Fig. 2. Principe du dispositif expérimental pour l'analyse en ligne d'une protéine ciblée par immunoaffinité et digestion enzymatique.

liquide couplée à la spectrométrie de masse a supplanté l'électrophorèse en gel bidimensionnel. Cependant, l'étape de digestion des protéines en peptides, nécessaire avant leur analyse, est la plus souvent réalisée en solution, impliquant alors un manque d'automatisation de la méthode et des temps d'analyse relativement longs. En vue d'une automatisation du processus analytique et afin de réduire le temps de digestion, l'étape de digestion couplée en ligne à l'analyse a été mise au point par immobilisation d'une protéase (pepsine) sur un support solide de sépharose activée pour former un réacteur enzymatique. Sa caractérisation et son optimisation a été réalisée à partir d'une protéine modèle, le cytochrome c. Le réacteur ainsi obtenu a ensuite été conditionné en pré-colonne et a pu être incorporé au système analytique [4]. Compte tenu de la complexité des échantillons biologiques tels que le plasma, une méthode d'extraction sélective a été également développée par immobilisation d'anticorps anti-protéine ciblée sur un support solide (immunoabsorbant). Après la mise au point du protocole d'extraction, l'immunoabsorbant a pu être totalement intégré au système analytique en le couplant en ligne avec le micro-réacteur de digestion enzymatique [5]. Ce type d'analyse est présenté à la figure 2. De très bon résultats en termes de rendement ($>90\%$) et de répétabilité ($<10\%$) ont pu être obtenus et ont été clairement confirmés par l'analyse totale en ligne de la protéine cible à un échantillon complexe, le plasma. Ainsi grâce à l'utilisation de deux outils bioanalytiques couplés, un micro-réacteur de digestion et un immunoabsorbant, la durée de l'étape de digestion a été considérablement réduite (d'une dizaine d'heures à 20 min) et la protéine modèle a pu être extraite en ligne de façon sélective avec une limite de quantification de 85 pmol dans le plasma.

3 MIPs

Une autre approche consiste à synthétiser des polymères à empreintes moléculaires (MIP) obtenus par introduction d'une

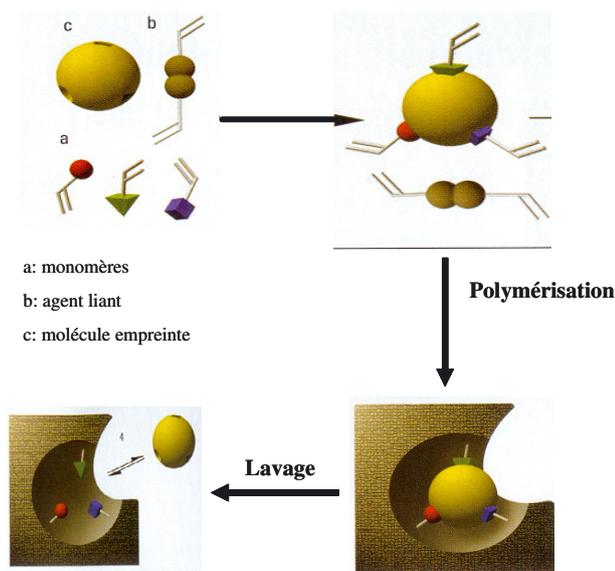


Fig. 3. Principe de synthèse d'un MIP.

molécule modèle (empreinte ou *template*) dans un solvant en présence de monomères choisis pour leur grande affinité avec la molécule empreinte, d'un agent réticulant et d'un initiateur de polymérisation. Par initiation thermique ou photochimique, les monomères polymérisent autour de la molécule empreinte induisant la création de cavités spécifiques à l'image complémentaire de cette molécule empreinte. Une fois la polymérisation achevée, la molécule empreinte est éliminée de la matrice polymérique ce qui conduit à la formation d'un polymère macroporeux renfermant des cavités spécifiques de la molécule modèle (figure 3). Concernant le choix de la molécule empreinte, il est préférable de prendre un analogue structural afin d'éviter un éventuel relargage lors des extractions ce qui entraînerait des faux positifs. Ces supports ont d'ores et déjà été développés pour de nombreuses molécules de propriétés physico-chimiques différentes [6, 7]. La comparaison d'un support imprimé contre les triazines par rapport à un immunoadsorbant a même révélé une capacité 30 fois supérieure en faveur du MIP [8]. Des MIP sont également disponibles commercialement ou peuvent être synthétisés à façon (Supelco, PolyIntell). Si pour les anticorps, les interactions dépendent de la molécule cible et des acides aminés impliqués dans le site de reconnaissance, dans le cas des MIP, la nature des interactions est définie par la nature des monomères et du solvant de polymérisation utilisé pour la synthèse ce qui implique le développement d'un protocole adapté afin de favoriser le développement d'interactions spécifiques. Pour illustration, un MIP spécifique du LSD a été récemment développé et appliqué avec succès à des matrices biologiques. Une procédure fondée sur le développement de liaisons hydrogène a permis d'extraire le LSD des cheveux à des concentrations de 0.1 ng.mg⁻¹ avec 82 % de rendement d'extraction. Après une modification de la procédure, le MIP a également été appliqué au milieu urinaire pour permettre l'extraction du LSD avec un rendement de 83 %. Grâce à l'utilisation du MIP, la limite de quantification du LSD dans l'urine a pu être abaissée à 0.2 pg.mL⁻¹. Enfin, comme l'illustre la figure 4, la comparaison avec un

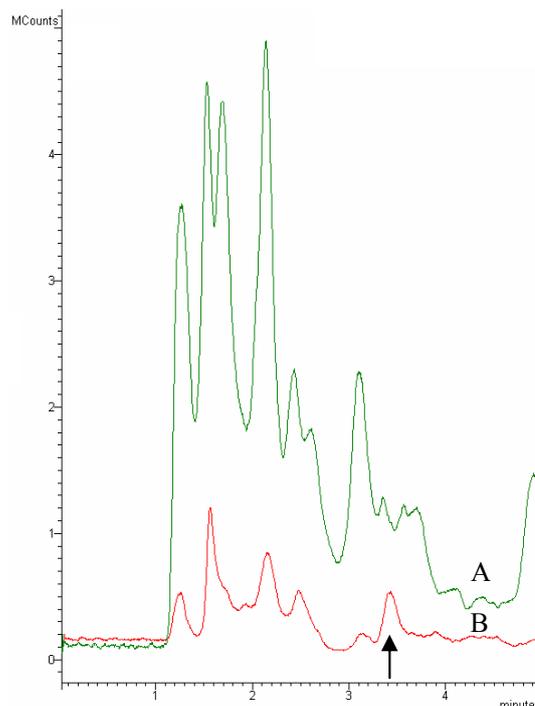


Fig. 4. Chromatogrammes obtenus après l'extraction sur phase solide d'un échantillon d'urine contenant 0.5 ng.mL⁻¹ de LSD sur un support C18 (A) et sur MIP (B). Analyse LC/MS (m/z :324).

support conventionnel d'extraction (C₁₈) n'a fait que confirmer le haut degré de sélectivité apporté par le polymère imprimé. Cette étude a permis de montrer le grand potentiel des MIPs pour l'extraction sélective de composés comme le LSD, actif à de très faible concentration et pour son application dans le domaine de l'analyse toxicologique médico-légale. La grande sélectivité apportée par le MIP a permis une nette amélioration de l'étape de purification des échantillons biologiques notamment pour l'urine améliorant de façon significative la sensibilité de la méthode.

4 Aptamères

Bien que le potentiel des MIP n'est plus à démontrer, la synthèse de MIP dirigée contre certaines molécules telles que des toxines n'est pas envisageable pour des questions de coûts. À cet effet, un autre support alternatif à base d'aptamères immobilisés a été récemment développé. Les aptamères sont des oligonucléotides (de 15 et 60 bases) qui possèdent une forte affinité et spécificité envers un ligand (petites molécules organiques, peptides, acides nucléiques, protéines, cellules intactes). Ils sont sélectionnés à partir d'une banque aléatoire contenant jusqu'à 10¹⁵ séquences différentes par une méthode combinatoire de sélection *in vitro* appelée *Systematic Evolution of Ligands by EXponential enrichment (SELEX)* selon leur aptitude à reconnaître une cible et offrent donc une sérieuse alternative à l'utilisation des anticorps. Les aptamères font déjà l'objet de nombreuses applications analytiques : bioessais, capteurs, phases stationnaires pour les séparations

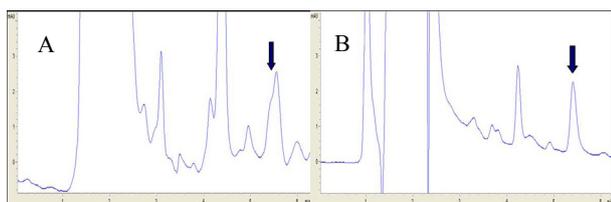


Fig. 5. Chromatogrammes obtenus après l'extraction sur phase solide d'un échantillon de plasma contenant $0.4 \text{ ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ de cocaïne sur un support C18 (A) et sur aptamère (B). Analyse LC/UV.

chromatographiques et électrocinétiques [9]. Des résultats très prometteurs ont été obtenus lors de leur utilisation à des fins d'extraction pour l'extraction sélective d'une molécule modèle, la cocaïne, du plasma humain avec un rendement d'extraction de 90 % [10]. La figure 5 illustre l'apport en sélectivité de l'aptamère pour l'analyse de la cocaïne dans le plasma par comparaison avec une extraction sur un support conventionnel (C18). Grâce à l'étape d'oligoextraction, la co-élution d'interférents est très nettement limitée, ce qui facilite l'identification du composé et sa quantification.

L'oligoextraction semble être une très bonne alternative à l'immunoextraction et présenterait même quelques avantages comme leur taille réduite comparée à celle des anticorps permettant une meilleure densité de greffage, et donc des supports de plus grande capacité, une synthèse facilitée, des durées de renaturation de quelques minutes contre 24 ou 48 heures pour les anticorps.

5 Technologies en développement

Un des nouveaux challenges à l'heure actuelle est de tendre vers une miniaturisation de l'ensemble du système analytique intégrant toutes les étapes de l'analyse. Cette évolution se justifie par les très faibles volumes d'échantillons disponibles (cellules, tissus...), le coût de certains réactifs (fragments d'ADN, anticorps, enzymes...) mais également par la nécessité croissante de réduire les temps d'analyse pour permettre de répondre rapidement à une urgence médicale ou pour traiter un grand nombre d'échantillons. Ainsi, le développement de microsystèmes analytiques intégrés (μ -TAS : *Micro Total Analytical Systems*) est en plein essor. Un système séparatif sur puce (LC-Chip Agilent) intégrant à la fois un canal de séparation rempli d'une phase chromatographique et une interface pour une détection par spectrométrie de masse est d'ailleurs disponible. Des résultats très prometteurs en termes de sensibilité ont déjà été reportés [11, 12]. Cependant, la complexité des échantillons traités ainsi que les très faibles volumes injectés dans le système rendent inévitables l'intégration d'une étape de prétraitement de l'échantillon dans le microsystème afin d'extraire et de préconcentrer le plus sélectivement possible les analytes cibles. À ce titre, les polymères à empreintes moléculaires peuvent être désormais générés *in situ* sous forme de monolithes dans des capillaires de $100 \mu\text{m}$ de diamètre interne et connectés en ligne avec des systèmes de nanochromatographie ou à terme dans des microcanaux de microsystèmes analytiques [13]. Une approche similaire peut alors être envisagée

pour des biomolécules comme les aptamères, les anticorps ou encore les enzymes en greffant ceux-ci sur un monolithe généré *in situ* [14].

6 Conclusion

Depuis de nombreuses années, le potentiel des immunoadsorbants n'est plus à démontrer pour leur utilisation en extraction sur phase solide pour divers échantillons biologiques. En effet, de nombreuses cartouches d'immunoextraction sont disponibles commercialement. En revanche, ces supports restent, certaines fois, longs à développer. Les MIPs, par leur simplicité de fabrication et leur faible coût de synthèse en font un support de plus en plus attrayant et complémentaire des immunoadsorbants. Pour preuve, des sociétés (Supelco, Poly-Intell...) proposent des cartouches de MIPs pour l'extraction de certaines molécules et également des développements à façon. Néanmoins, l'utilisation d'un tel support peut être limitée par la quantité disponible de molécule empreinte nécessaire à la synthèse. Enfin, l'exploitation des aptamères comme outils d'extraction semble extrêmement prometteuse compte tenu de la grande sélectivité apportée lors de l'extraction, ce dernier procédé restant complémentaire des deux autres supports.

Conflit d'intérêt. Les auteurs déclarent ne pas avoir de conflit d'intérêt.

Références

1. Agüera A, López S, Fernández-Alba AR, Contreras M, Crespo J, Piedra L. One-year routine application of a new method based on liquid chromatography-tandem mass spectrometry to the analysis of 16 multiclass pesticides in vegetable samples. *J Chromatogr A*. 2004; 1045(1-2): 125-135.
2. Pichon V. Extraction sur phase solide pour l'analyse de composés organiques. *Techniques de l'ingénieur* 2006; P1420.
3. Hennion M-C, Pichon V. Immuno-based sample preparation for trace analysis. *J Chromatogr A*. 2003; 1000(1-2): 29-52.
4. Cingöz A, Hugon-Chapuis F, Pichon V. Evaluation of various immobilized enzymatic microreactors coupled on-line with liquid chromatography and mass spectrometry detection for quantitative analysis of cytochrome c. *J Chromatogr A* 2008; 1209(1-2): 95-103.
5. Cingöz A, Hugon-Chapuis F, Pichon V. Total on-line analysis of a target protein from plasma by immunoextraction, digestion and liquid chromatography-mass spectrometry. *J Chromatogr B*. 2010; 878: 213-221.
6. Pichon V, Chapuis-Hugon F. Role of molecularly imprinted polymers for selective determination of environmental pollutants – A review. *Anal Chim Acta*. 2008; 622(1-2): 48-61.
7. Hugon-Chapuis F, Pichon V. Molecularly Imprinted Polymer for selective extraction of analytes from biological samples. *Ann Toxicol Anal*. 2007; 19: 239-251
8. Chapuis F, Pichon V, Lanza F, Sellergren B, Hennion M-C. Retention mechanism of analytes in the solid-phase extraction process using molecularly imprinted polymers: application to the extraction of triazines from complex matrices. *J Chromatogr B*. 2004; 804(1): 93-101.

9. Ravelet C, Grosset C, Peyrin E. Liquid chromatography, electrochromatography and capillary electrophoresis applications of DNA and RNA aptamers, *J Chromatogr A*. 2006; 1117(1): 1-10.
10. Madru B, Chapuis-Hugon F, Peyrin E, Pichon V. Determination of Cocaine in Human Plasma by Selective Solid-Phase Extraction Using an Aptamer-Based Sorbent. *Anal Chem*. 2009; 81(16): 7081-7086.
11. Yin H, Killeen K, Brennen R, Sobek D, Werlich M, van de Goor T. Microfluidic Chip for Peptide Analysis with an Integrated HPLC Column, Sample Enrichment Column, and Nanoelectrospray Tip. *Anal Chem*. 2004; 77(2): 527-533.
12. Ninonuevo MR, Perkins PD, Francis J, Lamotte LM, LoCascio RG, Freeman SL, Mills DA, German JB, Grimm R, Lebrilla CB. Daily Variations in Oligosaccharides of Human Milk Determined by Microfluidic Chips and Mass Spectrometry. *J Agric Food Chem*. 2007; 56(2): 618-626.
13. Bel Hadj-Kaabi F. Développement et caractérisation de polymères à empreintes moléculaires pour l'extraction de composés pharmaceutiques à l'état de traces dans les fluides biologiques. Miniaturisation du format de synthèse et couplage en ligne à la nano-chromatographie. Thèse de l'université de Paris VI, 2008.
14. Cingöz A. Analyse d'une protéine ciblée par immunoaffinité et digestion sur micro-réacteur enzymatique couplés en ligne à une analyse par chromatographie liquide et spectrométrie de masse: synthèse, caractérisation et miniaturisation des outils bioanalytiques. Thèse de doctorat de l'Université Paris VI, 2009.