

THESE
pour le
DIPLÔME D'ETAT
DE DOCTEUR EN PHARMACIE
par
Cécile BAUDIMENT

Présentée et soutenue publiquement le 23 février 2004

PROCEDURES TECHNIQUE, ADMINISTRATIVE ET
COMMERCIALE EN VUE DE L'ACQUISITION D'UN
EQUIPEMENT ANALYTIQUE.
APPLICATION : INTEGRATION D'UN SPECTROMETRE DE
MASSE AU LABORATOIRE DE
PHARMACOLOGIE/TOXICOLOGIE DU CHU DE NANTES.

Président : Monsieur Alain PINEAU, Professeur de Toxicologie, Doyen
de la Faculté de pharmacie de Nantes

Assesseurs : Monsieur Patrick LUSTENBERGER, Professeur de
Biochimie, Faculté de médecine de Nantes

Monsieur Alain TRUCHAUD, Professeur de Technologie
biomédicale, Faculté de pharmacie de Nantes

Monsieur Bernard BENSADOUN, Ingénieur des laboratoires,
responsable des achats du pôle de biologie, CHU de Nantes

REMERCIEMENTS

Je remercie Monsieur le Professeur LUSTENBERGER d'avoir accepté de diriger cette thèse et de l'aide apportée pendant sa rédaction.

Je remercie Monsieur le Professeur PINEAU, Doyen de la Faculté de pharmacie d'avoir présidé cette thèse.

Je remercie Monsieur le Professeur TRUCHAUD qui est à l'origine du sujet de cette thèse et qui m'a permis de m'intéresser, durant ces deux années d'option industrielle, à des concepts innovants variés.

Je remercie Monsieur BENSADOUN pour son aide et son implication dans ce projet.

Je remercie les ingénieurs commerciaux des groupes Applera, Thermo-Finnigan et Waters pour leur coopération.

Je dédie ce travail à toute ma famille dont le soutien est sans faille, à mon fils Alix pour sa patience et à son papa, le Docteur Michel MURY, mon mentor avisé.

TABLE DES MATIERES

INTRODUCTION	page 1
---------------------------	--------

Chapitre 1 GENESE DU PROJET D'ACQUISITION

I. INTRODUCTION	page 4
1. La problématique de départ	page 4
2. Les acteurs.	page 4
3. Assurance de qualité... ..	page 4
II. ANALYSE DES BESOINS	page 5
1. Introduction	page 5
2. Les besoins des cliniciens.....	page 6
3. Les besoins des laboratoires.....	page 8
4. Les besoins financiers et administratifs.....	page 11
5. Conclusions.....	page 12

Chapitre 2 MATERIEL ET TECHNIQUES ANALYTIQUES

I. APPAREILLAGE EN SPECTROMETRE DE MASSE	page 14
1. Introduction	page 14
2. Schéma de principe d'un spectromètre de masse	page 14
3. Les sources d'ions	page 15
4. Les analyseurs	page 17
5. Les détecteurs.....	page 21
6. L'environnement.....	page 23
II. LE COUPLAGE CHROMATOGRAPHIE LIQUIDE HAUTE PERFORMANCE (HPLC) ET SPECTROMETRIE DE MASSE (MS) ou LC/MS	page 24
III. COUPLAGE CHROMATOGRAPHIE LIQUIDE HAUTE PERFORMANCE ET SPECTROMETRIE DE MASSE EN TANDEM OU LC/MS/MS	page 25
IV. L'ANALYSE MOLECULAIRE EN BIOLOGIE PAR COUPLAGE CHROMATOGRAPHIE LIQUIDE HAUTE PERFORMANCE ET SPECTROMETRIE DE MASSE	page 26
1. Introduction	page 26
2. Mode de fonctionnement des spectromètres de masse utilisés en analyse biologique	page 27
3. Pratique de l'analyse biologique par spectrométrie de masse	page 30

Chapitre 3 ETUDE DE MARCHE ET EVALUATION DES ENJEUX FINANCIERS

I. INTRODUCTION	page 39
II. LES PRINCIPAUX FOURNISSEURS	page 39

1. Le groupe APPLERA	page 39
2. Le groupe WATERS	page 39
3. Le groupe THERMO FINNIGAN	page 40
III. LES APPAREILS PROPOSES	page 41
1. Introduction	page 41
2. Le groupe APPLERA	page 41
3. Le groupe WATERS	page 45
4. Le groupe THERMO FINNIGAN	page 47
IV. RENCONTRES UTILISATEURS	page 48
V. EVALUATION DES ENJEUX FINANCIERS DU PROJET LC/MS/MS... ..	page 50
1. Premiers devis « prix marché » du projet LC/MS/MS.....	page 50
2. Etude comparative des coûts entre l'analyse biologique courante du tacrolimus, sirolimus, profil d'acides aminés et ciclosporine et leur analyse par LC/MS/MS	page 51
VI. CONCLUSIONS.	page 55

Chapitre 4 ESSAIS TECHNIQUES

I. INTRODUCTION	page 57
II. DOSAGES ACTUELS DES PARAMETRES RETENUS	page 57
1. Le sirolimus	page 57
2. Le tacrolimus	page 57
3. Les benzodiazépines	page 57
4. Les acides aminés	page 57
5. Limites des techniques actuelles et solutions alternatives apportées par la LC/MS/MS.....	page 58
III. LES QUALITES DES METHODES ET DES APPAREILS	page 59
1. La fiabilité	page 60
2. Les performances	page 62
3. La praticabilité	page 62
IV. LES ESSAIS TECHNIQUES.....	page 63

Chapitre 5 PROCEDURE D'APPEL D'OFFRES

I. REGLEMENTATION DES MARCHES PUBLICS DU POINT DE VUE DES ETABLISSEMENTS DE SANTE.....	page 72
1. Introduction	page 72
2. Le nouveau Code des Marchés Publics.....	page 72
3. Le marché public et l'hôpital.....	page 73
4. Les procédures	page 73

II. APPLICATION DE LA REGLEMENTATION DES MARCHES PUBLICS DES ETABLISSEMENTS DE SANTE AU PROJET LC/MS/MS DU CHU DE NANTES

..... page **75**
1. Introduction page **75**
2. Déroulement de la procédure d'appel d'offres..... page **76**
3. Conclusion page **78**

CONCLUSION page **81**

Bibliographie
Annexes

INTRODUCTION

Introduction

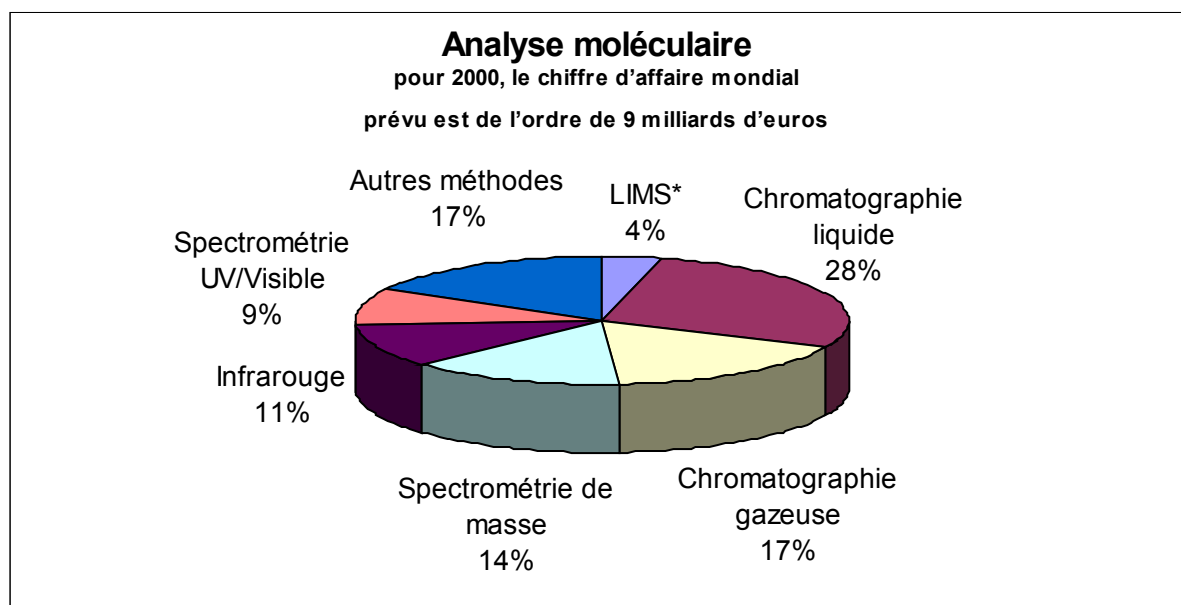
L'analyse chimique fait preuve de beaucoup d'innovations.

L'évolution des technologies a permis la réalisation d'instruments très performants, apportant des possibilités nouvelles, notamment par l'introduction des méthodes couplées et des méthodes non destructives.

Progressivement, un formidable arsenal de procédés s'est constitué, grâce auquel l'analyste est à même de répondre à des demandes de plus en plus nombreuses et variées.

Une façon de définir l'importance d'une technique est de se reporter aux statistiques économiques concernant les ventes des instruments correspondants.

La diffusion d'une technique se répercute sur la probabilité, pour l'analyste, de la rencontrer dans sa vie professionnelle.



LIMS*: Laboratory Information Management System soit systèmes informatisés de gestion des données.

Ainsi, la statistique ci-dessus fait apparaître que la chromatographie, à elle seule, représente plus de la moitié du chiffre d'affaire de l'instrumentation d'analyse moléculaire.

La spectrométrie de masse détient 14% du chiffre d'affaire mondial en 2000 et se révèle comme le secteur le plus dynamique de l'industrie analytique.

Dans le domaine de l'analyse biologique, après une large période d'exploitation du couplage de la spectrométrie de masse à la chromatographie gazeuse, un grand nombre de publications depuis 1990, s'intéresse aux performances de la spectrométrie de masse couplée à une chaîne de Chromatographie Liquide Haute Performance, HPLC/MS (ou LC/MS) comme technique alternative et, de plus en plus, de référence pour le dosage de multiples molécules.

C'est dans ce contexte que de nombreux hôpitaux français envisagent de s'équiper d'une LC/MS, à l'instar de nos voisins européens belges, anglais ou encore allemands qui l'utilisent déjà largement en routine.

Introduction

Le CHU de Nantes mène une réflexion sur un projet d'acquisition d'un appareil LC/MS.

Nous nous proposons dans ce travail de suivre les différentes étapes, administratives, commerciales et techniques inhérentes à ce projet d'acquisition. Ainsi, nous détaillerons la genèse même du projet. Nous parlerons ensuite de l'équipement et des techniques analytiques. Nous traiterons de l'étape incontournable de l'étude de marché. Nous décrirons les essais techniques, de l'énoncé de leur nature à leurs résultats. Enfin, nous suivrons pas à pas la procédure d'appel d'offres.

CHAPITRE 1

GENESE DU PROJET D'ACQUISITION

I. INTRODUCTION

1. La problématique de départ

La demande initiale émane du laboratoire de pharmacologie/toxicologie au cours de l'année 2002 pour répondre à la problématique de base qui est le dosage du sirolimus. En effet, le CHU de Nantes est le premier centre européen de greffes rénales. Le dosage des immunosuppresseurs, cyclosporine, tacrolimus et sirolimus dans le cadre du suivi thérapeutique des patients, représente une activité quotidienne pour les laboratoires concernés du plateau technique. Or, si la cyclosporine est dosée de manière satisfaisante en RadioImmunoAnalyse (RIA) par le laboratoire de radio-immunologie, les résultats de la technique d'EnzymoImmunoAnalyse (EIA) utilisée pour doser le tacrolimus par le laboratoire de pharmacologie/toxicologie ne sont pas pleinement satisfaisants et aucune des deux techniques n'est, à ce jour, applicable au sirolimus dont le dosage est externalisé. Comme nous l'avons mentionné en introduction, la spectrométrie de masse est actuellement le secteur le plus dynamique de l'industrie analytique. La faisabilité des analyses du tacrolimus, sirolimus, cyclosporine ainsi que de nombreuses autres molécules par un spectromètre de masse couplé à une chaîne de Chromatographie Liquide Haute Performance (LC/MS) fait l'objet de nombreuses publications. L'acquisition d'une LC/MS (et, plus précisément d'une LC/MS tandem) a donc été évoquée par le laboratoire de pharmacologie/toxicologie. Dès lors, l'élaboration du projet d'acquisition a commencé. Il s'agit pour les différents acteurs de procéder à une analyse détaillée des besoins et d'envisager tous les problèmes liés au projet.

2. Les acteurs

L'acquisition d'un matériel analytique sur le plateau technique du CHU de Nantes confronte des acteurs administratifs et techniques. Les discussions se déroulent entre la Direction du pôle de biologie (Directeur de pôle, ingénieur responsable des achats, cadre médico-technique) d'une part et les biologistes des laboratoires demandeurs d'autre part.

Le laboratoire de pharmacologie/toxicologie est le premier laboratoire concerné mais le laboratoire de biochimie générale a fait valoir son intérêt analytique à s'impliquer dans l'exploitation d'un tel appareil.

Par ailleurs, un changement de technique analytique ne peut se faire sans la consultation des prescripteurs, à l'origine même de la demande de dosages.

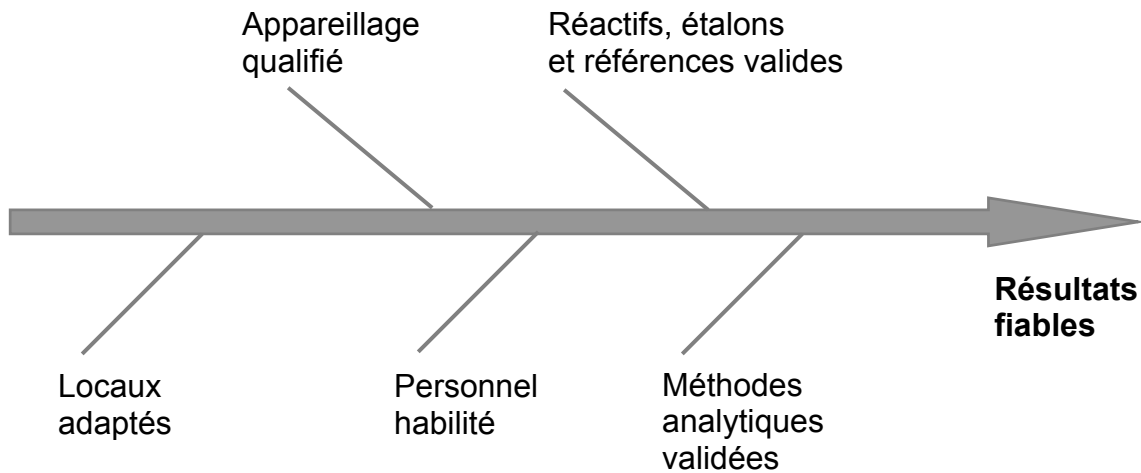
3. Assurance de qualité

Le Guide de Bonne Exécution des Analyses de biologie médicale (GBEA, Annexe de l'Arrêté du 26 novembre 1999) définit l'assurance de qualité dans le domaine de la biologie médicale comme un moyen de maîtriser l'organisation des tâches conduisant à la qualité aussi bien dans les étapes pré-analytiques, analytiques que post-analytiques.

Au-delà de l'objectif quotidien du laboratoire de produire des résultats fiables, l'application de l'assurance qualité touche toutes les autres activités du laboratoire.

La phase de choix d'un nouvel équipement doit être envisagée dans ce contexte. C'est la première garantie qualité d'avoir dans la chaîne conduisant aux résultats un appareil qualifié.

Diagramme causes/effets



La qualification de l'appareillage est une obligation réglementaire. Elle doit établir la preuve documentée que l'équipement :

- a été conçu dans le respect des Bonnes Pratiques de Fabrication → Qualification de Conception (QC),
- a été construit et installé en conformité avec les spécifications établies lors de la conception → Qualification d'Installation (QI),
- fonctionne selon les spécifications établies lors de la conception → Qualification Opérationnelle (QO),
- fonctionne selon les spécifications établies de manière reproductible et fiable → Qualification de Performances (QP).

La qualification est de la responsabilité de l'utilisateur (et non du fabricant). C'est pourquoi, le laboratoire qui projette d'acheter un équipement doit procéder à une qualification dite prospective qui se poursuivra durant les phases d'installation et de fonctionnement.

La première qualification est la qualification de conception. Elle consiste en une vérification de la conformité du matériel avec le cahier des charges à l'origine du projet.

Le cahier des charges doit donc être précis quant à la définition des besoins et des solutions techniques.

II. ANALYSE DES BESOINS

1. Introduction

Dans la pratique de l'analyse des biomolécules, il est fréquent qu'un composé puisse être dosé par des méthodes différentes. Il arrive aussi que pour une même méthode, les équipements analytiques présentent des technologies différentes.

En conséquence, le choix d'une méthode d'analyse et d'un appareil est loin d'être aisé.

Chapitre 1. Genèse du projet d'acquisition

Il exige la connaissance de beaucoup de paramètres, et une interrogation sur de nombreux points :

- quel est le type d'échantillon? Echantillon natif ou pré traité ?
- quel est le domaine biologique exploré : $\mu\text{g/mL}$, ng/mL .. ?
- quel est le degré de précision nécessaire ?
- quelle est la fiabilité des résultats de la méthode et des appareils envisagés ?
- quel est le degré d'urgence du résultat ?
- dispose-t-on du personnel compétent pour utiliser l'appareillage envisagé ?
- quelles sont les qualités de cette méthode et des appareils en termes de performances et de praticabilité ?

Dans le cas du dosage des immunosuppresseurs, la méthode retenue est l'analyse par spectrométrie de masse couplée à une chaîne HPLC. Des appareils de technologies différentes satisfont à cette méthode d'analyse. Pour les différents acteurs de ce projet d'acquisition, il s'agit donc de choisir l'appareil répondant le mieux aux interrogations ci-dessus.

La première étape essentielle du choix consiste en une analyse des besoins : besoins des cliniciens et des laboratoires que l'on ajoute et/ou confronte aux moyens (et/ou contraintes) financiers et administratifs. A ce moment, il convient également d'étudier la faisabilité pratique du projet.

Cette réflexion multipartite doit aboutir si elle est validée pour les aspects technique et financier, au lancement d'un appel d'offre dans le cas d'un investissement lourd.

2. Les besoins des cliniciens

Nous rendons uniquement compte, dans ce paragraphe, de notre entretien avec les cliniciens immunologistes, spécialistes de transplantation. En effet, le dosage des immunosuppresseurs représentera l'activité analytique la plus importante de l'appareil LC/MS tandem.

Cette entrevue menée sur la trame du questionnaire ci-dessous est retranscrite en gardant le même style.

Questionnaire aux immunologistes

⇒ A propos des **immunosuppresseurs dans leur ensemble** :tacrolimus, sirolimus, cyclosporine et acide mycophénolique

- ✓ Fréquence du contrôle thérapeutique pour un patient ? Y a-t-il des différences d'une molécule à une autre ? Si oui, pourquoi ?
- ✓ Quelle(s) satisfaction(s) concernant les dosages actuels ? (MEIA, LC/MS, RIA, HPLC/UV)
- ✓ Echos concernant leur dosage par LC/MS tandem ? (avantages/inconvénients)

⇒ A propos du **dosage du tacrolimus**

- ✓ Quelles exigences dans le rendu des résultats ? Pourquoi le choix

d'attente des résultats avant retour à domicile du patient alors que pour le sirolimus cela n'a pas lieu ?

⇒ A propos du **dosage LC/MS tandem du sirolimus**

- ✓ Un dosage in situ entraînerait-il un changement dans la prise en charge du contrôle thérapeutique du patient c'est-à-dire avec des exigences de délai de rendu de résultats identiques au tacrolimus ?
- ✓ Le dosage in situ peut-il être générateur d'une augmentation de la prescription ?
- ✓ Peut-on dire que la prescription de sirolimus tend à remplacer celle de la cyclosporine ou est-elle une alternative dans certains cas, celui des femmes par exemple ?
- ✓ Sur 2003, on constate une chute des dosages de cyclosporine en moyenne -67/mois par rapport à 2002. Quelle(s) explication(s) ?

Compte-rendu de l'entretien avec les immunologistes

⇒ Sur la **prescription des dosages** de tacrolimus, sirolimus, cyclosporine et acide mycophénolique

- ✓ 150 greffes par an
- ✓ durée de vie du greffon 10 à 15 ans
- ✓ en consultation de suivi post-greffe la file active est d'environ 1600 patients
- ✓ le schéma de contrôle thérapeutique est identique pour chaque immunosuppresseur à l'exception de l'acide mycophénolique qui n'est plus dosé à Nantes. En effet, il existe une grande variabilité inter-individu de la concentration plasmatique pour une même dose de médicament. De ce fait, les marges thérapeutiques ne sont pas définies. Pour les autres immunosuppresseurs:
 - pendant les quinze jours d'hospitalisation post-greffe, contrôle quotidien,
 - à la sortie, trois fois par semaine pendant quinze jours,
 - puis deux fois par semaine pendant quinze jours,
 - puis jusqu'à un an post-greffe et au-delà une fois par mois.
- ✓ le protocole thérapeutique appliqué depuis 5 ans utilise le tacrolimus en première intention. Il reste environ 1000 patients anciennement greffés sous cyclosporine, soit 62,5% de la file active. 100% des greffés sont traités par l'acide mycophénolique. La prescription de sirolimus ne remplace pas celle de cyclosporine. Le sirolimus est prescrit dans des indications précises en raison de sa faible néphrotoxicité et se substitue à la cyclosporine uniquement en cas de cancers cutanés récidivants et/ou de toxicité rénale. La prescription de sirolimus va vraisemblablement continuer d'augmenter et à terme, les cliniciens pensent que la répartition sera d'1/3 de cyclosporine, 1/3 de tacrolimus et 1/3 de sirolimus.

⇒ Sur les **techniques actuelles** de dosage

- ✓ les cliniciens sont satisfaits de la qualité des résultats rendus

Chapitre 1. Genèse du projet d'acquisition

- ✓ pour le tacrolimus, les patients viennent en consultation le matin à 7h où un prélèvement de sang est effectué pour un bilan biologique et un contrôle thérapeutique tacrolimus. A 11H, le clinicien reçoit les résultats du bilan biochimique. Si ce dernier est satisfaisant, les patients repartent. Vers 14H30, le clinicien reçoit les résultats de tacrolimus. Si un ajustement s'avère nécessaire, les patients sont prévenus par téléphone le même jour, dans le cas d'une greffe récente et par courrier dans les 24H ou 48 H, pour les greffes plus anciennes.
- ✓ pour le sirolimus, le rendu de résultats différé (le lendemain) fait que la plupart du temps, seuls les patients surdosés sont prévenus. Les greffés sous-dosés ne sont pas contactés ce qui est problématique en raison du risque de rejet de greffe.

⇒ Sur le **dosage LC/MS tandem** des immunosuppresseurs

- ✓ les cliniciens sont réservés pour le tacrolimus car ils sont satisfaits de la qualité des résultats actuels (ils craignent un changement des intervalles thérapeutiques avec la nouvelle technique).
- ✓ pour le sirolimus, son dosage par le laboratoire du CHU se révélerait être un énorme avantage car cela permettrait une exploitation immédiate du résultat
- ✓ les cliniciens souhaitent l'organisation d'un exposé scientifique par le biologiste référent comprenant une brève présentation technique de la LC/MS tandem, ses avantages par rapport aux limites des autres techniques ainsi que des informations pratiques sur l'interprétation des résultats.

3. Les besoins des laboratoires

Ce sont ceux des laboratoires de pharmacologie/toxicologie et de biochimie générale. Dans le cadre de cette consultation, ils seront exprimés dans le Cahier des Clauses Techniques Particulières, CCTP, **CF Annexe 1**.

☆ Le laboratoire de pharmacologie/toxicologie

Le laboratoire de pharmacologie/toxicologie justifie l'acquisition d'une LC/MS tandem pour les dosages du sirolimus, du tacrolimus, des benzodiazépines, notamment thermosensibles, et de leurs métabolites.

Les qualités analytiques de la technique, détaillées dans les chapitres suivants (2 et 4), permettent au laboratoire de pharmacologie/toxicologie d'envisager de nombreuses autres applications comme le screening et le dosage de toxiques tant en toxicologie clinique qu'en toxicologie médico-légale. De plus, les travaux de recherche dans le domaine des immunosuppresseurs laissent présager que dans un avenir proche, d'autres molécules potentiellement dosables par LC/MS, vont arriver sur le marché.

La technologie LC/MS tandem qui sera choisie devra tout d'abord répondre à des exigences fondamentales propres aux analyses elles-mêmes.

En effet, le système doit couvrir les domaines thérapeutiques explorés et pouvoir absorber la demande quantitative quotidienne des analyses. Ces impératifs sont exposés dans le tableau suivant.

Chapitre 1. Genèse du projet d'acquisition

Dosage	Domaine thérapeutique exploré	Nombre de dosages quotidiens
Tacrolimus	Suivi thérapeutique : 5 à 20 ng/mL	25
Sirolimus	Suivi thérapeutique : ⇒ 4 à 12 ng/mL au cours du traitement d'initiation ⇒ 12 à 20 ng/mL à l'arrêt de la cyclosporine pendant le traitement d'entretien.	2
Benzodiazépines (BZD)	† Suivi thérapeutique des BZD anticonvulsivantes et de leurs métabolites actifs : ⇒ clobazam 120-400 ng/mL et desmethyloclobazam 120-1000 ng/mL ⇒ clonazepam 29-75 ng/mL ⇒ diazepam 90-370 ng/mL, desmethyldiazepam 130-460 ng/mL et oxazepam 10-30 ng/mL	Variable † 19 tests sur l'année 2002
Drogues et intoxications	† Toxicologie clinique:variable † Toxicologie médico-légale :variable	† Intoxications et médico-légal confondus, en moyenne 3 tests/jour sur 2002

Par ailleurs, les résultats des dosages d'immunosuppresseurs pour être exploités au mieux par les cliniciens doivent être rendus en début d'après-midi.

Les rendus de résultats, sans être urgents, sont cependant attendus dans des délais assez brefs. Ce dernier point est conditionné par les performances de disponibilité des appareils.

D'autres exigences concernent la préparation des échantillons en fonction de leur nature. Le laboratoire souhaite un temps de pré-traitement des échantillons, sang et urines le plus court possible.

☆ Le laboratoire de biochimie générale

Le laboratoire de biochimie générale s'intéresse aux dosage des acides aminés par LC/MS tandem.

Les échantillons traités sont du sang et des urines, plus rarement le liquide céphalorachidien (LCR). Les domaines biologiques explorés sont de l'ordre des µmoles/L.

La demande de profils d'acides aminés est faible, en moyenne deux par semaine mais, comme le laboratoire de pharmacologie/toxicologie, le laboratoire de biochimie générale a d'autres perspectives résumées dans le tableau qui suit.

DOSAGE	CONTEXTE(S) DE PRESCRIPTION
<p>Screening des anomalies héréditaires du cycle de l'urée</p> <p>✦ déficits des enzymes du cycle de l'urée : carbamyl phosphate synthétase, ornithine transcarbamylase, arginino succinate-synthétase, arginosuccinate lyase, arginase, N acétyl glutamate synthétase.</p> <p>✦ déficits dans le transfert des métabolites du cycle de l'urée : lysinurie, triple H syndrome (hyper ammoniémie, homocitrullinurie, hyperornithinurie)</p>	<p>✦ Recherche étiologique de l'hyperammoniémie néonatale ⇒ URGENCE VITALE</p>
<p>Homocystéine</p> <p>✦ Acide aminé soufré qui est un intermédiaire dans le métabolisme de la méthionine et de la cystéine. Les déficiences homozygotes rares de l'enzyme cystathionine-beta synthase provoque l'homocystinurie ; dans ce cas, il y a une élévation jusqu'à dix fois des taux d'homocystéine plasmatique, une athérosclérose précoce, des thromboses récurrentes des artères coronaires, cérébrales et périphériques et des thromboses veineuses</p> <p>✦ L'hyperhomocystéinémie est corrélée à une augmentation linéaire du risque thrombo-embolique à cause de son métabolisme perturbé et l'absence de folates.</p>	<p>✦ Patients présentant une maladie coronarienne précoce et/ou un infarctus, et n'ayant pas de facteurs de risque classiques.</p> <p>✦ Sujets ayant des antécédents de thrombo-embolies veineuses et d'athérosclérose.</p>
<p>Carnitine</p> <p>Son rôle principal est de permettre le transfert dans la mitochondrie des acides gras à chaîne longue (>C14) après leur activation dans le cytosol.</p> <p>La carnitine peut être acylée et joue alors un double rôle :</p> <p>✦ un rôle de transporteur d'acyles (par exemple l'acétylcarnitine) d'un organe à l'autre</p> <p>✦ un rôle détoxificateur lorsqu'elle est acylée avec des acyl-CoAs provenant du</p>	<p>✦ recherche du déficit systémique congénital en carnitine dans le cadre d'une cardiomyopathie</p> <p>✦ recherche d'un déficit secondaire dû à une carence d'apport ou à une fuite excessive (dialyse rénale, tubulopathie, excrétion massive d'acylcarnitines)</p> <p>✦ suivi thérapeutique de patients avec des aciduries organiques (acidurie propionique, méthylmalonique, isovalérique, glutarique) recevant une supplémentation en L-carnitine.</p>

<p>métabolisme de xénobiotiques (valproyl-CoA, salicylyl-CoA, benzoyl-CoA) ou avec des acyl-CoAs s'accumulant dans certaines situations pathologiques.</p>	
<p>DOSAGE</p>	<p>CONTEXTE(S) DE PRESCRIPTION</p>
<p style="text-align: center;">Asparagine</p> <p>Acide aminé dépendant de l'acide aspartique. Est utilisé par le foie comme un donneur d'amine pour un type de transamination.</p> <p>L'énergie dégagée par la transformation de l'asparagine en acide aspartique est utilisée par les cellules du cerveau et du système nerveux central pour leur propre métabolisme.</p>	<p>✦ Suivi thérapeutique des enfants leucémiques traités par Asparaginase®</p>

☆ Conclusions

Les besoins des laboratoires réduits ici à l'essentiel sont consignés par écrit par les biologistes concernés. On y trouve une présentation des orientations analytiques et les spécifications générales et techniques de l'équipement souhaité. Enfin, les objectifs et les conditions des essais techniques (Chapitre 4) sont clairement exposés.

Tout ce travail est ensuite repris par le responsable des achats pour une mise en forme spécifique des différents éléments dans plusieurs documents constitutifs du dossier d'appel d'offres.

4. Les besoins financiers et administratifs

Connaître le coût de l'analyse permet d'apprécier la productivité d'un système analytique.

Le coût de l'analyse pour un résultat de patient inclut, l'amortissement de l'appareil, la maintenance, le coût des réactifs pour l'échantillon patient mais aussi pour les étalonnages et la calibration, la rémunération du personnel et les frais fixes de structure.

A ce stade du projet, le coût exact de l'analyse LC/MS tandem du sirolimus, du tacrolimus, ou des acides aminés ne peut être déterminé. Cependant, une évaluation de la rentabilité d'une telle acquisition est possible et indispensable. On comparera le coût approximatif de l'analyse LC/MS tandem avec le coût du dosage actuel de chaque application. Cette évaluation des coûts est présentée en détail au chapitre 3. Par ailleurs, même si la procédure d'appel d'offres n'est pas encore engagée, il faut commencer à planifier les calendriers administratif, financier dans lesquels les essais techniques s'intercaleront de manière pragmatique.

De même, il faut d'ores et déjà déterminer le lieu d'implantation de l'appareillage en fonction des contraintes éventuelles.

Enfin, il convient que la Direction du pôle envisage avec les laboratoires concernés la gestion des personnels affectés.

Chapitre 1. Genèse du projet d'acquisition

La nouveauté du matériel et sa mutualisation par les laboratoires de pharmacologie/toxicologie et de biochimie générale impliquent logiquement la désignation d'un ingénieur référent de l'équipement. Dans l'idéal, ce référent doit posséder au minimum une bonne connaissance de la chromatographie liquide haute performance et bénéficiera d'une formation par le fournisseur à la spectrométrie de masse dès l'acquisition.

La validation des résultats est assurée par un biologiste référent issu de chaque laboratoire.

Une suppléance à l'ingénieur et aux biologistes référents est souhaitable.

5. Conclusions

Au terme de l'analyse des besoins, un CCTP provisoire a été rédigé. Une première réunion de tous les acteurs du projet a été organisée par la Direction du pôle de biologie afin d'examiner le CCTP et des questions attenantes. Le but était de prendre le plus grand nombre de décisions de manière consensuelle.

C'est ainsi qu'ont été entérinés :

- ✓ le choix des paramètres prioritaires,
- ✓ les spécifications générales et techniques de l'équipement souhaité,
- ✓ les objectifs et les conditions des essais techniques,
- ✓ le lieu d'implantation,
- ✓ les qualifications du personnel responsable du système.

Si des décisions ont été prises, cette réunion a cependant mis en évidence quelques difficultés.

Bien que les laboratoires du plateau technique soient localisés sur un même niveau, directement en vis-à-vis, le cloisonnement institutionnel reste très prononcé. Les échanges sont difficiles et la mutualisation du matériel s'avère compliquée. En effet, si le principe de mutualisation entre les deux laboratoires est en théorie entendu, les discussions sur la mise en pratique progressent peu. L'établissement d'un planning de mutualisation, le choix du personnel référent, la possibilité de prêter l'appareil pour des applications ponctuelles à d'autres laboratoires...sont autant de sujets sans réponse.

De plus, la spectrométrie de masse est une technique de pointe, absente à ce jour du plateau technique, et de ce fait, les rares initiés ont tendance à vouloir en faire leur apanage.

Pourtant, le coût d'acquisition très élevé de ces appareils, entre 250 et 300 K€ HT (prix « catalogue »), devrait être à lui seul, un argument suffisant de la nécessité à tout faire pour optimiser au mieux un tel investissement.

Chapitre 1. Genèse du projet d'acquisition

CHAPITRE 2

MATERIEL ET METHODES D'ANALYSE

I. APPAREILLAGE EN SPECTROMETRIE DE MASSE

1. Introduction

Un spectromètre de masse pourrait être décrit, d'une façon un peu naïve, comme une machine à casser les molécules. L'intérêt de l'opération étant qu'une analyse adaptée des débris moléculaires permet l'acquisition d'informations sur la structure de la molécule intacte. Concrètement, une molécule étudiée en spectrométrie de masse subit tout d'abord, au niveau d'un organe de l'appareil dénommé source, une ionisation qui la « transforme » en ion moléculaire. Ce dernier engendre un ensemble d'ions primaires caractérisés par les rapports de leur masse sur leur charge (m/z). Ces ions sont par la suite séparés en fonction de ce rapport à l'intérieur d'un analyseur. Ensuite, un système de détection permet leur quantification et l'évaluation de leur masse. La mesure des rapports m/z fournit à l'expérimentateur la masse moléculaire des composés étudiés permettant d'élucider la structure de la molécule initiale étudiée.

Le rapport m/z représente le rapport de la masse, en dalton ou en UMA (Unité de Masse Atomique) c'est-à-dire $1,66 \cdot 10^{-27}$ kg, exprimé en nombre absolu de charge de l'électron, m/z s'exprime en thomson (Th). Parfois, m est exprimé en masse relative et z en nombre de charges, tous les deux sans dimension.

Ce schéma de fonctionnement très général des spectromètres de masse est quelque peu modifié dans les appareils de spectrométrie en tandem (MS/MS) qui nous intéressent dans ce projet. Les molécules subissent deux analyses de masses entrecoupées d'une étape d'activation dans une cellule de collision. En pratique, un ion précurseur est sélectionné en fonction de sa masse dans un premier analyseur, il est ensuite activé -cassé- dans la cellule de collision, puis ses produits de fragmentation sont évalués par un deuxième analyseur. Cette approche est très efficace pour l'étude structurale des molécules -elle permet d'établir des relations précises entre l'ion précurseur et ses produits de fragmentation- pouvant être présentes dans des mélanges complexes.

Toutefois cette efficacité n'a pu être « révélée » que grâce à l'évolution technologique d'un organe précis des spectromètres de masse : la source. En effet, il y a encore quelques années les techniques d'ionisation n'étaient pas adaptées au traitement des molécules biologiques. Ces dernières non volatiles et plus fragiles que les composés inorganiques ne supportaient pas la rudesse de l'étape d'ionisation pratiquée à l'origine. De fait, c'est l'émergence d'une nouvelle génération d'appareils, intégrant des méthodes d'ionisation, Electrospray (ESI), Ionisation Chimique à Pression Atmosphérique (APCI), Désorption-Ionisation laser Assistée par Matrice (Matrix Assisted Laser Desorption Ionisation, MALDI), suffisamment douces pour préserver les biomolécules analysées qui a ouvert les portes des laboratoires de biologie à la spectrométrie de masse.

Nous nous intéresserons dans ce chapitre au matériel permettant actuellement une analyse quantitative des biomolécules.

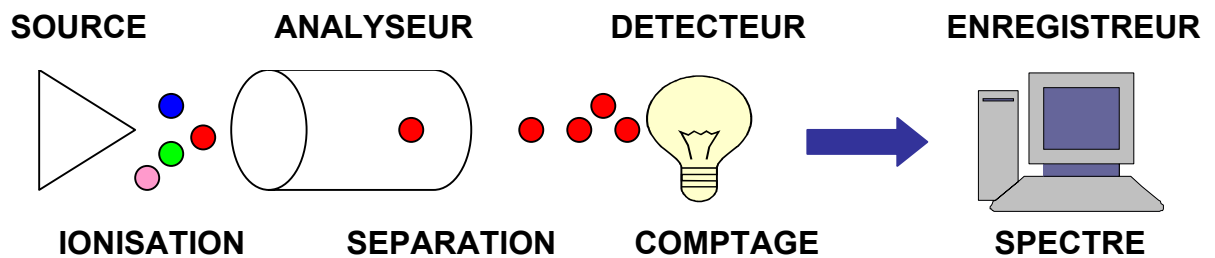
2. Schéma de principe du spectromètre de masse

Un spectromètre de masse est toujours constitué des parties suivantes :

★ **Une source d'ions** dans laquelle se produit le passage en phase gazeuse (vaporisation/ sublimation/ désorption) de l'échantillon à analyser, l'ionisation des molécules, et également la décomposition des ions,

Chapitre 2. Matériel et méthodes d'analyse

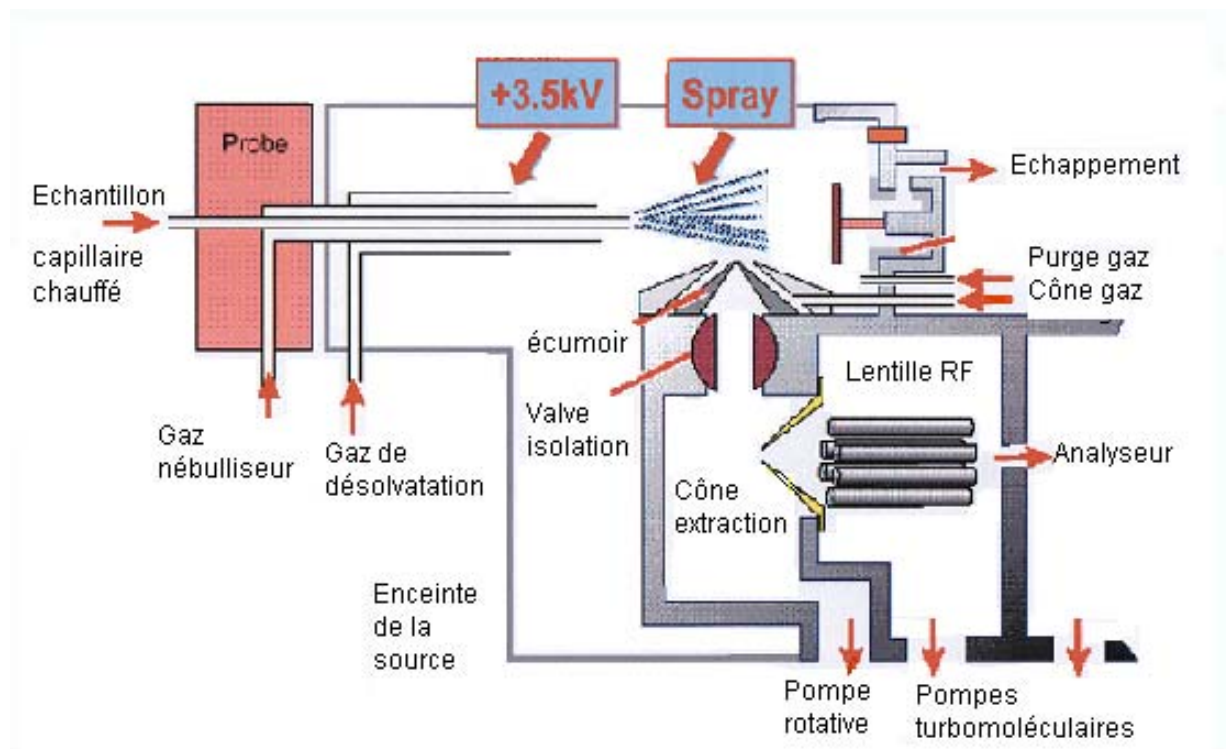
- ☆ **Un analyseur** qui permet de trier les ions en fonction de leur rapport m/z , (avec éventuellement en supplément une cellule de collision dans laquelle les ions se fragmentent suivie d'un deuxième analyseur qui trie ces fragments)
- ☆ **Un détecteur** qui compte les ions en leur associant leur rapport m/z ,
- ☆ **Un enregistreur** pour le traitement du signal et la visualisation des spectres,
- ☆ **Un système de calibration** qui permet l'étalonnage entre la grandeur réelle mesurée et le rapport m/z .



3. Les sources d'ions

Le domaine particulièrement complexe de l'analyse biologique requiert des dispositifs d'ionisation douce, ce qui signifie que les molécules sont ionisées sans fragmentation induite. Nous développerons ici l'électrospray ou ESI et l'ionisation Chimique à Pression Atmosphérique ou APCI.

① Electrospray ou ESI



Source ESI, « Z SPRAY » WATERS

Un aérosol est formé en sortie d'une aiguille métallique maintenue à un potentiel d'environ 3,5 à 5 kV. Dans ces conditions de haut champ, à pression atmosphérique, les gouttelettes de l'aérosol se chargent, les ions positifs (en mode de détection des ions positifs) migrent à la surface des gouttelettes tandis que les ions négatifs induisent une réaction d'oxydation à la surface de l'aiguille. Au fur et à mesure que le solvant s'évapore, aidé par un balayage d'azote, les forces de répulsion coulombiennes deviennent proches de la tension de surface assurant la cohésion des gouttelettes ; cette limite atteinte, les gouttelettes explosent en gouttelettes secondaires de plus petite taille. D'explosion en explosion les ions désolvatés sont finalement émis en phase gazeuse. Ces ions traversent alors le capillaire chauffé, sont focalisés par la lentille tubulaire vers le cône puis transmis vers l'analyseur de masse.

Dans le cas particulier où de multiples sites ionisables ou polaires sont présents sur la molécule étudiée, les ions générés peuvent alors porter plusieurs charges. Puisque les mesures de masse sont effectuées au travers d'un calcul de rapport m/z , plus la charge z augmente et plus la gamme de masse accessible sur un instrument donné est élevée. C'est ainsi que ce phénomène très spécifique d'ions multi-chargés a permis d'utiliser l'électrospray pour le calcul de masses de macromolécules jusqu'à 20 000 Daltons, avec une précision exceptionnelle (1 pour 10 000) et une très grande sensibilité (de l'ordre de la picomole).

Une modification de la technique, appelée « nanospray », qui utilise des flux beaucoup plus faibles a été développée pour pallier à la quantité souvent limitée d'échantillon à analyser. Des études systématiques ont montré que le signal obtenu en ESI dépend de la concentration et non de la vitesse du flux, jusqu'au domaine des nL/mn. Un groupe a introduit le terme de « picospray » amenant alors à des sensibilités dans le domaine des zeptomoles (10^{-21}).

② Ionisation Chimique à Pression Atmosphérique ou APCI

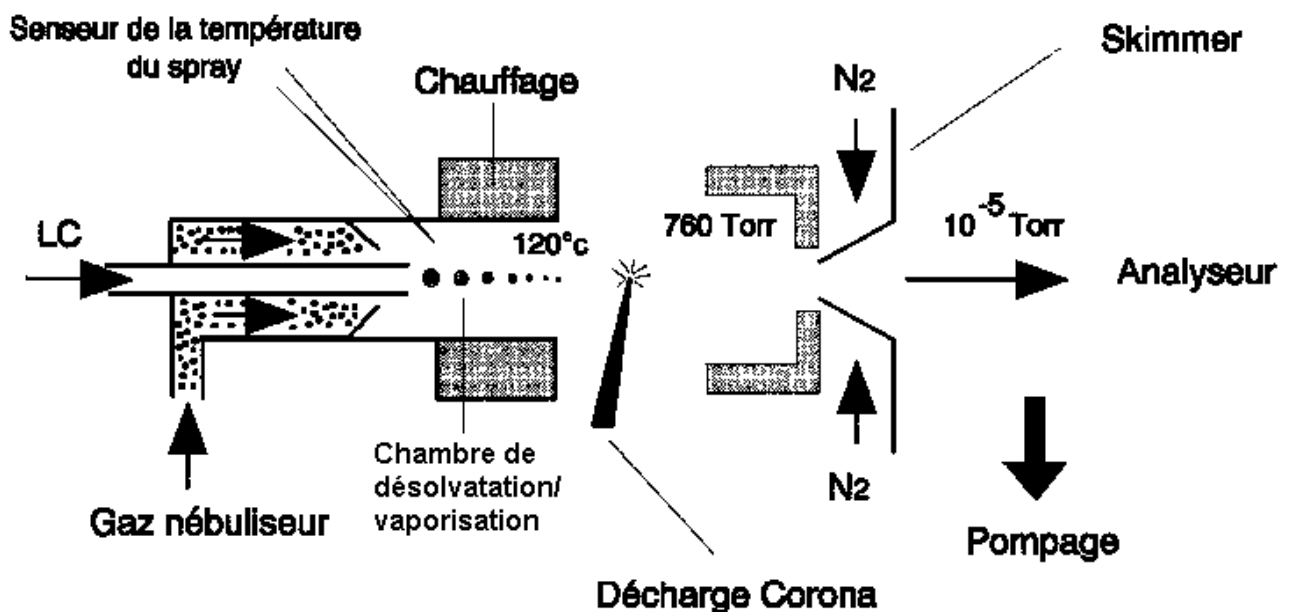


Schéma d'une source APCI

L'APCI est une technique d'ionisation qui fait appel à des réactions ion-molécule en phase gazeuse à pression atmosphérique.

L'échantillon est introduit dans un nébuliseur pneumatique où il est converti en fin brouillard à l'aide d'un jet d'air ou d'azote à haute vitesse. Les gouttelettes sont alors déplacées par le flux gazeux au travers d'un tube en quartz chauffé, appelé la chambre désolvatation/vaporisation. La chaleur transférée aux gouttelettes de l'aérosol va permettre la vaporisation du solvant et de l'échantillon dans le courant de gaz. Le contrôle de la température de cette chambre rend les conditions de vaporisation indépendantes du débit et de la nature de la phase mobile lors d'un couplage chromatographique. Le gaz chaud (120°C) et les substances sortent de ce tube pour arriver dans la région de réaction de la source se trouvant à pression atmosphérique où ils sont ionisés chimiquement par transfert d'électron ou de proton en mode négatif. En général, le solvant vaporisé joue le rôle de gaz ionisant en produisant des ions pseudomoléculaires $(M - H)^+$ en mode positif et $(M - H)^-$ en mode négatif.

Les électrons nécessaires à l'ionisation primaire ne sont pas obtenus en utilisant un filament chauffé puisque la pression régnant dans cette partie de l'interface est la pression atmosphérique mais à l'aide de décharge Corona ou d'émetteurs de particules β^- .

Ces deux sources d'électrons sont largement insensibles à la présence de gaz corrosif ou oxydant. L'ionisation du substrat est très efficace car elle se passe à pression atmosphérique où la fréquence des collisions est élevée. La désolvatation et la vaporisation rapide des gouttelettes minimisent fortement la décomposition thermique et donc préservent l'espèce moléculaire. Les ions produits à pression atmosphérique pénètrent dans le spectromètre de masse par un petit orifice avant d'être focalisés vers l'analyseur. Cet orifice doit être suffisamment large pour permettre d'introduire le plus grand nombre d'ions possible tout en maintenant un vide correct dans l'appareil pour permettre l'analyse.

Nota :APCI et ESI sont parfois regroupés sous l'appellation API pour Ionisation à Pression Atmosphérique.

4. Les analyseurs

Les plus courants en analyse organique sont les analyseurs à balayage (scanning) qui détectent les ions successivement dans le temps.

① Qualités principales d'un analyseur

☆ Résolution

Le pouvoir de résolution est la capacité de l'analyseur à fournir des signaux distincts pour deux ions de masses voisines. En spectrométrie, la résolution correspond également à la finesse des pics. A chacune de ces définitions correspond un mode de calcul particulier.

En considérant le pouvoir séparatif, on peut définir la résolution en spectrométrie de masse comme le rapport $m/\Delta m$ où m est la masse d'un ion considéré et Δm la différence minimale entre le pic considéré et son voisin le plus proche dont il peut

être distingué. Selon cette définition, un instrument qui est en mesure de distinguer des ions de masse 100 et 100,1 possède une résolution de $100/(100,1-100)=1000$.

Si l'on considère la largeur des pics, la résolution est donnée par un rapport analogue $m/\Delta m$ où Δm est cette fois-ci la largeur du pic à mi-hauteur. Dans ce cas, une résolution de 1000 est atteinte pour un ion masse 100 dont la largeur à mi-hauteur représente 0,1 Thomson (Th).

Les mesures dites « en haute résolution » sont surtout effectuées pour obtenir des valeurs de masse exacte. Il faut cependant faire attention au fait que la résolution permet d'obtenir des mesures précises mais pas nécessairement exactes. L'exactitude dépend en effet de la qualité de l'étalonnage.

☆ Limite en masse

La limite en masse détermine la valeur limite du rapport m/z mesurable. Elle est exprimée en thomson (Th), ou en UMA pour un ion monochargé ($z=1$).

☆ Transmission

La transmission est le rapport entre le nombre d'ions arrivant au détecteur et celui produit par la source.

② **Analyseurs quadripolaires**

☆ Simple quadripôle

Un quadripôle est composé de quatre électrodes, de section idéalement hyperbolique mais le plus souvent circulaire, soumises deux à deux à un potentiel $\pm \Phi_0$ composé d'une tension continue U et d'une tension alternative V :

$$\Phi_0 = U - V \cdot \cos \omega t$$

Les ions formés dans la source entrent dans l'analyseur et subissent l'effet du champ quadripolaire. Selon les valeurs de U et de V , certains ions adoptent des trajectoires stables et peuvent être détectés, d'autres non car ils sont collectés par les barres du quadripôle. Leur trajectoire oscillante obéit aux équations de Mathieu :

$$d^2u/d(\omega t/2)^2 + (a_u - 2q_u \cdot \cos \omega t) \cdot u = 0$$

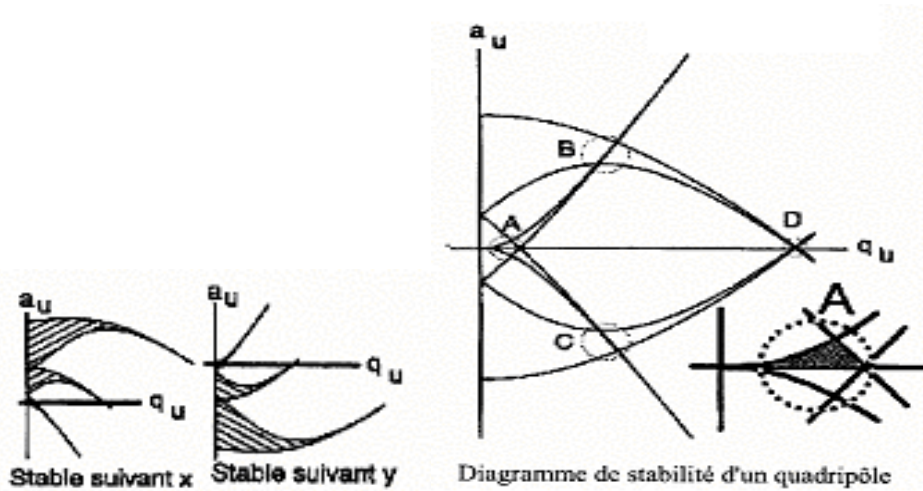
avec $u = x$ ou y

$$a_u = 8zeU/mr_0^2\omega^2$$

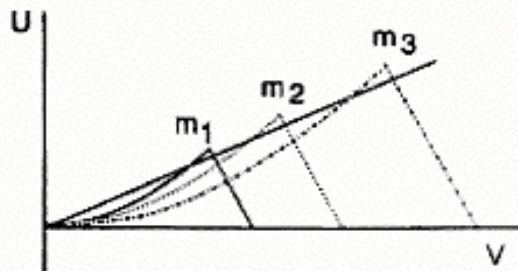
$$q_u = 4zeV/mr_0^2\omega^2$$

r_0 est le rayon du cercle inscrit entre les quatre barres et ω la fréquence angulaire telle que $\omega = 2\pi f$ où f est la fréquence du champ alternatif.

Pour qu'un ion traverse le quadripôle, il faut que les valeurs de x et de y restent inférieures à r_0 . Ces valeurs (représentées par u dans l'équation de Mathieu) étant liées aux paramètres a_u et q_u , eux-mêmes fonctions des tensions continues U et V , il est possible de définir selon les valeurs a_u et q_u des zones dans lesquelles des ions seront stables constituant le diagramme de stabilité.



Les ions devront être stables aussi bien dans la direction x que dans l'axe y. Quatre zones de travail sont possibles, indiquées de A à D sur le schéma ci-dessus. De manière générale, les spectromètres de masse quadripolaires filtrent les ions selon leur stabilité dans la zone A et travaillent avec des valeurs positives de U (donc de a_u). La zone à considérer correspond donc à la région hachurée de forme grossièrement triangulaire. Pour chaque valeur de m/z , une zone de stabilité différente peut être définie. Il faut donc, pour ne pas laisser passer les ions que l'un après l'autre et donc enregistrer les spectres, que les valeurs a_u et q_u (ou les potentiels U et V) soient balayés de telle sorte qu'un seul ion présente des trajectoires stables à un moment donné. En pratique, les valeurs de U et de V empruntent une droite figurée sur le schéma ci-dessous dite « droite de fonctionnement ».



Droite de fonctionnement

La pente de la droite de fonctionnement conditionne la résolution de l'appareil : une forte pente entraîne une haute résolution mais ne croise qu'une faible partie du diagramme de stabilité d'où un défaut de sensibilité. Une pente faible se traduit par une résolution faible mais une grande sensibilité.

A l'extrême, si l'on maintient la valeur de U nulle (pente de fonctionnement sur l'axe V), tous les ions se trouvent compris dans le diagramme de stabilité et traversent simultanément le quadripôle. Ce mode dit « radiofréquence seule ou Rf-only » est très utile pour transmettre des ions d'une partie d'un appareil vers une autre (guide ionique ou cellule de collision quadripolaire).

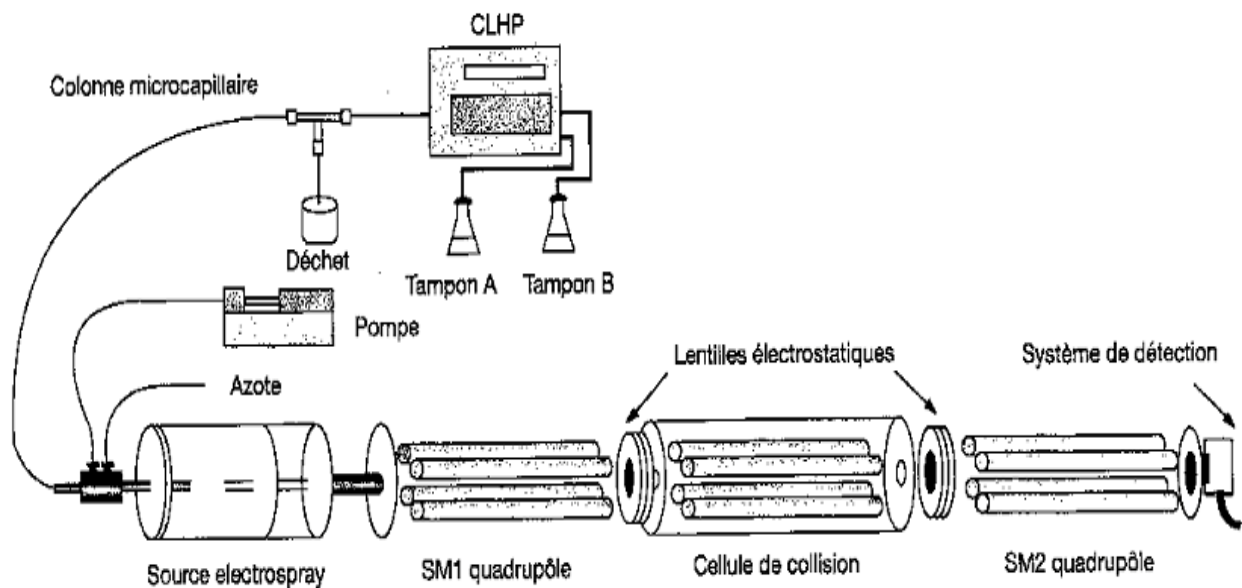
La gamme de masse maximum qui peut être utilement atteinte est de 4000 UMA, et la résolution de l'ordre de 3000. Donc, au-delà de la masse 3000 UMA les massifs isotopiques ne seront plus nettement résolus.

En pratique, la résolution qu'on peut atteindre n'est jamais suffisante pour déduire l'analyse élémentaire, de sorte qu'on travaille habituellement « à résolution unitaire », c'est-à-dire en séparant les ions qui diffèrent d'une unité de masse.

Ces analyseurs ne permettent donc pas d'obtenir des résolutions suffisantes pour en déduire des compositions élémentaires, ou pour séparer des ions de masse nominale. Ce sont des appareils à basse résolution.

☆ Triple quadripôle

Schéma de principe d'un appareil à trois quadripôles



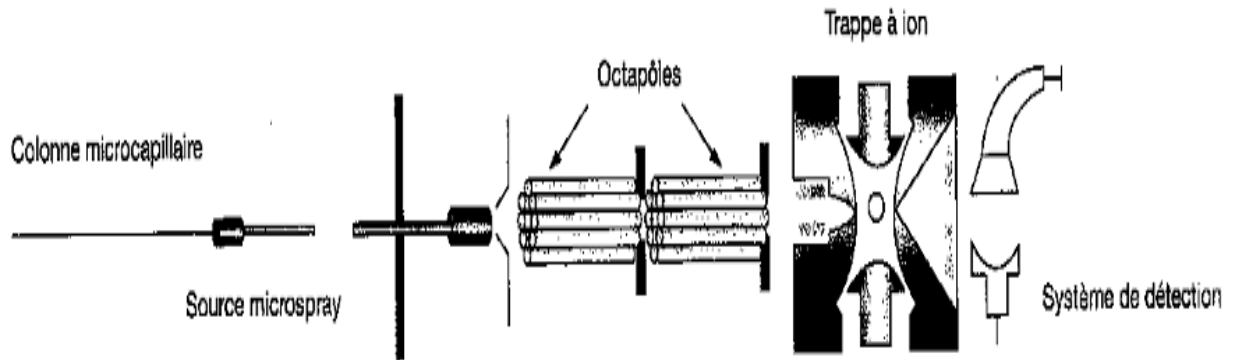
Dans le quadripôle central, on peut introduire un gaz de collision à une pression telle qu'un ion entrant dans le quadripôle subira une ou plusieurs collisions.

Si le gaz est inerte, on transfère de l'énergie à l'ion en convertissant une fraction de l'énergie cinétique en énergie interne. L'ion se fragmentera et les fragments seront analysés par le quadripôle SM2.

Si le gaz est réactif, on pourra provoquer des réactions ion-molécule dont les produits de réaction seront analysés par le quadripôle SM2.

Ces deux analyseurs en série séparés par une cellule de collision correspondent à l'instrumentation de base d'une méthode de spectrométrie appelée spectrométrie de masse « en tandem » ou masse-masse ou MS/MS à laquelle nous consacrerons un paragraphe ultérieurement.

☆ Piège à ions quadripolaire ou Quistor ou Trappe d'ions



La trappe d'ions est un développement du quadripôle. Dans cet appareil, les quatre barres sont remplacées par une électrode annulaire recouverte de part et d'autre de l'espace central par une électrode hyperbolique (dite calotte, électrode chapeau ou end-cap). L'entrée des ions s'effectue à travers un orifice percé dans l'une de ces électrodes (calotte supérieure) et leur sortie, au centre de l'électrode opposée (calotte inférieure). Comme dans un quadripôle classique, les calottes d'une part et l'électrode torique d'autre part sont asservies à une tension respective $+\Phi_0$ et $-\Phi_0$ ce qui a pour effet de créer un champ quadripolaire au sein de la trappe.

A l'intérieur de ce piège, les ions suivent une trajectoire oscillante close qui obéit aux équations de Mathieu. Il est donc possible, pour la trappe à ion comme pour l'analyseur quadripolaire d'avoir des valeurs de paramètres a et q pour lesquelles les trajectoires associées à une valeur donnée de m/z sont stables ou instables.

En augmentant de façon progressive la tension alternative, les ions sont déstabilisés de façon successive et expulsés de la trappe, ce qui permet l'enregistrement des spectres.

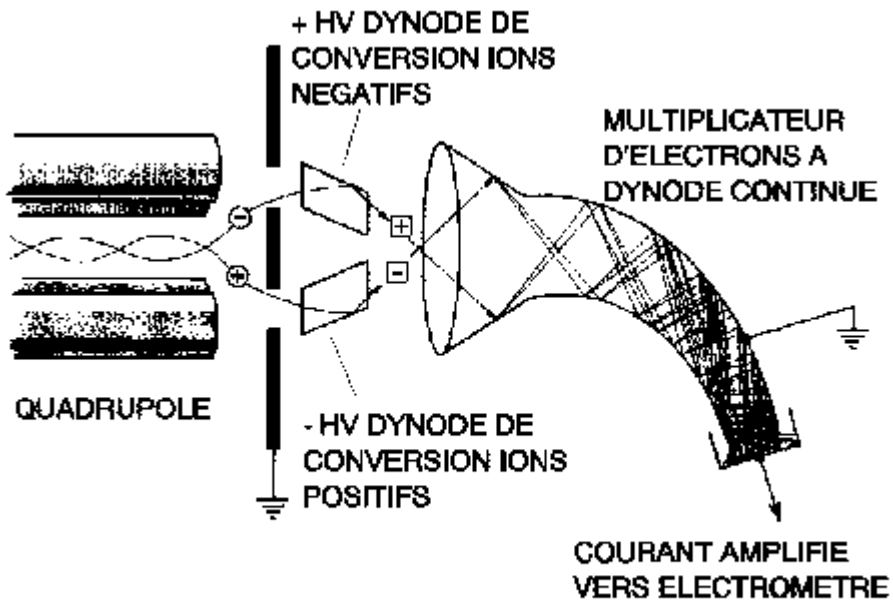
Ces spectromètres sont très sensibles et ne tolèrent qu'un nombre d'ions limité dans l'enceinte. En effet, les répulsions mutuelles des ions induisent une augmentation du rayon de leur trajectoire, ce qui nuit aux résultats. Afin de les garder confinés à proximité du centre, il est nécessaire d'introduire à l'intérieur du piège une pression de gaz neutre qui permet de les thermaliser.

Les améliorations apportées aux spectromètres de masse à trappe d'ions depuis 1996 ont montré des possibilités d'utilisation à haute masse et à haute résolution.

5. Les détecteurs

Le faisceau d'ions, ayant traversé l'analyseur de masse, doit être détecté et transformé en un signal utilisable. Pour cela, il existe différents types de détecteurs capables de transformer un courant ionique faible en un signal mesurable.

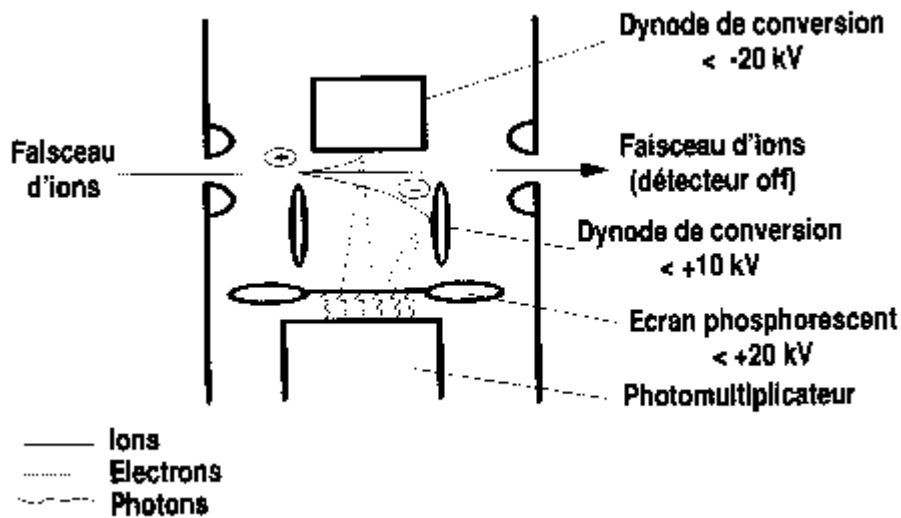
① Multiplicateurs d'électrons



Actuellement, les détecteurs multiplicateurs d'électrons (channeltron) sont des tubes de verres dopés au plomb en forme de corne ayant de bonnes propriétés d'émissions secondaires et une résistance électrique uniforme. Une tension de courant appliquée entre les deux extrémités de ce tube va chuter tout le long de sa longueur. Toute particule heurtant la surface interne du détecteur provoque l'émission d'électrons qui sont alors accélérés par ce champ vers l'intérieur du tube pour venir à nouveau frapper la paroi et provoquer l'émission d'un plus grand nombre d'électrons secondaires. Le signal de sortie est détecté sur une plaque collectrice à la sortie du tube.

Ces détecteurs sont inclus dans un dispositif comprenant deux dynodes de conversion, l'une portée à un potentiel négatif pour les ions positifs et l'autre portée à un potentiel positif pour les ions négatifs. Un ion arrivant sur la dynode de conversion produit l'émission de G particules secondaires. Quand un ion positif frappe la dynode de conversion portée à un haut voltage négatif, les particules secondaires intéressantes sont des électrons et des ions négatifs. Quand un ion négatif frappe la dynode de conversion portée à un haut voltage positif, les particules secondaires intéressantes sont des ions positifs. Les particules secondaires sont accélérées vers le channeltron. Un multiplicateur d'électrons produit H électrons à la sortie pour un électron ou un ion entrant. La valeur du gain de conversion $G \times H$ peut atteindre 10^6 à 10^7 . Le facteur de conversion dépend de la nature (masse, charge et structure) et de la vitesse des ions détectés de sorte que ces détecteurs ne sont pas très précis. Par contre leur sensibilité est telle qu'ils permettent un balayage rapide.

② Multiplicateurs de photons



Ce type de détecteur est constitué de deux dynodes de conversion, d'un écran phosphorescent et du photomultiplicateur proprement dit.

Ce dispositif permet la détection des ions positifs ou négatifs. En mode positif, les ions sont accélérés vers la dynode portée à un potentiel négatif alors qu'en mode négatif les ions sont accélérés vers la dynode positive. Les électrons secondaires émis par ces dynodes de conversion sont alors accélérés vers l'écran phosphorescent où ils sont convertis en photons. Ces photons sont ensuite détectés par le photomultiplicateur. La surface de l'écran phosphorescent est recouverte d'une fine couche d'aluminium conducteur de manière à éviter qu'elle ne se charge jusqu'à empêcher l'arrivée de nouveaux électrons. La valeur du gain de l'amplification est de l'ordre de 10^4 à 10^5 .

6. L'environnement

L'environnement correspond à la station de travail qui comprend l'ordinateur, les logiciels et l'imprimante.

① Fonctions de l'ordinateur

L'ordinateur dédié à un spectromètre de masse enregistre les données provenant du spectromètre de masse et les convertit selon les cas en valeurs des masses et des intensités des pics, en courant ionique total, en valeurs des températures, en valeur du potentiel d'accélération etc....

Il permet l'examen des données enregistrées et leur manipulation en affichant ou en imprimant les spectres et chromatogrammes sous différents formats, en permettant la soustraction d'un spectre par rapport à un autre, en calculant une moyenne sur plusieurs spectres, etc....

Il peut également aider à l'interprétation. Par exemple, il est capable de comparer les spectres obtenus à une bibliothèque de spectres.

L'ordinateur peut enfin piloter le spectromètre en lui fournissant les valeurs et variations des différents paramètres.

Comme l'ordinateur traite des grandeurs digitales tandis que le spectromètre fournit et reçoit des grandeurs analogiques, un interface est nécessaire pour convertir un type de grandeur dans l'autre.

II. LE COUPLAGE CHROMATOGRAPHIE LIQUIDE HAUTE PERFORMANCE (HPLC) ET SPECTROMETRIE DE MASSE (MS) OU LC/MS

Le couplage LC/MS s'impose depuis les années 1990 avec l'apparition des sources d'ionisation à pression atmosphérique, API. Jusqu'à cette date, le couplage LC/MS s'était avéré problématique. En effet, si l'on compare les conditions d'utilisation de l'HPLC et de la MS, on constate de nombreuses incompatibilités entre les deux systèmes.

Chaîne HPLC	Spectrométrie de masse
Molécules en solution	Ions en phase gazeuse
Pression élevée	Vide poussé
Température peu élevée	Température très élevée
Pas de limitation de masse	Dépend du rapport m/z (masse/charge) et du type d'analyseur
Utilisation de tampons inorganiques	Utilisation de tampons volatils

L'HPLC permet de séparer des molécules dans un milieu dense (pression élevée en phase liquide) la MS permet, quant à elle, de mesurer le rapport charge/masse d'un ion en phase gazeuse dans un vide poussé. Il fallait donc que l'interface soit capable de séparer les solutés de la phase mobile, de les passer en phase gazeuse et enfin de les ioniser. De plus, l'ion formé devait être stable.

L'arrivée des sources API a révolutionné ce couplage pour trois raisons essentielles :

- ⇒ les modes d'ionisation à pression atmosphérique, électrospray (ESI) et ionisation chimique à pression atmosphérique (APCI), sont des modes d'ionisation particulièrement doux qui permettent de mesurer la masse moléculaire.
- ⇒ les limites de détection sont très basses (de l'ordre de la femtomole).
- ⇒ les débits introduits dans la source sont compatibles avec l'HPLC.

Les modes d'ionisation ESI et APCI diffèrent en plusieurs points : en APCI, on observe une évaporation de la phase mobile, puis la formation d'ions en phase gazeuse ; en ESI, on constate d'abord la formation d'ions en phase liquide, puis l'évaporation.

De fait, APCI et ESI sont des techniques très complémentaires.

L'interface ESI accepte des débits qui vont de 1 µL/minute à 1 mL/mn. La sensibilité en mode ESI est proportionnelle à la concentration de l'analyte dans la phase mobile. En règle générale, les phases mobiles les plus simples sont les meilleures ; de 100% aqueuses, à 100% organiques, elles doivent impérativement être exemptes

de tout tampon non volatil (pas de phosphates !). Enfin, pour des raisons de détection parfois incompatibles d'ailleurs avec le maintien de la résolution chromatographique, il est souvent intéressant d'ajuster le pH de la phase mobile en fonction du pKa des composés étudiés, l'objectif étant de maintenir ceux-ci sous forme ionisée.

L'avantage de l'ESI est son application aussi bien à des composés acides ou basiques, qu'à des molécules ne contenant aucun site ionisable grâce à la formation d'adduits sodique, potassique, ammonium,...etc, ou en ions négatifs d'adduits chlorure, acétate..... De plus, elle est idéale pour les molécules thermosensibles, c'est pourquoi elle est largement utilisée.

Contrairement à l'ESI, l'APCI n'est guère compatible avec les micro-débits, la sensibilité chutant rapidement en dessous de 100 $\mu\text{L}/\text{mn}$; elle est par contre plus tolérante vis-à-vis des forts débits et peut admettre plus de 2 mL/mn de phase mobile. Elle s'adresse à des composés de polarité moyenne et à des « petites molécules » (le phénomène des multicharges ne se produit pas).

Le domaine de prédilection des sources API concerne l'étude des molécules d'intérêt biologique et pharmaceutique.

Par exemple, l'ESI est particulièrement adapté aux molécules biochimiques puisque l'on peut fixer plusieurs protons sur un même soluté. Cela permet de mesurer avec précision (0,01%) la masse d'une macromolécule (protéine, oligonucléotide).

Des applications tant quantitatives que qualitatives sont envisageables. Dans ce dernier cas, l'intérêt le plus évident à attendre d'un couplage d'une technique chromatographique de séparation d'un mélange à la spectrométrie de masse est l'obtention du spectre lui-même pour l'identification de la substance séparée. Il peut permettre la déconvolution des pics chromatographiques, c'est-à-dire la décomposition de pics non résolus en constituants (probabilité d'avoir plusieurs constituants sous le même pic).

III. COUPLAGE CHROMATOGRAPHIE LIQUIDE HAUTE PERFORMANCE ET SPECTROMETRIE DE MASSE EN TANDEM OU LC/MS/MS

Nous avons montré le potentiel analytique énorme des sources d'ions API. Nous avons vu que les sources API permettent une ionisation douce des biomolécules. Ce qui apparaît comme un avantage majeur dans le cas d'une mesure de masse peut aussi être considéré comme un inconvénient majeur si une analyse de structure plus détaillée est recherchée. Cette simple constatation explique que la technique masse-masse soit, par beaucoup, considérée comme un complément indispensable aux sources à pression atmosphérique, puisqu'elle permet de fragmenter sélectivement un ion en sortie de source et de l'analyser. Cette technique MS/MS est compatible avec une instrumentation quadripolaire de loin la plus répandue dans le domaine.

Un instrument communément employé en MS/MS est le triple quadripôle dont nous avons décrit le principe de fonctionnement. Théoriquement, rien n'empêche la multiplication des analyseurs successifs. Ils sont alors notés MS^n . Comme le signal décroît à chaque étape en raison de la longueur du trajet des espèces ioniques et de la présence de gaz de collision, la limitation pratique est de 3 à 4 analyseurs. Cependant, comme le bruit chimique décroît de manière plus importante que le signal ionique, le rapport signal/bruit augmente ainsi que la sensibilité.

A côté de la méthode de séparation spatiale des analyseurs successifs, la MS/MS peut se faire en séparation temporelle dans une trappe d'ions, programmée pour que les différentes étapes soient réalisées successivement dans l'appareil. En sélectionnant correctement les valeurs de U et V on peut ne conserver dans la trappe que les ions d'une masse choisie. Au cours du temps, ces ions vont se fragmenter dans la trappe, qui contiendra alors tous les ions produits. On peut alors les expulser sélectivement, et on obtient ainsi un spectre des ions fragments d'une masse choisie. Le processus peut être répété plusieurs fois en sélectionnant des ions parent successifs. On parle ici encore de MSⁿ.

L'analyse MS/MS et MSⁿ peut se faire de différentes façons selon les analyseurs considérés.

Les potentialités de la LC/MS/MS vont concerner l'analyse de molécules avec de faibles limites de détections. Du fait de la sélectivité de la méthode de quantification (recherche de l'ion parent et de l'ion fils associé) en mode MS/MS (triple quadripôle), il est possible d'atteindre des seuils bas.

Il va s'agir d'instruments permettant de doser tout type de molécules, indépendamment des caractéristiques d'absorption UV, fluo, etc...

Le domaine d'application devient ainsi très large, tout en s'affranchissant de procédures opératoires lourdes et complexes comme les dérivations, les concentrations d'échantillons, etc..

IV. L'ANALYSE MOLECULAIRE EN BIOLOGIE PAR COUPLAGE CHROMATOGRAPHIE LIQUIDE HAUTE PERFORMANCE ET SPECTROMETRIE DE MASSE

1. Introduction

Dans ce Chapitre, nous avons plusieurs fois évoqué l'importance de l'utilisation d'une source d'ions adaptée au traitement analytique des molécules biologiques en LC/MS ou LC/MS/MS.

Nous avons décrit deux types de source dites API (Ionisation à Pression Atmosphérique) dont les caractéristiques sont résumées dans le tableau suivant :

SOURCE	ESI (Electrospray)	APCI (Ionisation Chimique à Pression Atmosphérique)
FONCTIONS	† passage en phase gazeuse des solutés à analyser après séparation de la phase mobile † ionisation des molécules et décomposition des ions (une molécule s'ionise en un ion moléculaire qui engendre un ensemble d'ions primaires caractérisés par leur rapport m/z)	
MODE D'IONISATION	† formation d'ions en phase liquide † évaporation de la phase liquide	† évaporation de la phase mobile † formation d'ions en phase gazeuse

SOURCE	ESI (Electrospray)	APCI (Ionisation Chimique à Pression Atmosphérique)
APPLICATIONS	<ul style="list-style-type: none"> ✦ composés acides ou basiques ✦ molécules ne contenant aucun site ionisable grâce à la formation d'adduits sodique, potassique, ammonium, etc..., ou en ions négatifs d'adduits chlorure, acétate..... ✦ molécules thermosensibles 	<ul style="list-style-type: none"> ✦ composés de polarité moyenne ✦ « petites molécules » pour lesquelles le phénomène de multicharges ne se produit pas
CARACTERISTIQUES	<ul style="list-style-type: none"> ✦ accepte des débits de 1µL/minute à 1 mL/minute ✦ sensibilité proportionnelle à la concentration de l'analyte dans la phase mobile 	<ul style="list-style-type: none"> ✦ accepte des forts débits et peut admettre plus de 2 mL/minute de phase mobile ✦ sensibilité chute rapidement en dessous de 100µL/mn
AVANTAGES	<ul style="list-style-type: none"> ✦ pas de fragmentation induite des biomolécules analysées qui sont souvent non volatiles et fragiles ⇒ Ionisation « douce » ✦ limites de détection très basses (de l'ordre de la femtomole 10^{-15}) 	

Les sources ESI rendent possible de nombreuses applications en microdébits, c'est pourquoi elles sont largement utilisées en analyse biomédicale.

Après avoir vu les conditions d'ionisation des molécules biologiques, nous nous proposons de présenter les différents modes de fonctionnement des spectromètres de masse et de conclure ce chapitre par des considérations pratiques.

2. Modes de fonctionnement des spectromètres de masse utilisés en analyse biologique

La partie du spectromètre de masse qui nous intéresse ici est l'analyseur. Pour pratiquer l'analyse LC/MS tandem, deux technologies distinctes sont disponibles : l'analyseur triple quadripôle ou l'analyseur trappe d'ions.

⇒ Le triple quadripôle

De base sur un triple quadripôle, existent 4 possibilités de sélectionner les molécules et d'obtenir ainsi un certain nombre d'informations quantitatives et qualitatives.

① *Le mode simple quadripôle*

Même dans le cas d'un triple quadripôle, il est toujours possible de l'utiliser dans une configuration simple quadripôle, c'est à dire que les molécules seront sélectionnées dans une plage de masse donnée ou selon une masse précise et transmises directement au détecteur, sans être fragmentées dans le second quadripôle, et sans être sélectionnées dans le troisième. Ce mode peut s'appliquer dans le cadre de méthode préparative ou de l'optimisation de l'analyseur. Dans tous les cas, on parlera de LC/MS, car un seul quadripôle est impliqué dans la sélection par la masse des molécules ionisées. Cette fonction est aussi appelée « Full Scan ».

② *Les modes triple quadripôle*

Ils mettent toujours en œuvre les trois quadripôles, en particulier le premier et le troisième en terme de sélection des molécules par leur masse. On parlera alors de LC/MS/MS ou LC/MS en tandem.

☆ Scan de l'ion produit

Dans ce mode d'analyse, l'opérateur va rechercher l'ensemble des ions « fils » qui sont produits lors de la fragmentation de la molécule d'intérêt. Pour ce faire, le premier quadripôle (Q1) permettra de sélectionner la molécule, qui sera ensuite fragmentée dans le second quadripôle (Cellule de Collision – Q2), et observera l'ensemble des ions issus de la fragmentation dans le troisième quadripôle (Q3).

Ce type de fonction est utilisée dans le cadre de recherches d'informations structurales ou lors de la mise au point de méthode de quantification. En effet, cela permet à partir d'une molécule connue, que l'on souhaite quantifier, de sélectionner l'ion « fils » le plus intense observé en Q3 de façon à retenir cet ion pour le mode de détection dédié à la quantification.

☆ Scan de l'ion précurseur

Dans ce mode d'analyse, l'opérateur demande à l'analyseur de sélectionner un ion « fils » dans le 3^{ème} quadripôle, Q3, toujours selon une masse déterminée, et de systématiquement identifier la molécule présente dans le 1^{er} quadripôle, Q1, qui est à l'origine de cet ion « fils ». Cela permet d'établir quel est l'ensemble des molécules au sein d'un échantillon qui par fragmentation, donnent le même ion « fils ». Une application se trouve en particulier dans la recherche de métabolites, si la molécule d'intérêt a subi des modifications.

☆ Balayage en perte de neutre

L'analyseur est programmé de façon que les quadripôles Q1 et Q3 balayent une plage de masse avec un delta identique tout au long du balayage. Cette différence

de masse balayée entre Q1 et Q3 correspond à d'éventuelles pertes de molécules neutres. En effet, lors de la fragmentation dans le quadripôle Q2, une partie de la molécule d'origine peut se retrouver sous forme de fragment non ionisé (perte d'une molécule d'eau par exemple). Or comme l'analyseur ne peut déterminer la masse que sur des molécules ionisées, ces fragments n'apparaîtraient pas dans le spectre final. Ainsi il est possible à l'aide de cette fonction de compléter l'information obtenue par le scan de l'ion précurseur dans le cadre de la recherche de métabolites. Ces 2 modes de scans se retrouvent très souvent associés.

☆ Scan dédié à la quantification

Dans le cas d'une quantification, la technologie triple quadripôle est la technique de référence, tant pour la précision et la répétabilité obtenues, que pour la sensibilité et la gamme de linéarité explorées. Il s'agit de quantifier une molécule connue dont l'ion « fils » le plus intense a été identifié à l'aide du scan de l'ion produit. Cette association masse de la molécule d'intérêt / masse de l'ion « fils » représente ce que l'on appelle une transition. C'est ce qui permet à l'analyseur d'être très sélectif, car il ne procède à une acquisition que lorsqu'il a respectivement dans les quadripôles Q1 et Q3 la masse de l'ion « parent » et de l'ion « fils ». Cela conduit à l'augmentation du rapport signal/bruit, donc de la sensibilité du fait de la sélectivité de la technique. Comme il est possible de rechercher plusieurs transitions au sein d'une même analyse, on parle de MRM, pour « Metastable Reaction Monitoring » ou analyse des réactions métastables. Il est ainsi possible de créer des méthodes regroupant un ensemble de molécules, permettant d'effectuer des recherches sur un grand nombre de molécules dans un échantillon, tout en les quantifiant si elles sont présentes.

⇒ **Trappe d'ions**

Les différents modes de scan décrits pour le triple quadripôle sont transposables à un analyseur trappe d'ions. Cependant, la trappe d'ions permet de travailler en mode MS_n.

☆ Scan en mode MS3 et plus généralement MS_n

Selon la taille des fragments obtenus en MS/MS (ou MS₂), il est possible de les sélectionner dans la trappe d'ions afin de les refragmenter et passer ainsi à un stade MS₃ ou plus, particulièrement dans le but d'analyses qualitatives.

La technique API/MS/MS est à la fois sélective dans le choix d'un ion parent à l'exclusion de toute autre interférence, spécifique dans l'empreinte formée par le spectre de fragmentation, quantitative, sensible, rapide et automatisable.

⇒ **En pratique**

A l'exception du mode « scan MS_n », spécifique à l'analyseur trappe d'ions, les analyseurs triple quadripôle et trappe d'ions ont des modes de fonctionnement communs.

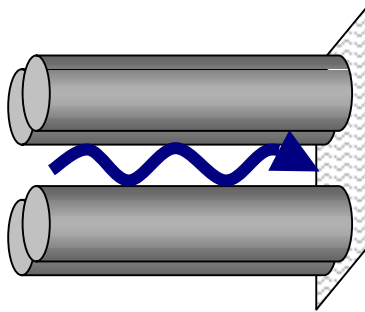
Cependant, le triple quadripôle et la trappe d'ions présentent chacun des modes de fonctionnement pour lesquels certains types d'analyses sont optimisés.

Ainsi, on retiendra un analyseur en fonction des types d'analyses, quantitative, qualitative ou prospective.

Très schématiquement, on peut résumer comme suit :

TRIPLE QUADRIPOLE

Tandem dans l'espace

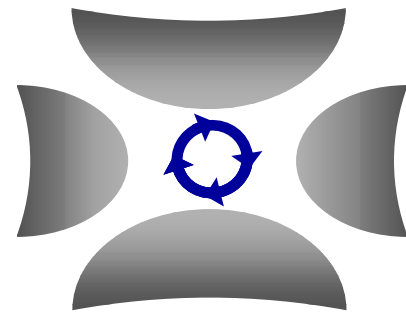


⇒ **Analyse quantitative**

- ✦ mode MRM
- ✦ scan de l'ion produit
- ✦ scan de l'ion précurseur
- ✦ perte de neutre

TRAPPE D'IONS

Tandem dans le temps



⇒ **Analyses prospective et qualitative**

- ✦ full scan → screening
- ✦ MSⁿ → analyse structurale

3. Pratique de l'analyse biologique par spectrométrie de masse

⇒ Introduction

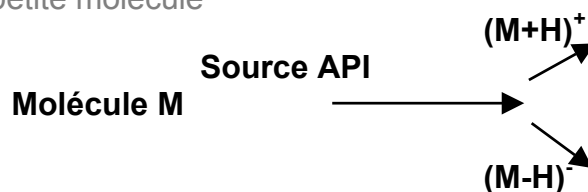
L'analyse par spectrométrie de masse est utilisée dans deux principales finalités, il s'agit :

- soit de quantifier un ou plusieurs composés connus d'un échantillon (dosages de routine),
- soit de caractériser une ou plusieurs substance(s) contenue(s) dans cet échantillon.

⇒ Notions fondamentales

✦ Une source API génère, pour une molécule M, des ions et des fragments comme suit :

M, petite molécule



M, grosse molécule



L'ion pseudomoléculaire observé le plus souvent est $(\text{M}-\text{H})^+$ dans le cas des composés saturés et $(\text{M}+\text{H})^+$ dans le cas des composés insaturés ou à hétéroatomes.

L'ionisation des grosses molécules produit en général des ions multichargés.

Il s'agit d'ions pseudomoléculaires positifs ou négatifs selon le choix du mode d'ionisation positif ou négatif de la molécule.

L'ion pseudomoléculaire se définit comme un ion obtenu à partir de la molécule par enlèvement d'un proton, ou par addition d'un proton ou d'un autre ion. Il possède une énergie interne relativement faible et se fragmente peu. Il permet donc de déduire facilement la masse moléculaire du produit.

L'ion pseudomoléculaire a une masse impaire : la masse M, paire, augmente ou diminue de un pour le proton fixé ou perdu. Le nombre d'électrons de l'ion est égal à celui de la molécule neutre donc pair. Il s'agit bien d'un cation ou d'un anion « habituel ».

Ces anions ou cations formés peuvent se fragmenter et produire un nouvel anion ou cation accompagné d'une molécule neutre.

Le nombre et la nature des fragments sont caractéristiques de la substance considérée.

✦ Certains ions sont typiques de structures données ce qui facilite l'interprétation des spectres. Par exemple, l'ion fragment CH_3^+ est associé à un rapport m/z de 15 Th. De même, OH^+ présente un m/z à 17 Th et NH_4^+ à 18 Th.

✦ De la fragmentation des ions primaires peut résulter la perte d'atome (hydrogène) ou de molécule (eau) que l'on nomme neutres caractéristiques. Par exemple, la fragmentation résultant de la formation d'une molécule d'eau se traduit par une perte de 18 unités. Elle est fréquente lorsqu'un groupement hydroxyle est présent.

⇒ Interprétation du spectre de masse API

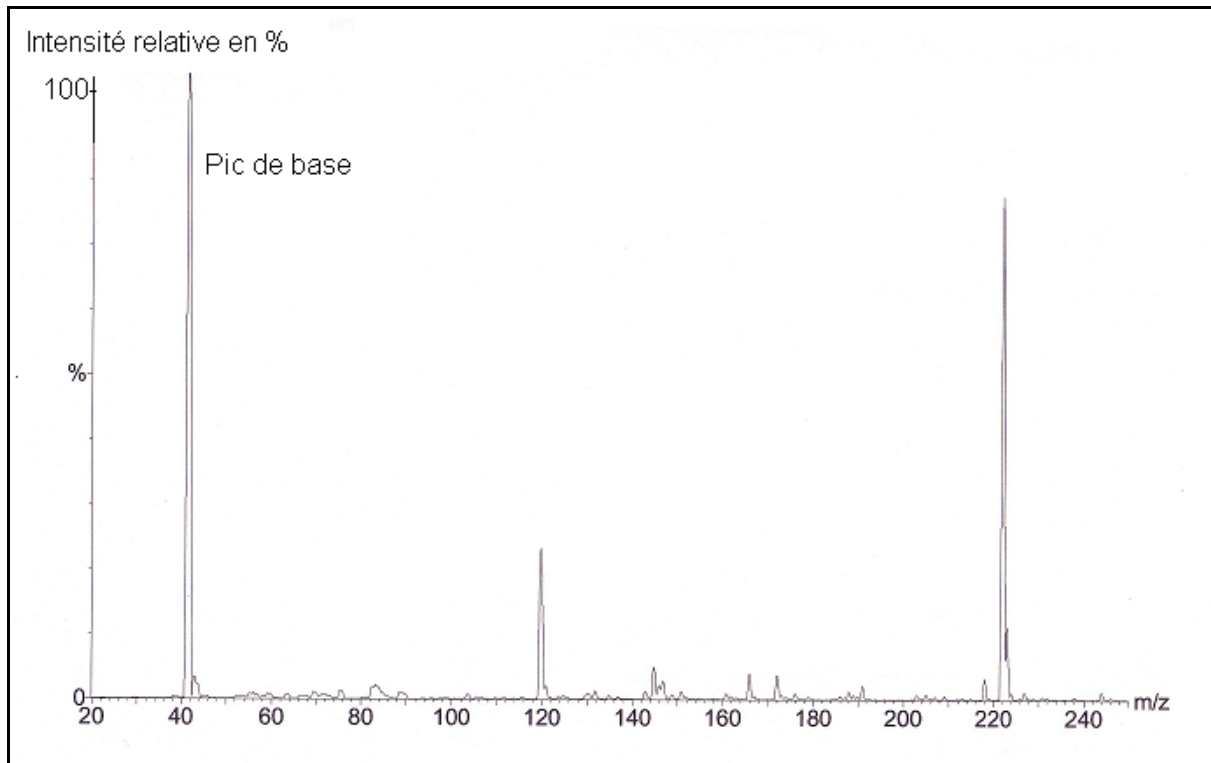
✦ Les bases

Le spectre ci-dessous est le spectre de masse du 2-amino-2-benzylethanoate de n-butyle, obtenu en mode simple quadripôle.

L'axe des ordonnées correspond à l'intensité relative en %. L'intensité de chaque pic est le reflet de la population issue de la source (mesure de l'intensité du courant ionique).

Le pic le plus grand détermine le 100% d'intensité relative et est appelé le pic de base. Il représente le courant ionique le plus important autrement dit le fragment ionique majoritaire issu de la molécule.

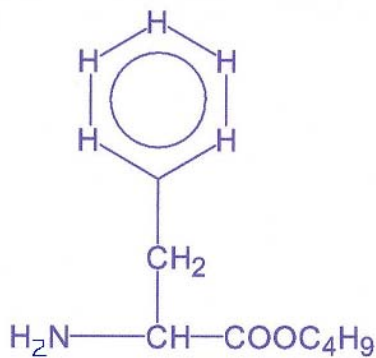
L'axe des abscisses correspond au rapport m/z en Thomson.



Spectre MS du 2 amino, 2 benzyl éthanoate de n butyle (document WATERS)

✦ Des ions de la source aux pics du spectre de masse

La formule développée du 2 amino, 2 benzyl éthanoate de n butyle est la suivante :

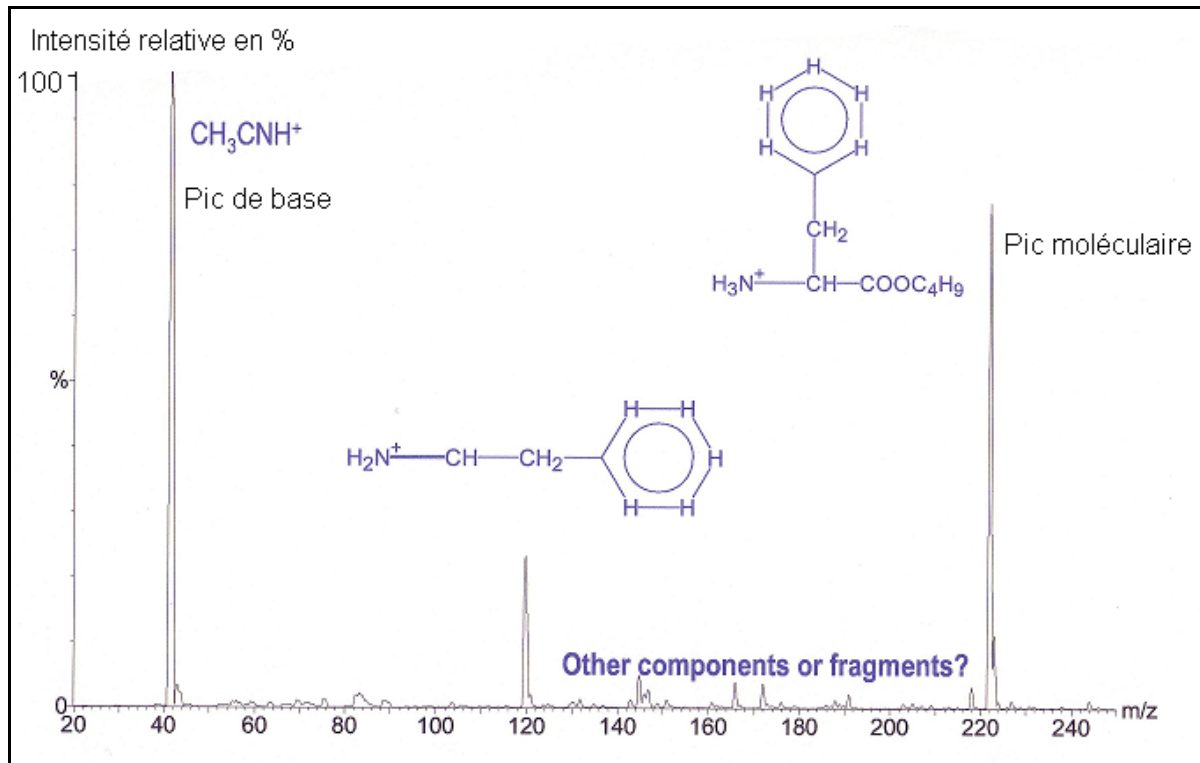


Cette molécule est insaturée et azotée. L'ionisation API, en mode positif engendre des ions de type $(M+H)^+$.

Le poids moléculaire (masses nominales) du 2 amino, 2 benzyl éthanoate de n butyle est de 221 UMA. On peut attribuer le pic de rapport m/z égal à 222 th à l'ion pseudomoléculaire créé par l'addition d'un proton sur la molécule.

Ce cation à nombre pair d'électrons se fragmente en d'autres cations à nombre pair d'électrons.

Les fragmentations les plus probables en fonction de la nature des molécules et des sources utilisées ont été étudiées et classifiées. Les connaissances acquises permettent l'interprétation du spectre de masse. A chaque pic, caractérisé par son rapport m/z correspond un ion particulier.



Spectre MS du 2 amino, 2 benzyl éthanoate de n butyle (document WATERS)

Cependant, sur le spectre ci-dessus, obtenu par le mode de fonctionnement simple quadripôle, plusieurs pics de faible intensité relative ne sont pas interprétables. On ne peut pas déterminer leur nature : fragments de la molécule échantillon ou impuretés ?

Une analyse par spectrométrie de masse en tandem permet d'élucider le spectre.

⇒ Analyse quantitative

La mise au point d'une procédure analytique LC/MS/MS s'effectue en trois étapes :

- développement de la partie MS,
- développement de la technique HPLC,
- préparation de l'échantillon.

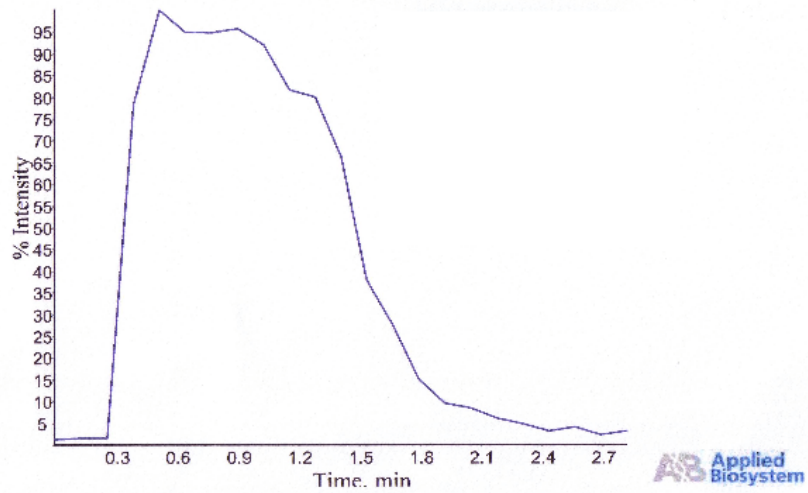
Une solution standard de la molécule d'intérêt (100 ppm) est infusée à un faible débit (5 à 20 $\mu\text{L}/\text{mn}$) par un pousse seringue, directement dans le spectromètre de masse. L'appareil est programmé en mode d'acquisition simple quadripôle. La gamme de masse balayée par l'appareil est choisie en fonction des caractéristiques de la molécule.

On peut obtenir deux types de tracés :

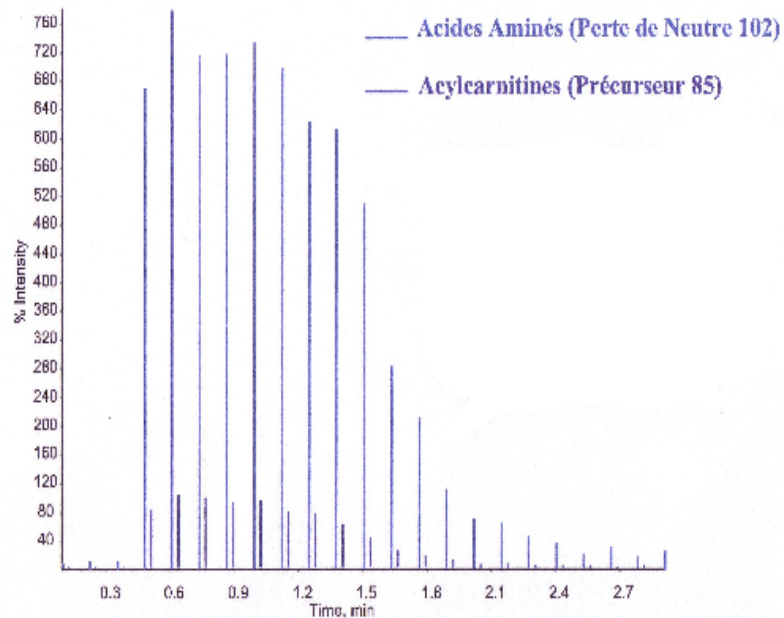
- spectre de l'intensité relative (%) en fonction du rapport m/z (th),
- spectre du courant ionique total qui correspond aux données du spectromètre de masse acquises en fonction du temps. Ce tracé peut être assimilé à un tracé HPLC avec détection UV à la différence près qu'il met en évidence beaucoup plus de composés transparents aux UV.

Spectres courant ionique totale fonction du temps (document APPLERA)

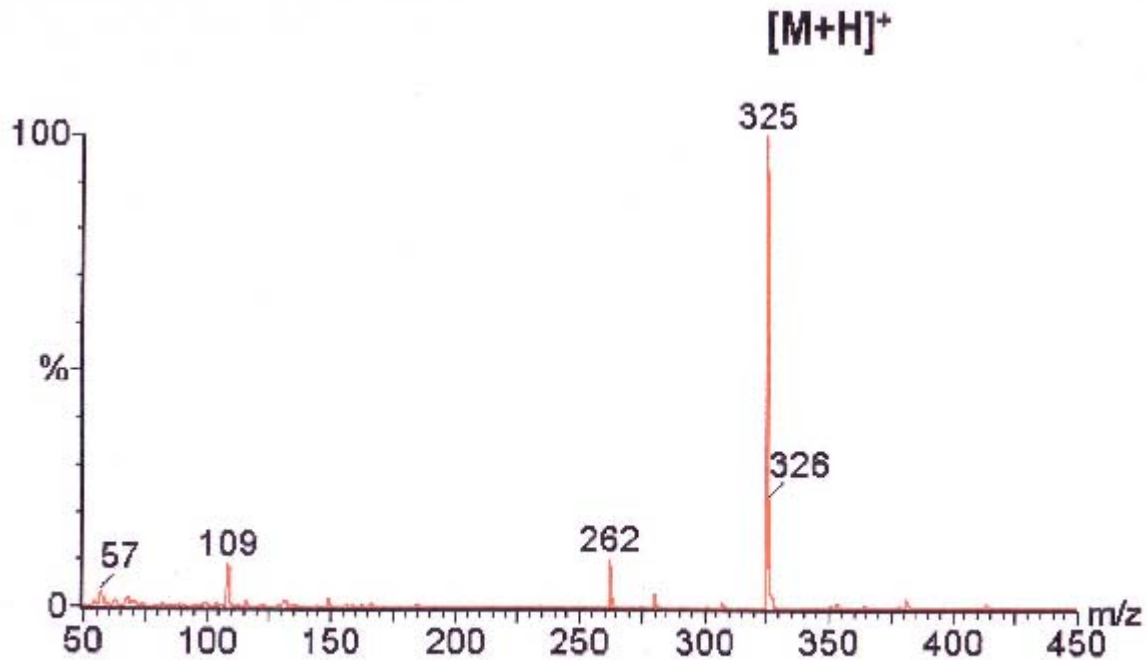
PROFIL D'ELUTION TOTALE D'UN SANG CONTROLE
Acquisition Full Scan d'Acylcarnitines et d'Acides Aminés



“Split” Total Ion Elution Profiles of Amino Acid and Acylcarnitine Scan Functions



Spectre MS citalopram (document WATERS), intensité relative fonction du rapport m/z



Full scan analysis of citalopram

Ces tracés permettent de repérer la molécule d'intérêt sur le courant ionique obtenu, et de sélectionner l'ion parent en fonction de son rendement d'ionisation.

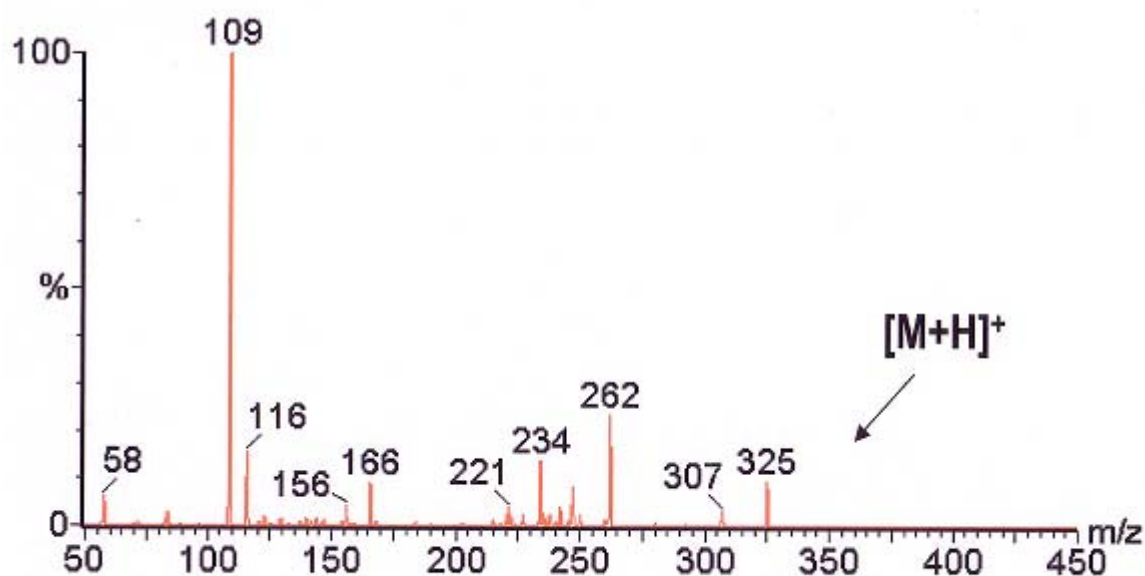
Le même échantillon infusé permet le réglage des nombreux paramètres machine modifiant la qualité du signal obtenu (tensions, gaz, etc..).

L'appareil est ensuite programmé en mode MRM afin de déterminer la transition qui sera utilisée lors de la quantification.

Le spectre « full scan » du citalopram, SEROPRAM®, antidépresseur sérotoninergique, met en évidence un pic d'intensité élevée, de m/z égal à 325 th correspondant à l'ion pseudomoléculaire $(M+H)^+$. Cet ion est choisi comme l'ion parent, sélectionné dans le premier quadripôle et fragmenté dans la cellule de collision.

Le spectre qui suit est le spectre MS/MS du citalopram.

Spectre MS/MS Citalopram (document WATERS)



Product ion scan of m/z 325

Le choix de l'ion fils se fait sur les mêmes critères que celui de l'ion parent. Le signal MS/MS est optimisé par de nouveaux réglages machine concernant l'énergie de collision (25 eV) et le voltage (38 V).

Pour le citalopram, la transition retenue pour le dosage quantitatif est $325 \rightarrow 109$.

La deuxième étape débute par un travail en Flow Injection Analysis (FIA) c'est-à-dire avec la phase mobile seule (pas de colonne HPLC). L'objectif de la manipulation est de déterminer les conditions opératoires dans lesquelles un rendement d'ionisation maximal est obtenu. C'est à ce niveau que sont effectués les réglages spécifiques de la source (température, débit de la phase mobile, position de l'impact du spray sur la plaque rideau...) et que la composition de la phase mobile est définie. Dans le cas du citalopram, l'ion parent correspond à l'ion pseudomoléculaire $(M+H)^+$, dans la phase mobile est ajouté 0,1% d'acide formique afin de faciliter l'ionisation.

Ensuite, on étudiera les conditions HPLC complète avec la colonne chromatographique (choix de la colonne, du gradient, etc...) pour aboutir à des analyses dans des matrices biologiques et non plus sur des solutions standards.

Exemple de conditions HPLC pour le Citalopram (Document WATERS)

Colonne	C18
Phase Mobile	Solvant A : 2 mM d'acétate d'ammonium + 0,1% d'acide formique Solvant B : Acétonitrile + 0,1% d'acide formique
Elution	Isocratique 60/40
Débit	0,35 mL/mn
Volume d'injection	10 μ L

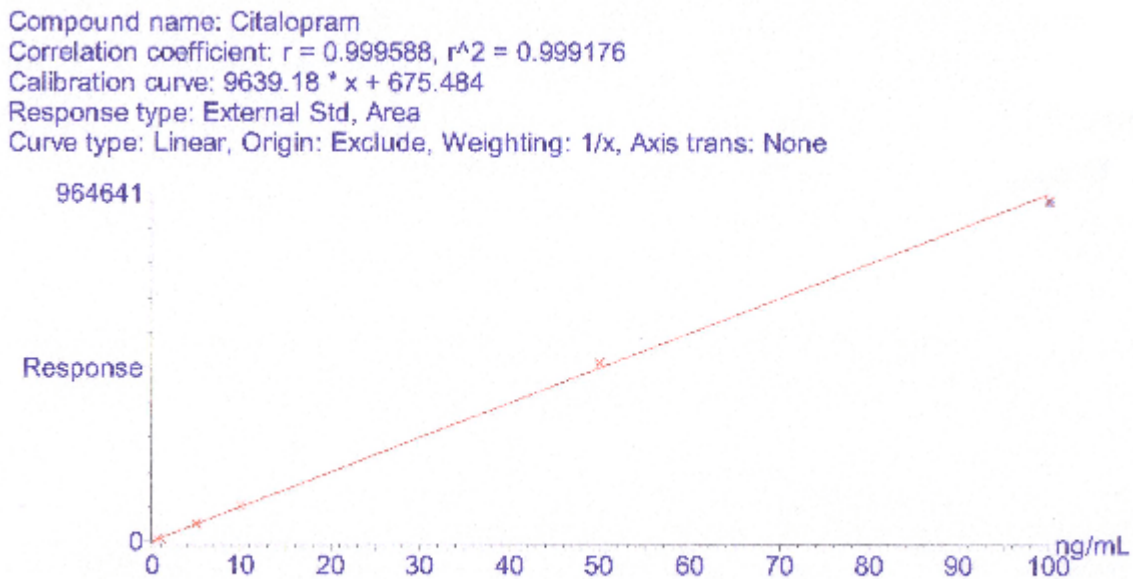
La dernière étape est la préparation de l'échantillon. Dans le cas des fluides biologiques (essentiellement sang et urines), il s'agit très souvent d'une déprotéinisation par l'acétonitrile suivie d'une centrifugation. Le surnageant est ensuite analysé.

Dans l'échantillon natif, avant le traitement chimique, est ajouté un standard interne en quantité connue. Celui-ci a un rôle de contrôle au niveau de l'extraction, de l'injection HPLC et de la variabilité de l'ionisation. Son utilisation assure une bonne reproductibilité des résultats. En effet, quand on trace la courbe d'étalonnage dans une matrice complexe, il arrive pour les faibles concentrations (premier tiers de la courbe) que deux valeurs différentes donnent presque les mêmes signaux.

Le standard interne idéal est un isotope de la molécule à doser car son rendement d'extraction est le même, son ionisation ESI similaire et son temps de rétention chromatographique identique. A défaut, le standard interne choisi doit toujours être co-élué avec la molécule à doser.

La courbe d'étalonnage réalisée, l'analyse quantitative peut être lancée.

Courbe d'étalonnage citalopram (document WATERS)



Standard curve for citalopram extracted from human plasma

CHAPITRE 3

ETUDE DE MARCHE ET EVALUATION DES ENJEUX FINANCIERS

I. INTRODUCTION

L'étude de marché est une étape importante dans la construction d'un projet d'acquisition.

Elle consiste en une revue des fournisseurs et donc des différentes techniques et appareils existants.

Elle permet de confronter les disponibilités du marché avec la liste établie des besoins. Il est alors possible de définir des pré choix de matériel en fonction des premières adéquations entre les appareils proposés et les orientations analytiques souhaitées. Mais l'étude de marché peut aussi « faire naître » de nouveaux besoins ; ceux-ci portent les noms de MS/MS et MSⁿ, résolution voire haute résolution, sensibilité et rapidité d'analyse.

Dans cette partie, nous présenterons en premier lieu les principaux fournisseurs dans le domaine de la spectrométrie de masse puis nous décrirons les appareils proposés en parallèle des « spécifications générales et techniques » concernant le spectromètre de masse, exposées dans le CCTP, **CF Annexe 1**. Nous parlerons ensuite de nos échanges avec différents utilisateurs et nous concluons ce chapitre sur des aspects économiques.

II. LES PRINCIPAUX FOURNISSEURS

1. Le groupe APPLERA

APPLERA est une multinationale qui regroupe les sociétés Applied Biosystems, Celera Genomics, Celera Diagnostics et Sciex.

⇒ Applied Biosystems développe et commercialise des techniques englobant le matériel, les réactifs et les logiciels, dans les domaines variés de la génomique, de la protéomique, de la biologie moléculaire et plus généralement des applications dans les sciences de la vie (santé, chimie, environnement, agro-alimentaire...).

⇒ Celera Genomics est spécialisé dans la recherche sur le séquençage du génome humain.

⇒ Celera Diagnostics développe et commercialise des tests diagnostiques dans le domaine de la génétique.

⇒ Sciex est un fabricant canadien de spectromètres de masse.

2. Le groupe WATERS

Le société américaine WATERS est fondée en 1958 par James Waters. Pendant 30 ans, elle se spécialise dans la recherche et le développement industriel de la Chromatographie liquide haute performance. Très vite, elle devient l'acteur principal du marché de l'HPLC et en 1973, la société Waters devient un groupe multinational.

Dans les années 1970, WATERS contribue aux avancées dans le domaine du traitement pré analytique des échantillons et dans les années 1980, ses activités analytiques se diversifient avec la mise au point de détecteurs chromatographiques et d'un système d'électrophorèse capillaire pour analyse ionique. En 1996, WATERS commercialise le système d'HPLC AllianceTM, son fleuron actuel de technologie HPLC, alliant à la fois de nouvelles normes de performances en termes de sensibilité, fiabilité des résultats (une sensibilité, une reproductibilité accrues) et facilité d'emploi.

Chapitre 3. Etude de marché et évaluation des enjeux financiers

En 1997, WATERS fusionne avec YMC, fabricant de produits chimiques et consommables pour la chromatographie et Micromass Limited. Cette dernière acquisition intervient alors que la technique analytique de masse couplée à l'HPLC est en plein essor, notamment auprès des laboratoires cliniques et pharmaceutiques. Waters peut ainsi développer une gamme étendue d'appareils LC/MS de paillasse.

3. Le groupe THERMO FINNIGAN

THERMO FINNIGAN est une filiale du groupe mondial THERMO ELECTRON. THERMO FINNIGAN conçoit, fabrique et distribue des spectromètres de masse, des équipements de chromatographie en phase liquide, en phase gazeuse et des solutions de couplage par ces techniques (GC/MS & LC/MS). Cette société est la seule à intégrer tous les principes physiques de la spectrométrie de masse (filtres quadripolaires, trappes d'ions, ensembles magnétiques électrostatiques, FT/MS, temps de vol et appareillages hybrides). Cette gamme est complétée par toute une ligne d'instrumentation pour l'analyse isotopique des gaz, des liquides ainsi que des solides (TIMS, ICP/MS haute résolution). THERMO FINNIGAN développe enfin une ligne de consommables pour la chromatographie (colonnes HPLC Hypersil-Keystone), des solutions en analyse élémentaire et microstructure.

TABLEAU DES REFERENCES FOURNISSEURS			
Groupe	THERMO FINNIGAN	APPLERA	WATERS
Siège France	Thermo Electron France Les Mimosas 16, Av. du Québec-SILIC 765 91963 Courtaboeuf Cedex	25, Avenue de la Baltique BP 96 91943 Courtaboeuf Cedex	BP 608 78056 Saint Quentin en Yvelines Cedex
Interlocuteurs	Jean-Luc SEGALEN José FERREIRA	Pierrick DANIEL	Karim AMOURA Etienne MAOUT
Coordonnées	J. FERREIRA Tel : 0160924875 Fax : 0160924829 J-L. SEGALEN Tel : 0299602343	Tel : 0169598586 Fax : 0169598890	K. AMOURA Tel : 0247557819 E. MAOUT Tel : 0299553810
	E-mails : ⇒WATERS, K. AMOURA, Karim_Amoura@waters.com ⇒WATERS, E. MAOUT, Etienne_Maout@waters.com ⇒APPLERA, P. DANIEL, Pierrick.Daniel@eur.appliedbiosystems.com ⇒THERMO FINNIGAN, J-L. SEGALEN, jeanluc.segalen@thermo.com ⇒THERMO FINNIGAN, Mr FERREIRA, jose.ferreira@thermo.com		

III. LES APPAREILS PROPOSES

1. Introduction

Les orientations analytiques du projet sont détaillées comme suit dans le CCTP, **CF Annexe 1** :

- ⇒ analyse quantitative et/ou qualitative de médicaments, composés toxiques ou stupéfiants dans les liquides biologiques (sang et urine),
- ⇒ dosages d'acides aminés sanguins, urinaires et d'acides organiques,
- ⇒ développement de nouvelles méthodes de dosage ou de diagnostic dans les domaines, du suivi thérapeutique médicamenteux ou de la toxicologie clinique et médico-légale.

A court terme, les objectifs fixés à la LC/MS/MS sont les dosages du sirolimus, tacrolimus, benzodiazépines et acides aminés.

Les appareils proposés par les fournisseurs répondent, en théorie, à de telles applications. Les essais techniques traités au Chapitre 4 permettront de s'assurer réellement de l'adéquation technologie/applications.

Nous présenterons ici les spécifications et performances « catalogue » de ces appareils.

Notons d'emblée qu'initialement le débat concernait le choix de la technologie de l'analyseur, triple quadripôle, trappe d'ions ou analyseur combiné. En fait, il n'y a pas d'analyseur universel. Chaque type offre des potentialités propres.

Avec l'avancée du projet, les propositions initiales de chaque fournisseur ont été modifiées. Cependant, les changements les plus significatifs portent surtout sur les enjeux financiers du dossier. En effet, si les sociétés WATERS et APPLERA ont poursuivi sur les mêmes propositions avec une baisse de leur devis, la société THERMO FINNIGAN qui était la seule à proposer une LC/MS/MS à analyseur trappe d'ions s'est finalement rétractée pour un appareil de type analyseur triple quadripôle. Les arguments invoqués de ce revirement sont -selon THERMO FINNIGAN- analytiques, mais cette nouvelle offre s'avère concomitante à la très forte baisse du prix de vente (153 000 € !) du triple quadripôle par le siège américain de THERMO FINNIGAN.

2. Le groupe APPLERA

① Description générale

APPLERA propose un appareil : le **Q TRAP™ LC/MS/MS System**.

Photo du spectromètre de masse Q TRAP™ couplé à une chaîne HPLC



⇒ **Scan des molécules multi-chargées :**

En fonction de la taille de la molécule, les procédures d'ionisation vont générer soit des ions monochargés, soit, des ions multichargés. Il est possible au niveau de la trappe d'ion linéaire de commander à l'analyseur de ne conserver que les espèces multichargés et d'éliminer les mono-chargés, permettant ainsi de « clarifier » le spectre obtenu, car débarrassé des ions « parasites » monochargés.

⇒ **Scan en mode MS3 :**

Selon la taille des fragments obtenus en MS/MS (ou MS2), il est possible de les capter dans la trappe d'ion linéaire afin de les refragmenter et passer ainsi à un stade MS3, plus particulièrement pour des analyses qualitatives ou des informations structurales. Cependant, en fonction des fragments observés, il est possible sur le Q TRAP d'observer ces spectres dès le stade MS2 à l'aide du mode EPI.

Des fonctions du logiciel vont permettre sur le Q TRAP de combiner au sein d'une même méthode et donc d'une même analyse ces différents modes de scans selon le besoin de l'opérateur.

⇒ **Le logiciel I.D.A., Acquisition d'Informations Dépendantes.**

Cette application permet d'enchaîner des expérimentations selon des listes d'exclusion et/ou d'inclusion programmées par l'utilisateur. En effet, il est possible de renseigner l'analyseur sur les molécules que l'on souhaite étudier et ne procéder qu'à certains modes de scans sur ces molécules. Il est aussi possible, a contrario, d'éliminer des molécules sur lesquelles l'opérateur ne souhaite pas qu'un spectre MS/MS soit établi. Il est également possible de lui imposer alors de ne pas scanner sur des périodes de temps déterminées, selon les temps de rétention.

② Spécifications

Voir tableau page suivante.

Chapitre 3. Etude de marché et évaluation des enjeux financiers

Caractéristiques techniques	CCTP	Q TRAP™
Gamme de masse	50 à 1500 UMA	Mode triple quadripôle: 5 à 1700 UMA Mode trappe d'ions linéaire: 50 à 1700 UMA
Sources d'ions	Deux interfaces inter-changeables, ESI+APCI. Nettoyage sans rompre le vide	ESI (technologie ion spray) et APCI ; nettoyage sans rompre le vide
Analyseurs	Critère non discriminant	Analyseur combiné triple quadripôle et trappe d'ions linéaire
Détecteur	Critère non discriminant	Photomultiplicateur Détection en mode + et – (1)
Couplage	Système de pompage HPLC : -gradient quaternaire à débits de 50 µL/mn aux mL/mn -dégazage de solvants en ligne -injection automatique à volume variable 0,1 à 500 µL, dilution possible des échantillons en atmosphère réfrigérée -four à colonne avec switch	Compatible HPLC AGILENT
Dimensions et poids	Critère non discriminant	Largeur : 105 centimètres Hauteur : 62 cm Profondeur : 50 cm Poids : 111 kilogrammes
Utilisateur	Technicien bon niveau HPLC	Technicien tous niveaux
Formation	2 biologistes et 3 techniciens au minimum Formation : -aux manipulations, au logiciel, à l'exploitation des données -à la maintenance -à la résolution des pannes simples	-Formation de base sur matériel et logiciel lors de l'installation -Stage de formation chez fournisseur 3 jrs pour 2 personnes -Session de 2 jrs pour 4 personnes sur site
Mode de fonctionnement	Critère non discriminant	Full Scan Sensibilité → Screening MS ³ → Analyse Structurale MRM Sensibilité → Quantification Perte de neutre → Analyse AA Scan Ion Précurseur → Analyse AA + Nouveaux types de Scan (2)

(1) : le détecteur opère en mode positif ou négatif.

(2) : nouveaux types de scans détaillés dans ① Description générale.

3. Le groupe WATERS

① Description générale

WATERS présente le **QUATTRO MICRO™**. C'est un spectromètre de masse triple quadripôle compact, de paillasse, qui n'existe qu'en version API LC/MS/MS.



Photo du spectromètre de masse QUATTRO MICRO™ couplé à une chaîne HPLC

Chapitre 3. Etude de marché et évaluation des enjeux financiers

② Spécifications

Caractéristiques techniques	CCTP	QUATTRO MICRO™
Gamme de masse	50 à 1500 UMA	2 à 2000 UMA
Sources d'ions	Deux interfaces interchangeables, ESI et APCI. Nettoyage sans rompre le vide	ESI (technologie Z SPRAY) et APCI ; Nettoyage sans rompre le vide
Analyseurs	Non précisé	Double analyseurs quadripolaires dits analyseur triple quadripôle
Détecteur	Non précisé	Photomultiplicateur Détection en mode + et –
Couplage	Système de pompage HPLC : -gradient quaternaire à débits de 50 µL/mn aux mL/mn -dégazage de solvants en ligne -injection automatique à volume variable 0,1 à 500 µL, dilution possible des échantillons en atmosphère réfrigérée -four à colonne avec switch	Compatible HPLC ALLIANCE WATERS
Dimensions et poids	Non précisé	Largeur :88 centimètres Hauteur :58 cm Profondeur :39 cm Poids : 115 kilogrammes
Utilisateur	Technicien bon niveau HPLC	Technicien tous niveaux
Formation	2 biologistes et 3 techniciens au minimum Formation : -aux manipulations, au logiciel, à l'exploitation des données -à la maintenance -à la résolution des pannes simples	-Formation sur site à l'installation -Stage d'initiation et de perfectionnement LC/MS/MS de 3 jours chez fournisseur, bon niveau HPLC recommandé.
Mode de fonctionnement	Non précisé	Tandem dans l'espace SURTOUT : MRM Sensibilité→ Quantification Perte de Neutre et Scan Ion Précurseur → Analyse AA MAIS AUSSI: Full Scan →Screening

4. Le groupe THERMO FINNIGAN

① Description générale

Au début du projet, THERMO FINNIGAN proposait un spectromètre de masse à analyseur temporel ou trappe d'ions de nom commercial **LCQ DECA XP™**. Cet appareil était présenté comme idéal par rapport à ses concurrents étant données ses qualités quasi similaires sur la précision et la reproductibilité avec l'atout majeur de sa grande sensibilité.

A la demande de devis par le CHU de Nantes, THERMO FINNIGAN répond que le **LCQ DECA XP™** n'est en fait pas l'appareil le mieux adapté aux applications pré définies notamment pour le sirolimus et ne peut pas satisfaire aux dosages rapides de routine. Il propose donc de substituer un appareil à analyseur triple quadripôle appelé **TSQ QUANTUM Discovery™** au **LCQ DECA XP™**.

A partir de ce moment, il n'y a donc plus de technologie trappe d'ions.



Photo du spectromètre de masse TSQ QUANTUM Discovery™ couplé à une chaîne HPLC

② Spécifications

Chapitre 3. Etude de marché et évaluation des enjeux financiers

Caractéristiques techniques	CCTP	TSQ QUANTUM Discovery™
Gamme de masse	50 à 1500 UMA	30 à 1500 UMA
Sources d'ions	Deux interfaces interchangeable, ESI et APCI. Nettoyage sans rompre le vide	ESI et APCI Nettoyage sans rompre le vide
Analyseurs	Non précisé	Triple quadripôle
Détecteur	Non précisé	Multiplicateur d'électrons Détection en mode + et -
Couplage	Système de pompage HPLC : -gradient quaternaire à débits de 50 µL/mn aux mL/mn -dégazage de solvants en ligne -injection automatique à volume variable 0,1 à 500 µL, dilution possible des échantillons en atmosphère réfrigérée -four à colonne avec switch	Compatible HPLC SURVEYOR, FINNIGAN
Dimensions et poids	Non précisé	Largeur :55 centimètres Hauteur :56 cm Profondeur :79 cm Poids :120 kilogrammes
Utilisateur	Technicien bon niveau HPLC	Technicien tous niveaux
Formation	2 biologistes et 3 techniciens au minimum Formation : -aux manipulations, au logiciel, à l'exploitation des données -à la maintenance -à la résolution des pannes simples	2 jours à l'installation en français et 4 jours et demi pour une personne en anglais sur site extérieur Formation complémentaire sur site en français négociable
Mode de fonctionnement	Non précisé	Tandem dans l'espace SURTOUT : MRM Sensibilité→ Quantification Perte de Neutre et Scan Ion Précurseur → Analyse AA MAIS AUSSI: Full Scan →Screening

IV. RENCONTRES UTILISATEURS

Dès le début de notre travail, nous avons rencontré et échangé avec des utilisateurs confirmés de matériel HPLC/MS. Ces prises de contact nous ont permis de nous familiariser avec les différents appareils du marché et de répertorier des informations d'utilité sur les choix techniques des uns et des autres en fonction de leurs applications ainsi que leurs commentaires sur des aspects aussi divers que la maintenance, la pratique au quotidien, les nouveaux projets d'acquisition etc.....

Nous avons résumé ces discussions sous la forme d'un tableau.

Chapitre 3. Etude de marché et évaluation des enjeux financiers

Utilisateur	Appareil/ Fournisseur	Année de l'achat	Caractéristiques techniques	Applications	Commentaires (maintenance, SAV, facilité d'utilisation...)
IFREMER	API 2000™ APPLERA	2002	LC/MS/MS Analyseur triple quadripôle	⇒ Dosage de toxines marines dans diverses coquillages	⇒ Totale satisfaction quant aux applications ⇒ grandes précision, sélectivité, spécificité
Mutualisation IFREMER/ Centre SMAB	LCQ™ THERMO FINNIGAN	1997	LC/MS ⁿ Analyseur trappe d'ions	⇒ Recherche et dosage de toxines dans des milieux complexes/ ⇒ Recherche fondamentale sur des échantillons marins sales	⇒ Mutualisation délicate car les applications et les utilisateurs sont différents ⇒ Contrat de maintenance minimum en 2003 (1 visite par an) ⇒ Totale satisfaction quant aux applications
INSERM U 539	Esquire~LC™/ BRUKER-HP	1996/7	LC/MS ⁿ Analyseur trappe d'ions	⇒ Identification structurale dans des milieux organiques très sales ⇒ Recherche en chimie ⇒ Mise au point de dosages (cholestérol et acides biliaires)	⇒ Mutualisation avec d'autres unités de recherche ⇒ Problème de maintenance non régulière entraînant encrassement et dysfonctionnement de la machine (surtout en fonction couplage)
CHU ANGERS	API 300 APPLERA	1996	LC/MS/MS Analyseur triple quadripôle	Stupéfiants Toxicologie Immunosuppresseurs Sirolimus : 2 jours par semaine Protocole de préparation des échantillons long 1H30, run échantillon 5 mns	Appareil robuste Maintenance préventive Mutualisation possible si référent Runs rapides, travail à faire sur la préparation des échantillons Nouveau projet d'acquisition pour pharmacocinétique, métabolites, médicaments
IDAC	QUANTUM Discovery™ THERMO FINNIGAN	2003	LC/MS/MS Analyseur triple quadripôle	Dosage de toxiques dans l'environnement (eaux, air...)	Absence de données

V. EVALUATION DES ENJEUX FINANCIERS DU PROJET LC/MS/MS

1. Premiers devis « prix marché » du projet LC/MS/MS

Chapitre 3. Etude de marché et évaluation des enjeux financiers

Ces devis ont été établis par les fournisseurs sur les données des « spécifications générales et techniques de l'équipement » du CCTP, **CF ANNEXE 1**.

Fournisseur et équipement	APPLERA Q TRAP™	WATERS QUATTRO MICRO™	THERMO FINNIGAN TSQ QUANTUM Discovery™
Ensemble du système LC/MS/MS	269 100,00 € TTC incluant : - Q TRAP de démonstration -1 an de garantie -chaîne HPLC -station de travail informatique -système de gestion des gaz -formation, 2 jours sur site pour 4 personnes	262 853,52 € TTC incluant : -QUATTRO MICRO neuf -1 an de garantie -chaîne HPLC -station de travail informatique -système de gestion des gaz -formation sur site lors de l'installation	287 678,66 € TTC Incluant : -TSQ Quantum DISCOVERY neuf - 1 an de garantie - chaîne HPLC -station de travail informatique -système de gestion des gaz -formation sur site et dans un centre européen
Contrat de maintenance « tous risques »	27 448,00 € TTC "Bioassurance Plus" -pièces -main d'oeuvre -déplacements -visite préventive annuelle	21 707,40 € TTC	27 424,28 € TTC -main d'œuvre -pièces -visite préventive annuelle -déplacement en 48H
Options	10 000,00 € TTC incluant : -logiciel d'application AA -formation spécifique sur site à cette application	44 865,00 € TTC incluant : -3 logiciels, chimie combinatoire, synthèse organique, recherche, quantification poussée -formation 3 jrs chez fournisseur à LC/MS/MS	Pas d'options : - Formation spécifique incluse dans le pack - logiciels d'application compris dans le logiciel d'exploitation

2. Etude comparative des coûts entre l'analyse biologique courante du tacrolimus, sirolimus, profil d'acides aminés et ciclosporine et leur analyse par LC/MS/MS.

Chapitre 3. Etude de marché et évaluation des enjeux financiers

La cyclosporine, nous l'avons dit, est actuellement dosée de manière satisfaisante par un automate d'EIA au laboratoire de radio-immunologie. Cependant, elle est introduite dans cette étude de coûts car son dosage est susceptible d'être transféré, à terme, en LC/MS/MS pour des raisons techniques et financières. Nous considérerons donc des coûts annuels n'incluant pas puis incluant le dosage de la cyclosporine.

Le coût personnel n'est pas pris en compte car on raisonne à personnel constant. De même, on négligera les coûts fixes de structure.

Les coûts réactifs et consommables LC/MS/MS sont basés sur des études de coûts effectuées et communiquées par la société WATERS.

Nous avons arrondi à 0,3 € le test pour les tacrolimus, sirolimus et cyclosporine et à 0,5 € le test Acides Aminés.

Les calculs prennent en compte pour le tacrolimus et les acides aminés le nombre de tests réalisés au cours de l'année 2002. La prescription récente du sirolimus en général en alternative à la prescription de cyclosporine nous a amenés à considérer le nombre extrapolé de tests sur l'année 2003 pour ces deux molécules.

Tableau 1 : Coûts des analyses selon les méthodes de dosage actuelles

Budget	Sur une année
Tacrolimus MEIA :EnzymoImmunoAnalyse Microparticulaire (Automate IMx, Tacrolimus II, Abbott) Année 2002, 6082 tests	50 618,91 €
Sirolimus Labo. Pasteur Cerba (LC/MS°) Paris Extrapolation année 2003, 464 tests Test à l'unité 54 €	25 056,00 €
Profil Acides Aminés Hôpital Necker (Analyseur AA) à Paris et Hôpital Debrousse à Lyon Année 2002, 97 tests Test à l'unité 135 €	13 095,00 €
Coûts annuels	88 769,91 €
Ciclosporine EIA Extrapolation année 2003, 9380 tests Coûts annuels	53 190,00 €
	141 959,91€

Tableau 2 : Coûts de l'analyse LC/MS APPLERA (Q TRAP™) sans la cyclosporine

Projet MASSE / MASSE

Chapitre 3. Etude de marché et évaluation des enjeux financiers

Budget	Année 1	Année 2	Année 3	Année 4	Année 5
Réactifs + Consommables	2012,30 €	2012,30 €	2012,30 €	2012,30 €	2012,30 €
Tacrolimus (0,3 €/test)	1824,60 €	1824,60 €	1824,60 €	1824,60 €	1824,60 €
Sirolimus (0,3 €/test)	139,20 €	139,20 €	139,20 €	139,20 €	139,20 €
Profil AA (0,5 €/test)	48,50 €	48,50 €	48,50 €	48,50 €	48,50 €
Maintenance	21 958,40 €	21 958,40 €	21 958,40 €	21 958,40 €	21 958,40 €
Intégrant une année de garantie (prix annuel X 4 / 5)					
Amortissement	53 820,00 €	53 820,00 €	53 820,00 €	53 820,00 €	53 820,00 €
(Prix d'achat / 5 ans) DEMONSTRATION					
Total exploitation € TTC	77 790,70 €	77 790,70 €	77 790,70 €	77 790,70 €	77 790,70 €
Δ :économie/an	10 979,21 €	10 979,21 €	10 979,21 €	10 979,21 €	10 979,21 €

Tableau 3 : Coûts de l'analyse LC/MS APPLERA (Q TRAP™) avec la ciclosporine

Projet MASSE / MASSE

Budget	Année 1	Année 2	Année 3	Année 4	Année 5
Réactifs + Consommables	4826,30 €	4826,30 €	4826,30 €	4826,30 €	4826,30 €
Tacrolimus (0,3 €/test)	1824,60 €	1824,60 €	1824,60 €	1824,60 €	1824,60 €
Sirolimus (0,3 €/test)	139,20 €	139,20 €	139,20 €	139,20 €	139,20 €
Profil AA (0,5 €/test)	48,50 €	48,50 €	48,50 €	48,50 €	48,50 €
Ciclosporine (0,3 €/test)	2814,00 €	2814,00 €	2814,00 €	2814,00 €	2814,00 €
Maintenance	21 958,40 €	21 958,40 €	21 958,40 €	21 958,40 €	21 958,40 €
Intégrant une année de garantie (prix annuel X 4 / 5)					
Amortissement	53 820,00 €	53 820,00 €	53 820,00 €	53 820,00 €	53 820,00 €
(Prix d'achat / 5 ans) DEMONSTRATION					
Total exploitation € TTC	80 604,70 €	80 604,70 €	80 604,70 €	80 604,70 €	80 604,70 €
Δ :économie/an	61 355,21 €	61 355,21 €	61 355,21 €	61 355,21 €	61 355,21 €

Tableau 4 : Coûts de l'analyse LC/MS/MS WATERS (QUATTRO MICRO API™) sans la ciclosporine

Projet MASSE / MASSE

Budget	Année 1	Année 2	Année 3	Année 4	Année 5
Réactifs + Consommables	2012,30 €	2012,30 €	2012,30 €	2012,30 €	2012,30 €
Tacrolimus (0,3 €/test)	1824,60 €	1824,60 €	1824,60 €	1824,60 €	1824,60 €
Sirolimus (0,3 €/test)	139,20 €	139,20 €	139,20 €	139,20 €	139,20 €
Profil AA (0,5 €/test)	48,50 €	48,50 €	48,50 €	48,50 €	48,50 €
Maintenance	17 365,92 €	17 365,92 €	17 365,92 €	17 365,92 €	17 365,92 €
Intégrant une année de garantie (prix annuel X 4 / 5)					
Amortissement	52 570,70 €	52 570,70 €	52 570,70 €	52 570,70 €	52 570,70 €
(Prix d'achat / 5 ans) NEUF					
Total exploitation € TTC	71 948,92 €	71 948,92 €	71 948,92 €	71 948,92 €	71 948,92 €
Δ :économie/an	16 820,99 €	16 820,99 €	16 820,99 €	16 820,99 €	16 820,99 €

Tableau 5 : Coûts de l'analyse LC/MS/MS WATERS (QUATTRO MICRO API™) avec la ciclosporine

Projet MASSE / MASSE

Budget	Année 1	Année 2	Année 3	Année 4	Année 5
Réactifs + Consommables	4826,30 €	4826,30 €	4826,30 €	4826,30 €	4826,30 €
Tacrolimus (0,3 €/test)	1824,60 €	1824,60 €	1824,60 €	1824,60 €	1824,60 €
Sirolimus (0,3 €/test)	139,20 €	139,20 €	139,20 €	139,20 €	139,20 €
Profil AA (0,5 €/test)	48,50 €	48,50 €	48,50 €	48,50 €	48,50 €
Ciclosporine (0,3 €/test)	2814,00 €	2814,00 €	2814,00 €	2814,00 €	2814,00 €
Maintenance	17 365,92 €	17 365,92 €	17 365,92 €	17 365,92 €	17 365,92 €
Intégrant une année de garantie (prix annuel X 4 / 5)					
Amortissement	52 570,70 €	52 570,70 €	52 570,70 €	52 570,70 €	52 570,70 €
(Prix d'achat / 5 ans) NEUF					
Total exploitation € TTC	74 762,92 €	74 762,92 €	74 762,92 €	74 762,92 €	74 762,92 €
Δ :économie/an	67 196,99 €	67 196,99 €	67 196,99 €	67 196,99 €	67 196,99 €

Tableau 6 : Coûts de l'analyse LC/MS THERMO FINNIGAN (TSQ QUANTUM discovery™) sans la ciclosporine

Projet MASSE / MASSE

Budget	Année 1	Année 2	Année 3	Année 4	Année 5
Réactifs + Consommables	2012,30 €	2012,30 €	2012,30 €	2012,30 €	2012,30 €
Tacrolimus (0,3 €/test)	1824,60 €	1824,60 €	1824,60 €	1824,60 €	1824,60 €
Sirolimus (0,3 €/test)	139,20 €	139,20 €	139,20 €	139,20 €	139,20 €
Profil AA (0,5 €/test)	48,50 €	48,50 €	48,50 €	48,50 €	48,50 €
Maintenance	27 424,28 €	27 424,28 €	27 424,28 €	27 424,28 €	27 424,28 €
Intégrant une année de garantie (prix annuel X 4 / 5)					
Amortissement	57 535,73 €	57 535,73 €	57 535,73 €	57 535,73 €	57 535,73 €
(Prix d'achat / 5 ans) NEUF					
Total exploitation € TTC	86 972,31 €	86 972,31 €	86 972,31 €	86 972,31 €	86 972,31 €
Δ :économie/an	1797,60 €	1797,60 €	1797,60 €	1797,60 €	1797,60 €

Tableau 7 : Coûts de l'analyse LC/MS THERMO FINNIGAN (TSQ QUANTUM discovery™) sans la ciclosporine

Projet MASSE / MASSE

Budget	Année 1	Année 2	Année 3	Année 4	Année 5
Réactifs + Consommables	4826,30 €	4826,30 €	4826,30 €	4826,30 €	4826,30 €
Tacrolimus (0,3 €/test)	1824,60 €	1824,60 €	1824,60 €	1824,60 €	1824,60 €
Sirolimus (0,3 €/test)	139,20 €	139,20 €	139,20 €	139,20 €	139,20 €
Profil AA (0,5 €/test)	48,50 €	48,50 €	48,50 €	48,50 €	48,50 €
Ciclosporine (0,3 €/test)	2814,00 €	2814,00 €	2814,00 €	2814,00 €	2814,00 €
Maintenance	27 424,28 €	27 424,28 €	27 424,28 €	27 424,28 €	27 424,28 €
Intégrant une année de garantie (prix annuel X 4 / 5)					
Amortissement	57 535,73 €	57 535,73 €	57 535,73 €	57 535,73 €	57 535,73 €
(Prix d'achat / 5 ans) NEUF					
Total exploitation € TTC	89 786,31 €	89 786,31 €	89 786,31 €	89 786,31 €	89 786,31 €
Δ :économie/an	52 173,60 €	52 173,60 €	52 173,60 €	52 173,60 €	52 173,60 €

Les résultats obtenus montrent que l'acquisition d'une LC/MS/MS, et ce, quel que soit le fournisseur, est rentabilisée pour les quatre seuls dosages considérés.

VI. CONCLUSIONS

L'étude de marché nous a permis de rencontrer les fournisseurs de HPLC/MS/MS, de répertorier les différents appareils du marché et leurs potentialités, de prendre connaissance de l'expérience d'utilisateurs confirmés, de chiffrer l'investissement selon les différents appareils proposés par les fournisseurs, d'évaluer les enjeux financiers et enfin d'arrêter des dates pour les essais techniques.

CHAPITRE 4

ESSAIS TECHNIQUES

I. INTRODUCTION

Le Cahier des Clauses Techniques Particulières, **CF Annexe 1**, définit les orientations analytiques du projet de manière très large dans les domaines de la pharmacologie, toxicologie et biochimie.

Cependant, les dosages du sirolimus, du tacrolimus, des acides aminés et des benzodiazépines sont les applications prioritaires, motivant le projet même d'acquisition d'une LC/MS/MS. C'est pourquoi, les essais techniques seront centrés sur les performances des appareils concernant ces analyses.

Dans un premier temps, nous évoquerons les techniques actuelles de dosage de ces molécules ainsi que leurs limites et/ou inconvénients à l'origine de la nouvelle orientation analytique de type LC/MS/MS. Puis, nous présenterons les qualités générales selon lesquelles sont appréciés les essais techniques. Enfin, nous traiterons de la réalisation pratique de ces essais.

II. DOSAGES ACTUELS DES PARAMETRES RETENUS

1. Le sirolimus

Le dosage du sirolimus est traité en externe par le Laboratoire Pasteur Cerba à Paris. La technique utilisée pour le dosage est la spectrométrie de masse couplée à une chaîne de chromatographie liquide haute performance (LC/MS).

Les résultats sont faxés au mieux, le lendemain de la réception des échantillons.

2. Le tacrolimus

Le dosage du tacrolimus est réalisé par le laboratoire de pharmacologie/toxicologie du CHU de Nantes. Le réactif tacrolimus des laboratoires Abbott est un dosage immunoenzymatique de type microparticulaire utilisant l'automate d'immunoanalyse IMx Abbott (technique ELISA).

3. Les benzodiazépines

Le dosage des benzodiazépines est réalisé par le laboratoire de pharmacologie/toxicologie du CHU de Nantes. La technique utilisée dépend de plusieurs facteurs. En effet, il faut considérer la nature de(s) benzodiazépine(s) à doser mais aussi le contexte de la demande (toxicologie clinique, toxicologie médico-légale..).

Les principales techniques sont immunologiques et chromatographiques (chromatographie gazeuse couplée à la spectrométrie de masse et HPLC couplée à un détecteur UV à barrettes de diodes).

4. Les Acides Aminés

Le dosage des acides aminés dans le sang, les urines ou le liquide céphalorachidien est traité en externe par l'Hôpital NECKER à Paris. La technique utilisée pour le dosage de l'ensemble des acides aminés des liquides biologiques est la chromatographie d'échange d'ions. Elle est couplée à une détection colorimétrique à

Chapitre 4. Essais techniques

deux longueurs d'onde (570 et 440 nm) après réaction avec la ninhydrine. C'est la technique de référence.

A l'exception de la préparation du prélèvement, cette technique de chromatographie est totalement automatisée. L'automate utilisé est le BECKMAN 6300™.

Actuellement, sauf urgence vitale, les premiers résultats des analyses sont rendus en une semaine et le dossier clos est envoyé sous quinze jours.

5. Limites des techniques actuelles et solutions alternatives apportées par la LC/MS/MS

Les principaux inconvénients des dosages actuels des paramètres retenus sont exposés dans le tableau qui suit. Nous avons essayé de mettre en vis-à-vis des inconvénients les solutions apportées par la LC/MS/MS.

Molécules à doser	Inconvénients du dosage actuel	Solutions LC/MS/MS
Tacrolimus	MEIA(MicroparticuleEnzymo ImmunoAnalyse) Automate IMx, Tacrolimus II, Abbott ⇒manque de spécificité, réactions croisées avec les métabolites du tacrolimus, le ratio nombre de dosages sur résultats rendus est mauvais le dosage est imprécis et peu fiable ⇒sensibilité à 1,5 ng/mL (données de 1997, Fujisawa) ⇒dosage onéreux	⇒spécificité élevée ⇒sensibilité à 1 ng/mL ⇒Séparation du tacrolimus de ses métabolites entraînant une baisse des concentrations de tacrolimus d'environ 15%
Sirolimus	Externalisation du dosage : LC/MS, Laboratoire Pasteur Cerba ⇒délai dans le rendu des résultats avec problème majeur d'exploitation	⇒dosage en interne: résultat rapide ⇒sensibilité à 0,2 ng/mL ⇒spécificité augmentée par MS/MS

Molécules à doser	Inconvénients du dosage actuel	Solutions LC/MS/MS
Benzodiazépines	HPLC/détecteur à barrettes de diode Manque de spécificité, temps de rétention et spectres parfois similaires comme le clorzépatate et le nordiazepam Manque de sensibilité	⇒ spécificité élevée ⇒ sensibilité élevée
Acides Aminés	Analyseur BECKMAN 6300™, Necker Paris/Debrousse Lyon : ⇒ rendu des résultats long car dépend du temps de transport, du temps d'analyse et de la complexité de l'interprétation ⇒ utilisation de nombreux réactifs requérant une grande pureté pour éliminer les risques de contamination	⇒ dosage en interne donc rendu de résultats plus rapide ⇒ pas de problème de réactifs

III. LES QUALITES DES METHODES ET DES APPAREILS

Les essais techniques ont pour objectif de choisir l'appareil dont les performances satisfont au mieux les exigences correspondant aux applications prédéfinies.

Les qualités des appareils ne sont pas des notions absolues car seule une partie est quantifiable. Une part non négligeable reste subjective.

Les qualités recherchées sont exprimées dans le Cahier des Clauses Techniques Particulières, **CF Annexe 1**.

On distingue les qualités mesurables comme la répétabilité, la reproductibilité, etc... d'autres aspects comme la praticabilité, etc... qui sont appréciées par des enquêtes plus ou moins régulières des fabricants auprès des biologistes. Les qualités les plus attendus par ceux-ci sont la fiabilité et les performances.

Si les critères de fiabilité et les performances peuvent être définis de manière objective, le dernier critère de praticabilité est beaucoup plus subjectif. La revue des éléments de ce critère n'est certainement pas exhaustive. Rares sont les méthodes et les appareils qui présentent simultanément toutes les qualités. La tendance actuelle est à l'uniformisation vers le haut de la qualité des méthodes et des appareils ; aussi, les critères extrascientifiques peuvent devenir prépondérants dans le choix des biologistes !

1. La fiabilité

C'est l'étude scientifique des qualités d'une méthode ou d'un appareil. Plusieurs critères complémentaires sont définis. On distingue les critères statistiques, opérationnels et fonctionnels.

Toutes les définitions qui suivent, notées entre guillemets sont extraites du Protocole de Validation de Techniques ou ValTec édité par la Société Française de Biologie Clinique (SFBC).

① Critères statistiques

Ils correspondent à la précision.

La précision est la « qualité de l'accord, dans une zone définie de valeurs à mesurer, entre des mesures répétées, effectuées sur un même échantillon, dans des conditions déterminées ». La précision est également appelée fidélité et n'a pas de valeur numérique. Elle correspond à l'étude de la répétabilité et de la reproductibilité.

La répétabilité se définit comme « l'expression quantitative de la précision lorsque le même opérateur applique la technique sur le même spécimen, dans le même laboratoire, avec les mêmes appareils et les mêmes réactifs au cours de la même série d'analyses ».

La reproductibilité est « l'expression quantitative de la précision lorsque la technique est réalisée dans diverses conditions qui doivent être définies. La reproductibilité intralaboratoire est calculée dans un même laboratoire, à partir des résultats des aliquotes d'un même spécimen, distribuées au hasard dans les séries d'analyse de spécimens de patients (reproductibilité intrasérielle), soit « dans la journée », soit « jour après jour », soit en fonction des séries pendant plusieurs jours consécutifs (reproductibilité intersérielle).

② Critères opérationnels

Ils correspondent à l'exactitude.

L'exactitude ou justesse d'une méthode représente la « qualité de l'accord entre l'estimation d'une quantité mesurable (valeur mesurée) et la meilleure estimée de la valeur vraie, en dehors des erreurs aléatoires ».

Elle est exprimée par les paramètres d'une droite de régression. Elle sert à apprécier les erreurs systématiques.

③ Critères fonctionnels

La sensibilité

La sensibilité d'une technique est le « rapport de la variation de signal mesuré par unité de concentration de l'analyte étudié ». Elle est exprimée par une concentration. Cette qualité est surtout importante dans la détermination de composés présents en très faibles quantités dans les échantillons.

La sensibilité en spectrométrie de masse est définie lorsque l'on parle d'analyse quantitative comme la quantité minimale décelable pour un composé mesuré qui donne un signal correspondant à 10 fois le bruit de fond. La sensibilité quantitative est également appelée limite de détection.

Chapitre 4. Essais techniques

Celle-ci dépend en bonne partie de l'abondance de l'espèce ionique mesurée. Plus l'espèce ionique mesurée est abondante par rapport à l'ensemble des ions issus de la molécule analysée, et plus la sensibilité de la détection sera élevée. Le but est donc de produire un signal aussi intense que possible. Plusieurs éléments permettent d'atteindre cet objectif comme par exemple la modification des conditions d'ionisation le passage en mode négatif, l'utilisation d'autres techniques d'ionisations plus douces, la dérivation de l'échantillon,....de manière à augmenter le nombre d'ions produits dans la source ou à diminuer leur fragmentation.

Un autre facteur influençant la sensibilité correspond à la durée d'intégration du signal. Il est évident que plus l'intégration du signal est longue et plus ce signal sera intense. Par ce facteur, le mode d'acquisition des données influence la sensibilité. Il existe trois modes d'acquisition : le balayage (scan), la détection d'ions sélectionnés (SIM), et la détection de réactions sélectionnées (SRM). Ces trois modes sont cités dans l'ordre croissant de leur effet sur la sensibilité.

La spécificité et sélectivité

La spécificité d'une méthode est sa capacité « à pouvoir déterminer sélectivement la concentration du ou des composants qu'elle est supposée mesurer ». On l'estime comme étant l'importance de l'erreur sur le résultat obtenu quand l'échantillon contient des impuretés, des produits de dégradation etc...On peut la calculer par la différence entre le résultat obtenu pour un échantillon sans produit interférent et un échantillon en contenant.

Le degré de spécificité de l'analyse quantitative par spectrométrie de masse dépend de la manière avec laquelle le spectromètre de masse est utilisé mais plus encore du signal utilisé lors de la corrélation. On peut par exemple utiliser comme signal le courant ionique total pour déterminer la concentration du composé étudié pour autant qu'il n'existe aucune interférence avec d'autres substances (en d'autres mots, que la substance analysée soit pure ou purifiée préalablement par la chromatographie).

En partant du fait que l'on connaît exactement la structure et le spectre de masse de la substance que l'on veut doser, on peut utiliser comme signal un ou plusieurs ions spécifiques de cette substance. Il est important de choisir ces ions parmi les ions ayant des valeurs de masses élevées (supérieures à 200 UMA si possible). En effet, la signification d'un signal est fonction de son abondance ionique et de sa masse. Il est logique de prévoir que les pics intenses correspondant aux masses élevées sont plus caractéristiques de la molécule que n'importe quel ion de faible masse.

Un autre critère de spécificité réside dans la correspondance du rapport des intensités de ces ions caractéristiques avec celui de leurs abondances respectives dans le spectre de masse de la substance pure. En effet, la probabilité de retrouver dans un mélange de deux composés possédant plusieurs masses caractéristiques identiques dans la région du spectre supérieur à 100 UMA devient quasi nulle (sauf si ces deux composés sont des isomères). Le recours à plusieurs ions caractéristiques est requis lorsque l'analyse quantitative des mélanges biologiques complexes comprenant de multiples molécules d'une même famille est entreprise.

La linéarité

Elle indique la zone de concentration dans laquelle le dosage est fiable. La linéarité est exprimée par une gamme de concentration.

2. Les performances

Les performances sont quantifiables, mais leur valeur est relative et doit s'apprécier par rapport aux besoins propres du laboratoire :

① Cadence analytique

C'est le nombre de dosages réalisables par heure. Il dépend de la durée unitaire de l'analyse, mais aussi des étapes parfois nécessaires entre deux analyses successives. Les essais techniques sont l'occasion de vérifier l'adéquation entre la cadence réelle et la cadence théorique annoncée par le fournisseur.

② Disponibilité

C'est le temps réellement consacré à l'analyse des échantillons des patients. On doit prendre en compte les délais de mise en route, les délais nécessaires aux étalonnages et contrôle, les durées et les fréquences des opérations de maintenance ainsi que les Mid Time Between Failure, MTBF qui correspondent au temps intermédiaire entre deux pannes.

③ Coût de l'analyse

Nous l'avons vu au Chapitre 1, ils incluent pour un résultat de patient, l'amortissement de l'appareil, la maintenance, le coût des réactifs pour l'échantillon patient mais aussi pour les étalonnages et la calibration. La rémunération du personnel et les frais fixes de structure sont négligés car le personnel est en nombre constant et les frais fixes sont faibles.

On calculera un coût de production par rapport au B, la lettre clé de biologie dont la valeur est fixée par la Caisse Nationale d'Assurance Maladie, CNAM en fonction des charges liées à l'examen et qui représente 0,27 euros.

Les performances permettent d'apprécier la productivité du système analytique.

3. La praticabilité

La praticabilité peut se définir comme l'aptitude d'une méthode ou d'un appareil à être réalisée pour l'une ou utilisé pour l'autre par un biologiste donné, dans un laboratoire donné et dans des conditions données. La praticabilité recouvre plusieurs notions que nous distinguerons en critères internes et critères externes.

① Critères internes

Critères propres au laboratoire :

⇒ Les conditions d'usages : pour la routine (grandes séries) comme le tacrolimus ou pour l'urgence (coup par coup) comme l'hyperammoniémie néonatale.

La facilité de l'insertion et de la programmation des analyses urgentes au sein des séries seront considérées.

Chapitre 4. Essais techniques

⇒ La complexité de mise en œuvre : nécessité de transformation du laboratoire ou intégration sans problème à l'existant.

⇒ La considération des surcoûts ou des économies générées par le nouveau système analytique : gain de temps, de personnel, économie de réactifs.

Critères propres à l'opérateur :

La nécessité de « tour de main » nouveau ; possibilité et facilité de la formation du personnel, qualité de sa compétence antérieure.

② Critères externes

Critères propres à la machine :

La sécurité (risque d'explosion ou d'incendie), adaptabilité ou souplesse vis-à-vis de développements ultérieurs des méthodes c'est-à-dire la flexibilité, la versatilité du système, possibilités de connexion informatique au système déjà existant, influence de l'ambiance (température, courant électrique, fluides...), etc.

Critères concernant l'entreprise fournissant le système analytique :

Par exemple, qualité et importance de la formation initiale souvent proposée avec l'appareil, qualité du service après vente pour la réparation des pannes ou la maintenance préventive (rapidité des interventions, qualification du personnel), conditions de garantie du système, etc.

IV. LES ESSAIS TECHNIQUES

Les essais techniques ont été réalisés sur des appareils répondant aux spécifications générales et techniques de l'équipement décrites dans le Cahier des Clauses Techniques Particulières, **CF Annexe 1** :

- ✓ CLHP assurant un gradient quaternaire avec des débits de 50 à 100 $\mu\text{L}/\text{min}$ à plusieurs mL/min ,
- ✓ système de dégazage de solvants en ligne,
- ✓ passeur d'échantillons= système d'injection automatique à volume variable de 0,1 à 500 μL avec possibilité de dilution des échantillons dans un environnement réfrigéré,
- ✓ four à colonne avec « switch »,
- ✓ spectromètre de masse complet couvrant une gamme de masse de 50 à 1500 UMA et équipé de deux sources interchangeables, Electrospray (ESI) et Ionisation Chimique à Pression Atmosphérique (APCI) avec possibilité de nettoyer l'interface sans rompre le vide,
- ✓ une station de travail complète : ordinateur, logiciels, imprimante laser.

De même, les essais techniques ont été organisés sur la référence du document « Nature des Essais », **CF Annexe 2**, rédigé par les biologistes des laboratoires de pharmacologie/toxicologie et biochimie générale.

Chapitre 4. Essais techniques

Cette partie « essais techniques » est peu renseignée essentiellement pour deux raisons :

- la programmation des essais techniques a pris du retard (problèmes de disponibilité, logistique biologistes/fournisseurs, problèmes institutionnels....) et n'est pas encore terminée ; les essais APPLERA se sont déroulés en octobre, WATERS en décembre mais les dates THERMO FINNIGAN ne sont pas arrêtées,
- les biologistes concernés par le projet ont refusé la participation d'un tiers extérieur.

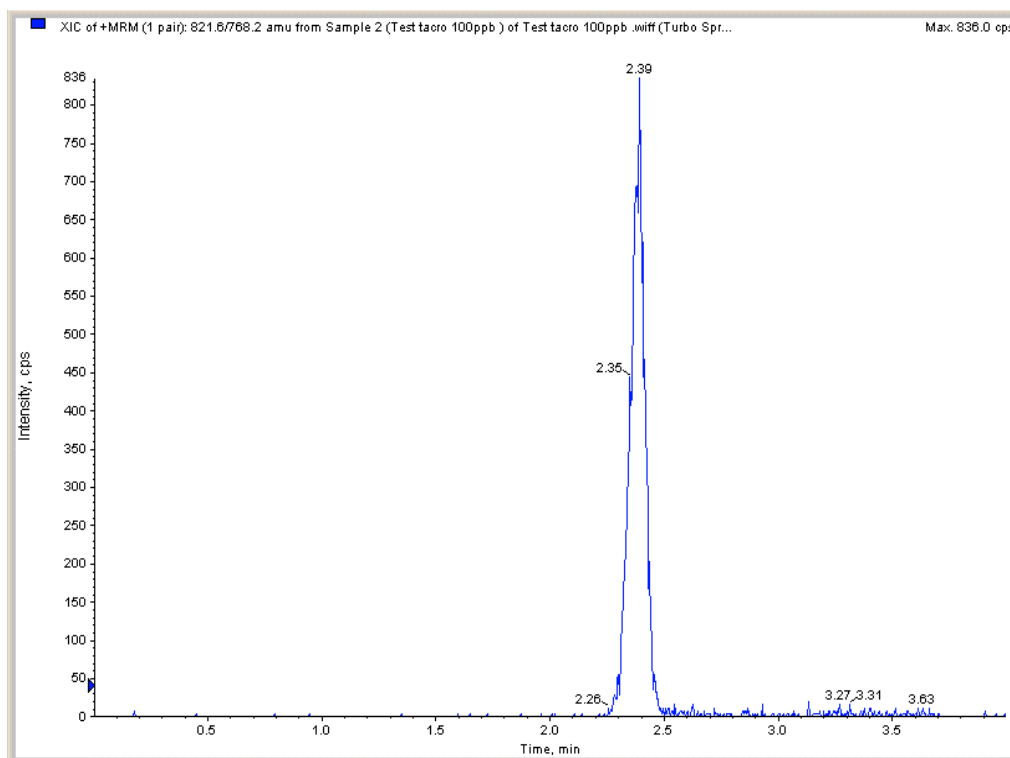
Aussi, à partir des données transmises par les fournisseurs, nous développerons dans ce paragraphe la méthodologie utilisée dans la mise au point du dosage LC/MS/MS du tacrolimus étayée de quelques résultats.

Préalablement aux essais techniques, des échantillons de tacrolimus (poudres) ont été envoyés par le laboratoire de pharmacologie/toxicologie aux différents fournisseurs pour permettre la mise au point du dosage LC/MS/MS.

Comme dans toute démarche d'optimisation LC/MS/MS, il est nécessaire en premier lieu de déterminer par infusion les conditions opératoires optimales pour le composé d'intérêt.

Une solution standard de tacrolimus, d'une concentration de 100 ppm, est infusée à un débit de 5 à 20 $\mu\text{L}/\text{mn}$ dans le spectromètre de masse. Le mode de fonctionnement de l'appareil est le « full scan ». Il s'agit de repérer le tacrolimus sur le courant ionique obtenu.

Spectre MS Tacrolimus, courant ionique total fonction du temps (document APPLERA)

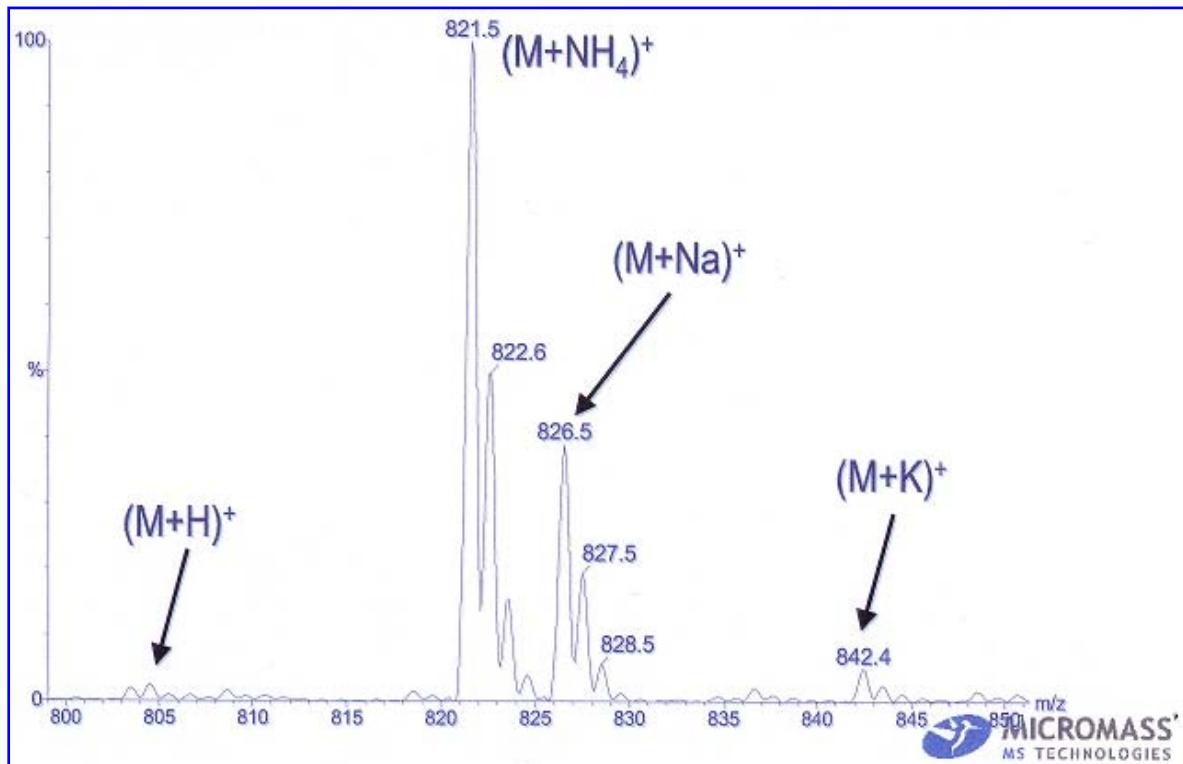


Chapitre 4. Essais techniques

L'opérateur va ensuite étudier le rendement d'ionisation en fonction des différentes espèces ioniques possibles : forme protonée, adduits ammonium, sodique, potassique, etc... La composition de la phase mobile chromatographique sera définie en tenant compte de l'ion retenu.

Sur la figure ci-dessous, on constate que le meilleur rendement d'ionisation est obtenu avec l'adduit ammonium.

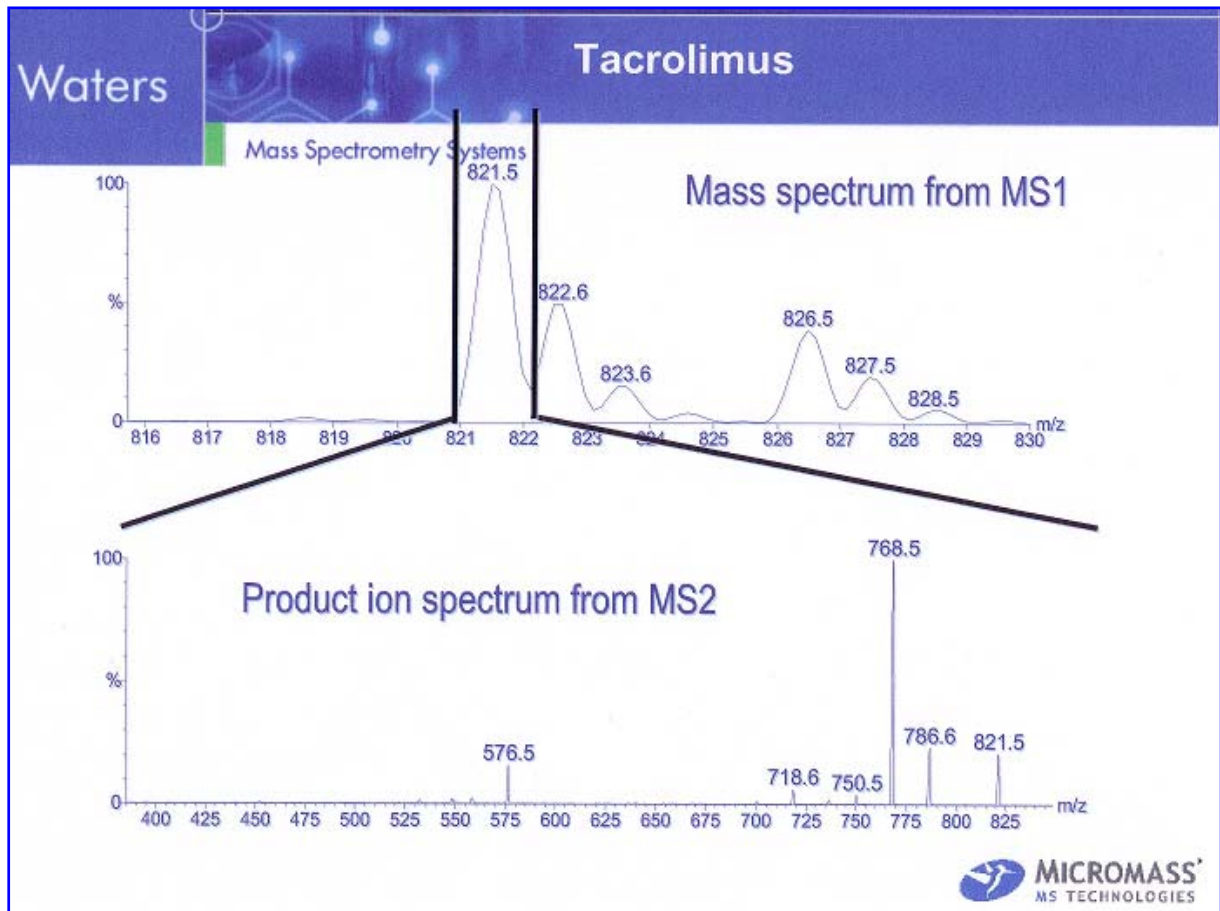
Etude du rendement d'ionisation ; choix de l'espèce ionique (document WATERS®)



Pour le tacrolimus, l'ion parent est un adduit ammonium de rapport m/z égal à 821,5 th.

Le spectromètre de masse est programmé en mode MRM afin de déterminer la transition utilisée en quantification.

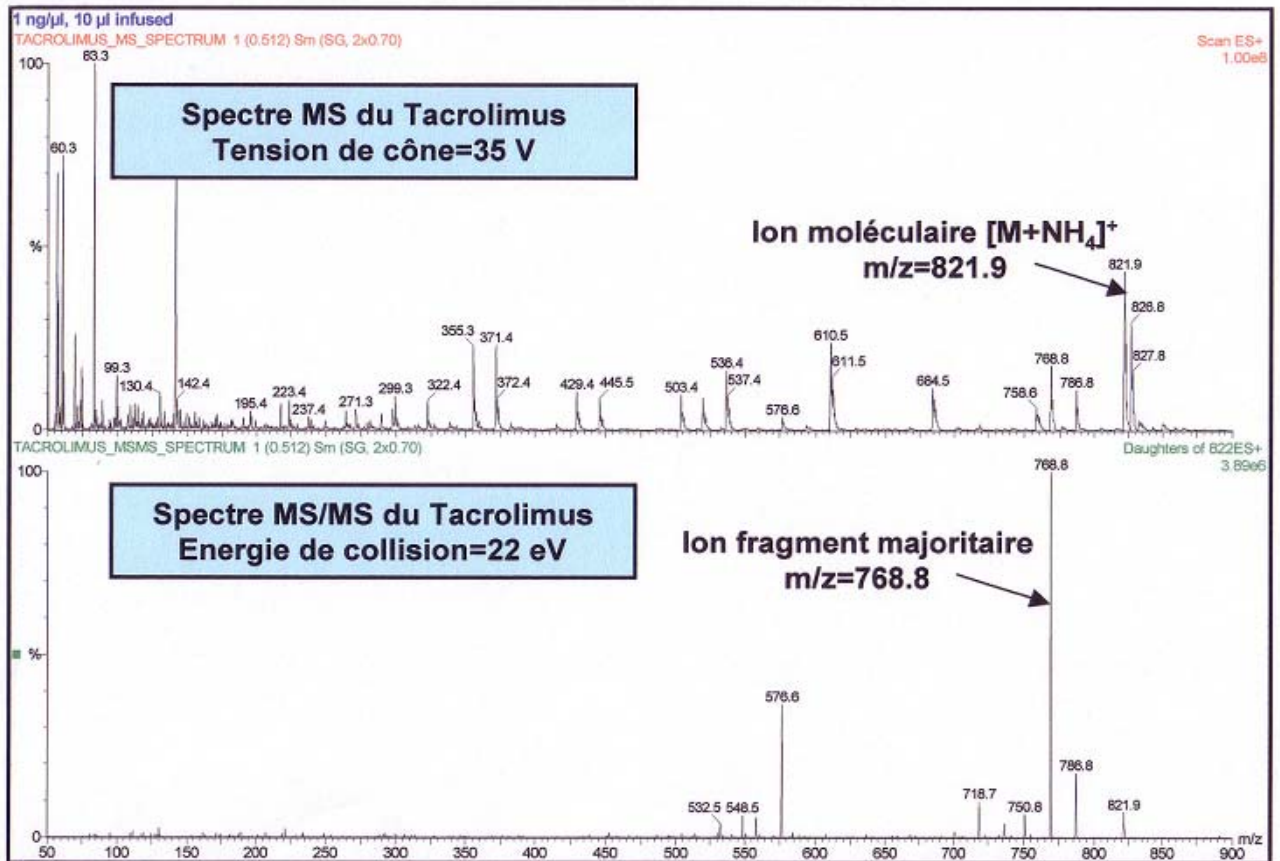
Spectre MS/MS Tacrolimus



La solution infusée va permettre de façon continue de régler les paramètres machine.

A titre d'exemple, les résultats suivants ont été obtenus par WATERS au terme de l'optimisation MS/MS (QUATTRO MICRO API).

Optimisation MS/MS Tacrolimus WATERS



La partie spectrométrie de masse achevée, le manipulateur va travailler sur les conditions HPLC.

Tout d'abord, il faut définir la composition de la phase mobile en Flow Injection Analysis (FIA, travail avec phase mobile seule). Rappelons qu'elle doit permettre un rendement optimal d'ionisation. Cette étape est déterminante dans les réglages de la température de la source, du débit de la phase mobile et de la position de l'impact du spray sur la plaque rideau.

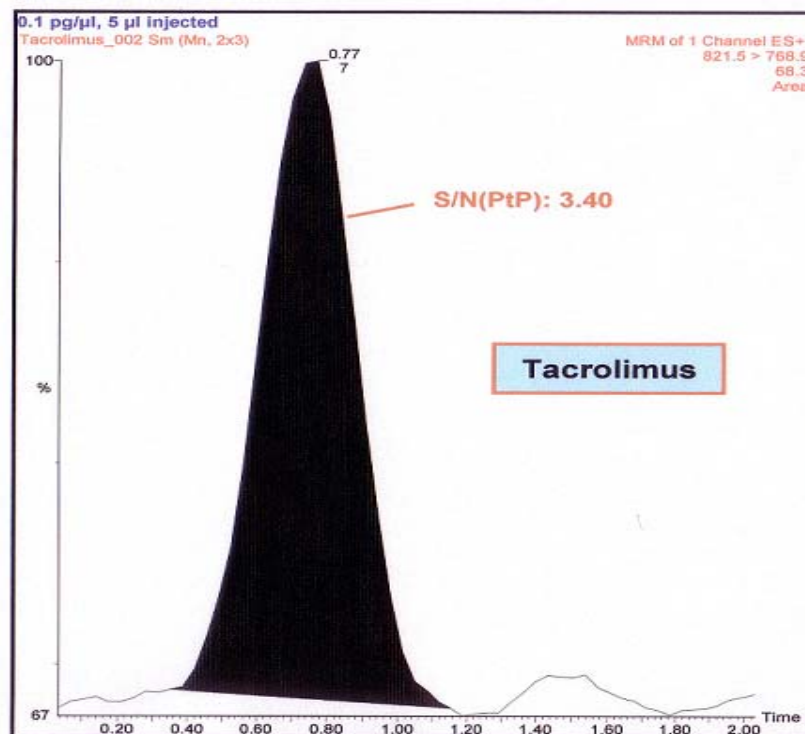
L'ion parent choisi est un adduit ammonium. Par conséquent, la phase mobile devra contenir de l'acétate d'ammonium (travail en mode positif).

Ensuite, il faut travailler en conditions HPLC complète avec la colonne chromatographique de façon à établir le gradient ainsi que le meilleur choix de colonne pour réaliser les analyses à partir d'échantillons de sang.

Conditions LC/MS/MS Tacrolimus WATERS

γ Conditions HPLC			γ Conditions MS														
γ Colonne: Xterra C18, 30 * 2.1 mm, 3.5 μm			γ Mode d'ionisation: ES+														
γ Température colonne: 30°C			γ Voltage du capillaire: 3.0 kV														
γ Solvant A: H ₂ O, 0.1% d'acide formique, 10 mM d'acétate d'ammonium			γ Conditions d'analyse en MRM:														
γ Solvant B: ACN, 0.1% d'acide formique			<table border="1"> <thead> <tr> <th>Composé</th> <th>Ion moléculaire (m/z)</th> <th>Ion fragment (m/z)</th> <th>Tension de cône (V)</th> <th>Energie de collision (eV)</th> <th>Temps de rétention (min)</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>Tacrolimus</td> <td>821.5</td> <td>768.9</td> <td>35.0</td> <td>22.0</td> <td>0.77</td> </tr> </tbody> </table>			Composé	Ion moléculaire (m/z)	Ion fragment (m/z)	Tension de cône (V)	Energie de collision (eV)	Temps de rétention (min)	Tacrolimus	821.5	768.9	35.0	22.0	0.77
Composé	Ion moléculaire (m/z)	Ion fragment (m/z)	Tension de cône (V)	Energie de collision (eV)	Temps de rétention (min)												
Tacrolimus	821.5	768.9	35.0	22.0	0.77												
γ Débit: 0.3 ml/min																	
γ Conditions d'élution isocratique																	
γ Temps (min.)	Solvant A (%)	Solvant B (%)															
0.0	20.0	80.0															
2.0	20.0	80.0															

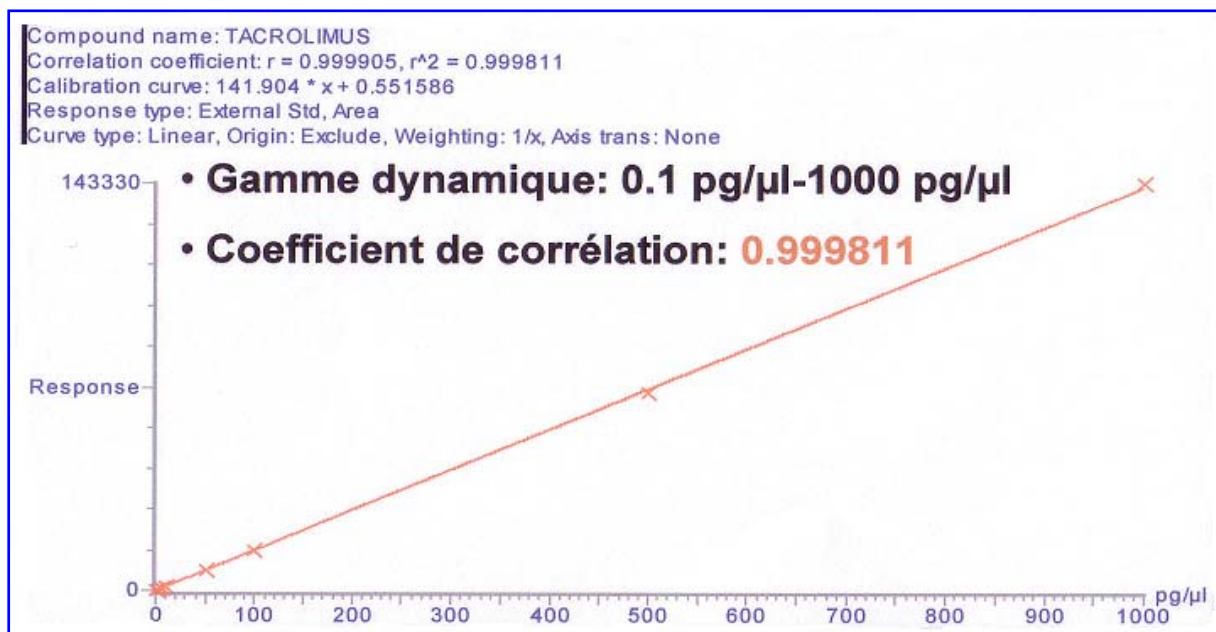
Afin d'estimer la limite de détection du tacrolimus, WATERS a déterminé le rapport signal sur bruit (pic à pic) pour une solution standard à 0,1 pg/μL, 5 μL injectés. La limite de détection est calculée pour un rapport signal sur bruit supérieur ou égal à 3.



Chapitre 4. Essais techniques

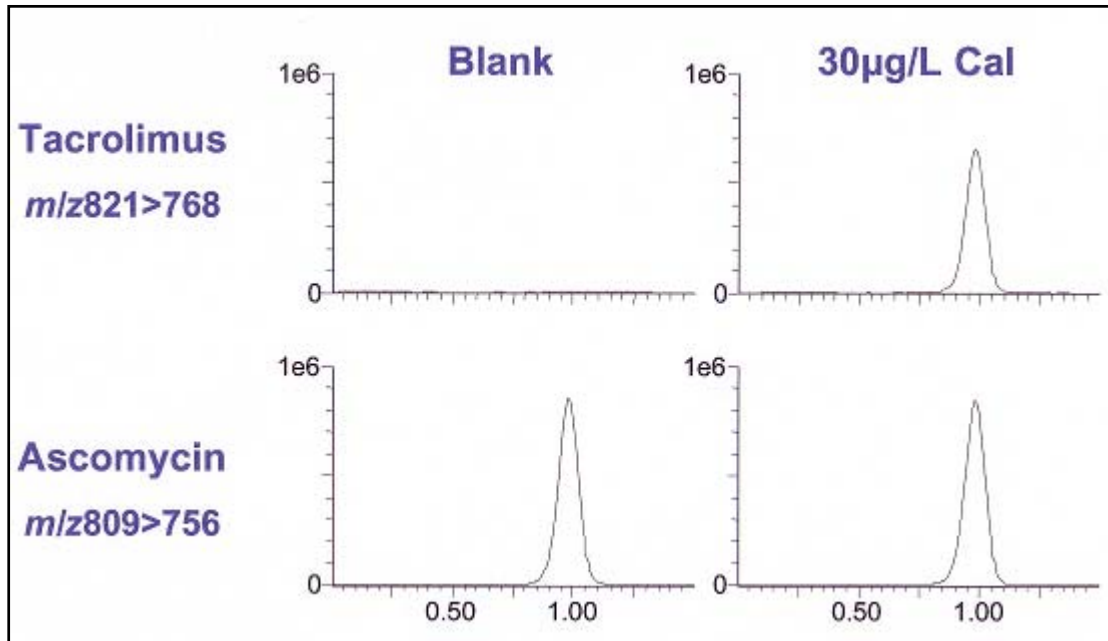
La courbe d'étalonnage est ensuite tracée.

	Concentration Standard (pg/μl) 10 μl injectés	Temps de rétention (min.)	Aire	Concentration Calculée (pg/μl) 10 μl injectés	Déviations (%)
1	Blanc				
2	0.050	0.77	7	0.045	-9.7
3	0.100	0.77	16	0.107	6.5
4	0.500	0.77	72	0.503	0.6
5	1.000	0.77	149	1.045	4.5
6	5.000	0.77	700	4.926	-1.5
7	10.000	0.77	1431	10.078	0.8
8	50.000	0.77	7048	49.664	-0.7
9	100.000	0.77	14243	100.366	0.4
10	500.000	0.77	69515	489.868	-2.0
11	1000.000	0.77	143330	1010.047	1.0



Cette présentation reprend le travail de mise au point préalable aux essais techniques, effectué à partir de solutions standards de tacrolimus.

Pour un dosage de tacrolimus dans le sang, un standard interne sera ajouté dans l'échantillon natif afin de corriger les pertes chimiques éventuelles durant le traitement de cet échantillon. Ce standard interne est l'ascomycine.



Au
term
e de
cette
mise
au
point
analy
tique
LC/M
S/M
S
tacro
limus
,
Wate

rs donne une estimation de la cadence analytique. Le temps d'analyse par échantillon est de 2,75 minutes. Il faudrait en arrondissant 1 heure et 10 minutes pour les 25 échantillons quotidiens du laboratoire de pharmacologie/toxicologie.

Nous n'avons pas de données précises concernant la préparation de l'échantillon natif.

CHAPITRE 5

PROCEDURE D'APPEL D'OFFRES

I. REGLEMENTATION DES MARCHES PUBLICS DU POINT DE VUE DES ETABLISSEMENTS DE SANTE

1. Introduction

Le CHU de Nantes est un établissement public de santé. Par conséquent, l'acquisition d'un appareil de type LC/MS/MS est soumis à réglementation compte tenu du volume financier que représente un tel investissement. Les sources du droit de l'achat public tant nationales que communautaires sont nombreuses mais, le Code des marchés publics constitue une des principales sources d'informations des acheteurs publics. Il consacre l'appel à la concurrence ainsi que les principes de liberté et d'égalité d'accès à la commande publique. Issu d'une première codification administrative adoptée par le décret du 17 juillet 1964, il a été de nombreuses fois réformé. La dernière révision date de l'année 2001. Elle fixe un nouveau dispositif de passation et d'exécution des marchés publics dans un esprit de simplification des procédures et d'amélioration de la concurrence.

Une présentation réglementaire des marchés publics du point de vue des établissements de santé est l'objet de cette première partie.

2. Le nouveau Code des Marchés Publics

La rédaction du texte a été entièrement revue dans un souci constant de simplification et de clarification afin de mettre à la disposition des différents partenaires de la commande publique un texte clair, lisible, de volume réduit, au sein duquel il est aisé de retrouver les règles applicables à chaque étape des procédures. Les règles ont été présentées en suivant l'ordre chronologique de la passation et de l'exécution des marchés.

Le Code est organisé en six titres, qui retracent les principales étapes de la passation et de l'exécution d'un marché public.

⇒ **Le titre I** définit le champ d'application du Code et expose les principes fondamentaux qui régissent le droit des marchés publics.

⇒ **Le titre II** présente les dispositions générales présidant à la détermination des besoins à satisfaire, la définition des prestations, les règles de constitution de groupements de commandes, d'allotissement. Sont précisés les documents constitutifs du marché, la fixation de la durée et des conditions de reconduction du marché ainsi que l'établissement des prix.

⇒ **Le titre III** constitue le cœur de ce Code puisqu'il expose les règles applicables à la passation des marchés. Il décrit les organes de l'achat public assortis des différentes commissions d'appel d'offres, les procédures de passation et de mise en concurrence ainsi que le déroulement des différentes procédures.

⇒ **Le titre IV** rassemble les dispositions financières applicables à l'exécution des marchés.

⇒ **Le titre V** expose les modalités de contrôle des marchés.

⇒ **Le titre VI** est consacré aux dispositions diverses concernant les règlements des litiges, les organismes consultatifs ainsi que les informations sur les marchés qui prévoient la création d'un Observatoire économique de l'achat public.

3. Le marché public et l'hôpital

L'article 1^{er} du Code des marchés publics dispose que « **Les marchés publics sont des contrats conclus à titre onéreux avec des personnes publiques ou privées par les personnes morales de droit public mentionnées à l'article 2, pour répondre à leur besoins en matière de travaux, de fournitures ou de services** ».

Le marché public se définit donc selon plusieurs composantes que l'on peut ainsi expliciter :

⇒ Les marchés publics sont des contrats consacrant l'accord de volonté entre des personnes dotées de la personnalité juridique. Ils sont passés dans le respect des procédures prévues par le Code des marchés publics lorsque leur montant excède 90 000 € HT.

⇒ **Ils sont passés avec des personnes publiques ou privées** ; si la simple coopération entre services d'une même personne publique ne donne pas lieu à la passation d'un marché, l'achat par une personne publique de prestations ou de fournitures à un tiers doit donner lieu à la passation d'un marché public.

⇒ **Ils sont conclus à titre onéreux** ; les prestations et fournitures acquises doivent donner lieu au versement d'un montant.

⇒ **Les marchés doivent répondre aux besoins de l'administration contractante** ; l'objet du marché est un élément fondamental de la définition des marchés publics. Il doit être précisément défini en vue de répondre à un besoin de la personne publique, et à lui seul.

⇒ **Ils portent sur des fournitures, des services ou des travaux.**

Les marchés de fournitures sont des marchés ayant pour objet l'achat, la prise en crédit-bail, la location ou la location vente avec ou sans option d'achat de produits ou matériel entre un fournisseur et un pouvoir adjudicateur. La livraison de produits peut comporter à titre accessoire des travaux de pose et d'installation.

La définition des marchés de travaux est très étroitement liée à la notion de maîtrise d'ouvrage puisque sont des marchés de travaux, les marchés ayant pour objet la réalisation de tous travaux de bâtiment ou de génie civil à la demande d'une personne publique exerçant la maîtrise d'ouvrage.

Enfin sont des marchés de services, les marchés ayant pour objet la réalisation de prestations de services.

En pratique, on peut dire que le marché public hospitalier correspond à une procédure de passation, sur simple facture, négociée ou dans notre cas sur appel d'offres, visant à déterminer les meilleures conditions pour contracter, d'autant plus détaillée et formalisée que le montant d'achat est important.

4. Les procédures

☆ Les différentes procédures

Il existe trois procédures principales : l'achat sur simple facture, le marché négocié et l'appel d'offres qui se différencient par leurs seuils de passation, exprimés en euros et hors taxe.

On distingue :

⇒ Les marchés sans formalités préalables ou modalités particulières de passation pour les fournitures, services ou travaux n'excédant pas le seuil de 90 000 euros HT

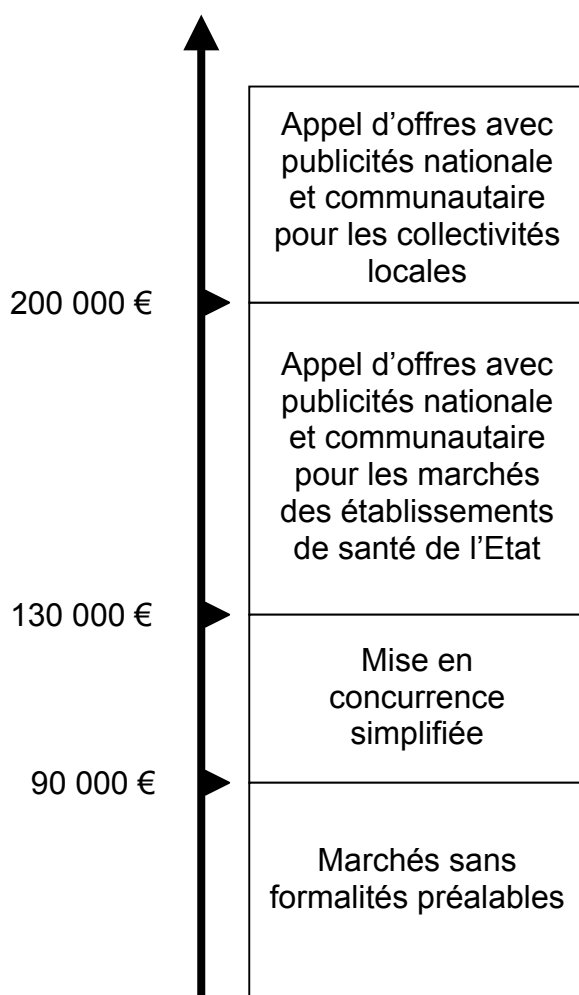
Chapitre 5. Procédure d'appel d'offres

(soit 700 000 francs HT). Leur règlement s'effectue alors sur factures ou présentation de mémoires.

⇒ La procédure de mise en concurrence simplifiée qui s'applique entre le seuil des achats sur factures et le seuil de l'appel d'offres à la suite de négociations avec plusieurs candidats, après publicité et mise en concurrence préalable.

⇒ L'appel d'offres au-delà de 130 000 euros HT (soit 900 000 francs HT). Celui-ci peut être ouvert lorsque tout candidat peut remettre une offre ou restreint lorsque seuls peuvent remettre des offres les candidats qui y ont été autorisés après sélection.

Tableau récapitulatif des seuils et des procédures



☆ Les modalités de calcul des seuils de passation des marchés

Le montant des achats à prendre en compte résulte de l'ensemble des dépenses liées à une même opération quel que soit le nombre d'entrepreneurs auxquels la personne responsable des marchés fait appel.

Il en est ainsi tant des fournitures dont le caractère homogène peut être apprécié sur l'année, que des prestations de service sur la durée totale de leur réalisation, que des travaux concernant un même ouvrage. Des travaux, fournitures ou prestations

peuvent être répartis en lots donnant lieu à un marché distinct ou peuvent faire l'objet d'un marché unique.

Des procédures négociées ressortent la possibilité de passer des marchés complémentaires, sous réserve que le marché initial ait été passé après mise en concurrence. Il s'agit notamment de marchés exécutés par le titulaire initial et destinés soit au renouvellement partiel de fournitures ou d'installations d'usage courant, soit à un complément de fournitures ou à l'extension d'installations existantes. Leur durée ne peut dépasser trois ans et leur montant 130 000 € HT sauf en cas de publication de l'appel d'offres initial au Journal Officiel des Communautés Européennes. Sont retenus également comme marchés complémentaires de services ou de travaux, les prestations ne figurant pas dans le marché initialement conclu mais devenues nécessaires à la suite de circonstances imprévues. Le montant cumulé des marchés complémentaires ne doit pas dépasser 33% du montant du marché principal.

☆ Le choix de l'offre « économiquement la plus avantageuse »

La qualification de l'offre « économiquement la plus avantageuse » s'appuie sur une diversification des critères de sélection. Outre les critères du coût d'utilisation, de la valeur technique et du délai d'exécution, d'autres critères comme les qualités esthétiques et fonctionnelles, la rentabilité, le service après-vente et l'assistance technique, la date et le délai de livraison sont expressément mentionnés. Le prix des prestations ne figure pas dans les dix premiers critères de la liste.

Le Code des marchés publics s'attache à la finalité de l'achat, à son efficacité, c'est-à-dire à la pertinence et la valeur des choix opérés par l'administration, pour répondre à une meilleure satisfaction des besoins.

II. APPLICATION DE LA REGLEMENTATION DES MARCHES PUBLICS DES ETABLISSEMENTS DE SANTE AU PROJET LC/MS/MS DU CHU DE NANTES

1. Introduction

L'achat d'une LC/MS/MS, équipement analytique, correspond à un marché de fournitures.

Nous avons évalué dès le Chapitre 1, un coût d'acquisition très élevé des appareils de LC/MS/MS, entre 250 et 300 K€ HT. Au-delà du seuil de 200 000 € HT, la procédure à engager selon la réglementation du Code des Marchés Publics est l'appel d'offres.

L'acheteur hospitalier a souhaité celui-ci ouvert, c'est-à-dire que tout candidat peut remettre une offre.

Par ailleurs, l'appel d'offres est composé de deux lots ; un lot correspondant au spectromètre de masse, l'autre à la chaîne de chromatographie liquide haute performance. Les candidats peuvent répondre à un des lots ou aux deux.

Dans cette deuxième partie, nous décrivons le déroulement de la procédure d'appel d'offres destinée à l'acquisition d'un appareil de LC/MS/MS. Cependant, comme nous n'avons pas suivi cette procédure, en raison de l'ajournement du projet, cette description sera générale.

2. Déroulement de la procédure d'appel d'offres

●La première étape de tout projet d'acquisition est *l'évaluation des besoins*. La définition précise des besoins, développée dans le Chapitre 1, est un préalable indispensable.

C'est ainsi que le coût de l'investissement d'un appareil LC/MS/MS a été approximativement estimé à un montant supérieur à 200 000 € HT impliquant une procédure de passation de type appel d'offres.

●La seconde étape correspond à *la préparation de la consultation et publicité*.

Dans le Journal Officiel des Communautés Européennes, le JOCE est publié un avis de marché et dans le Bulletin Officiel des Annonces des Marchés Publics, le BOAMP est publié un avis d'appel public à concurrence. Le délai entre l'envoi des avis au JOCE et BOAMP et, la date de remise des offres au CHU par les fournisseurs potentiels est de 52 jours. Au-delà de ce temps réglementaire, l'offre n'est pas prise en considération et renvoyée à son expéditeur.

Parallèlement, le bureau des achats, (BA), du CHU prépare le dossier de consultation. Toutes les informations recueillies lors de l'analyse des besoins sont triées, ordonnées et retranscrites, comme nous l'avons déjà vu, dans des documents constitutifs du marché appelés Cahier des Clauses Administratives Particulières, le CCAP, et Cahier des Clauses Techniques Particulières, le CCTP, **CF Annexe 1**. Par ailleurs, un règlement particulier à cette consultation est rédigé ainsi qu'une lettre de lancement signée du directeur des marchés énonçant l'objet et la date de remise de l'offre par le fournisseur. La validation des pièces constitutives du dossier par la Direction des marchés permet l'attribution d'un numéro de CCAP.

En résumé, chaque dossier de consultation complet comprend deux types de documents :

⇒ à conserver par le fournisseur

- la lettre de lancement
- un exemplaire du règlement particulier de la consultation
- un exemplaire du CCAP numéroté
- un exemplaire du CCTP

⇒ à retourner au CHU dûment complétés et signés

- acte d'engagement et annexes
- déclaration du candidat, volets N°1 et 2 ou volet unique ainsi que

tous les documents administratifs fiscaux et sociaux.

●*La consultation* proprement dite débute avec la première demande de dossier de consultation par un fournisseur candidat au Bureau des Achats, et, s'achève à la date limite de réception des offres, figurant sur la lettre de lancement. Chaque envoi de dossier de consultation par le CHU via le bureau des achats est répertorié.

Les conditions de présentation et d'envoi des offres par les fournisseurs sont imposées et figurent dans le règlement particulier de la consultation. En effet, le candidat doit transmettre son offre au CHU sous pli cacheté portant le cachet ou le nom de son entreprise, précisant la date de l'appel d'offres et son objet ainsi que la mention « NE PAS OUVRIR ». Le pli contiendra deux enveloppes également cachetées portant le nom du candidat ainsi que les mentions :

⇒ « PREMIERE ENVELOPPE INTERIEURE » contenant toutes les pièces permettant de retenir le candidat (déclaration du candidat, volets N°1 et 2 ou volet unique et documents administratifs fiscaux et sociaux)

Chapitre 5. Procédure d'appel d'offres

⇒ « SECONDE ENVELOPPE INTERIEURE » contenant toutes les pièces relatives à l'offre elle-même (acte d'engagement, offres chiffrées, documentation technique, liste de références...).

Chaque dépôt d'offre est enregistré par le bureau des achats sur un document appelé registre des dépôts. Dans le cas général, le nombre d'offres déposées est très inférieur au nombre de demandes de dossier de consultation.

● Il est procédé ensuite à *l'ouverture des plis par la Commission d'Appel d'Offres, la CAO.*

Dans un premier temps, la CAO n'ouvre que les premières enveloppes intérieures. Les offres non conformes sont exclues. Un courrier de notification du refus pour non respect de la procédure est envoyé au fournisseur rejeté.

Pour les offres conformes, les membres de la CAO ouvrent alors les secondes enveloppes intérieures. Ils paraphent les actes d'engagement transmis par les candidats acceptés. Un procès verbal d'ouverture des plis est dressé par la Direction des marchés et signé par les membres de la CAO.

Le bureau des achats est alors chargé du dépouillement et de la rédaction de la synthèse des différentes offres présentée sous forme d'un rapport d'analyse.

Les rapports techniques issus des différents essais effectués sont examinés et discutés en réunions entre les biologistes concernés et le bureau des achats.

● *CAO chargée du jugement des offres*

Le responsable du bureau des achats présente en CAO les choix techniques arrêtés. La Commission d'Appel d'Offres a la responsabilité du choix définitif. Elle peut ne pas entériner le choix présenté par le responsable du bureau des achats, le marché est alors déclaré infructueux ou sans suite voire même annulé.

Si la CAO approuve le choix proposé par le responsable du bureau des achats, le procès verbal de jugement des offres est rédigé de manière définitive et signé par la CAO.

● *Attribution et mise en œuvre du marché.*

Le bureau des achats demande l'attribution d'un numéro d'identification du ou des marché(s) auprès du secrétariat de la DAF et transmet les dossiers à la Direction des marchés.

Celle-ci saisit les données dans le logiciel de gestion hospitalière et rédige le rapport de présentation des marchés, qui est validé par le Directeur Général.

Parallèlement, le bureau des achats complète le ou les acte(s) d'engagement transmis par le ou les fournisseur(s) sélectionné(s) puis les envoie à la Direction des marchés afin que ceux-ci soient signés par le Directeur Général.

Le BA informe les services utilisateurs du matériel retenu et la Direction des marchés notifie par courrier aux candidats non retenus que leur offre est refusée.

Le bureau des achats doit aussi préparer en deux exemplaires le dossier qui sera envoyé à la DDASS pour contrôle de légalité, par la Direction des marchés, après validation finale.

La DDASS renvoie l'accusé de réception dont la date rend le marché exécutoire.

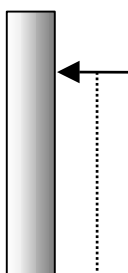
Il est ensuite notifié au(x) fournisseur(s), par la Direction des marchés, que le marché lui ou leur est attribué, par lettre recommandée avec accusé de réception. La Direction des marchés envoie après la réception de l'accusé de réception du ou des fournisseur(s), agrafé sur les trois actes d'engagement, deux exemplaires du dossier à la Trésorerie et un au bureau des achats.

Chapitre 5. Procédure d'appel d'offres

L'accusé de réception du ou des candidat(s) retenu(s) sert de date de départ pour le délai de publication de l'avis d'attribution au JOCE et au BOAMP (30 jours).

3. Conclusion

L'appel d'offres relatif à l'achat de l'équipement LC/MS/MS est soumis à la réglementation du Code des Marchés Publics. Cette réglementation impose une procédure spécifique dont certaines étapes doivent être impérativement accomplies dans un temps fixe et d'autres sont réalisables sans limite de temps. Nous avons vu qu'un tel projet d'acquisition implique la participation de nombreux acteurs de services très différents et par conséquent, une importante circulation d'informations et de documents. En pratique, l'acquisition d'un équipement lourd, nécessitant le lancement d'une procédure d'appel d'offre, peut s'avérer très longue. Nous nous proposons, pour conclure ce Chapitre, de récapituler d'un point de vue chronologique l'ensemble des démarches à suivre qui nécessitent un minimum de 6 mois.



🕒 **t₀ Besoin analytique ?** → 📖 Cahier des charges

Le temps nécessaire à cette étape dépend :

- 🚗 de l'urgence du projet
- € des possibilités de financement
- 👤 de la motivation des acteurs

Chapitre 5. Procédure d'appel d'offres

CONCLUSION

Ce travail a débuté par une veille technologique sur la méthode physique d'analyse, spectrométrie de masse couplée à une chaîne de chromatographie liquide haute performance.

Dans le domaine de la biologie médicale, la technique est opérationnelle depuis une dizaine d'années et utilisée couramment en routine, en Allemagne, en Grande Bretagne, en Belgique, etc...En effet, la mise sur le marché d'appareils de paillasse, LC/MS ou LC/MS tandem, présentant des performances techniques remarquables et permettant des applications très larges a suscité l'intérêt de certains pays européens (rappelons toutefois que la diversité des systèmes de santé européens est souvent à l'origine de certaines disparités).

En France, cette technologie de pointe, d'un prix non négligeable, est peu utilisée en routine dans les laboratoires hospitaliers. Cependant, elle intéresse de nombreux biologistes et beaucoup plébiscitent un tel investissement.

C'est dans ce contexte de projet d'acquisition du CHU de Nantes que s'est inscrit ce travail. L'objectif était de suivre étape par étape les procédures qui permettent l'achat d'un équipement analytique lourd que représente une LC/MS/MS. L'intérêt de ce travail réside dans la vue d'ensemble qu'il nous a permis de dresser et dans les connaissances acquises auprès des différents acteurs du projet, remplissant des fonctions distinctes et complémentaires.

Le projet remonte à 18 mois.

A l'achèvement de ce travail, les essais techniques sont en cours de réalisation.

Les difficultés rencontrées au sein de l'institution sont nombreuses. La motivation des différents protagonistes s'épuise devant l'impossibilité d'avancer dans le projet de manière consensuelle et parfois réaliste. De plus, des données technologiques nouvelles amenuisent les chances d'aboutissement de l'acquisition. Abbott annonce la mise sur le marché, début 2004, d'un kit d'immunoanalyse pour le sirolimus.

L'achat d'une LC/MS/MS est réglementée par le Code des marchés publics. Le coût de l'appareil impose une procédure d'appel d'offres souvent longue. Cette lourdeur procédurale peut s'avérer un handicap dans certains cas où l'urgence prime mais un garde-fou dans d'autres.

C'est ainsi que devant la persistance des problèmes rencontrés, il est probable que la Direction du pôle de biologie n'est d'autre choix qu'un changement d'orientation analytique passant de l'innovante spectrométrie de masse à la méthode froide traditionnelle. Le laboratoire de pharmacologie/toxicologie dispose d'un automate dédié à l'EIA, utilisé actuellement pour le dosage du tacrolimus. Un run supplémentaire pour le sirolimus est facilement envisageable.

Pourtant, le projet d'acquisition LC/MS/MS par le CHU de Nantes est incontestablement justifié. On peut s'étonner que le premier centre européen de greffes rénales ne soit pas équipé alors que le CHU d'Angers l'est depuis 8 ans.

BIBLIOGRAPHIE

OUVRAGES

ANALYSE CHIMIQUE

Méthodes et techniques instrumentales modernes

Francis Rouessac, Annick Rouessac

Editions Dunod, 2000

ATLAS DE POCHE DES METHODES D'ANALYSE

Georg Schwedt

Editions Médecine-Sciences, Flammarion

BIOCHIMIE METHODES BIOPHYSIQUES EXPERIMENTALES

Michel Prats

Editions Dunod, 2002

CHIMIE ANALYTIQUE

Skoog, West, Holler

Editions De Boeck Université, 1997

ELEMENTS DE TOXICOLOGIE

Alain Viala

Editions Lavoisier TEC & DOC, 1999

INTRODUCTION AU LABORATOIRE DE BIOCHIMIE MEDICALE

Ambroise Martin

Editions ellipses, 1995

LE TECHNICIEN D'ANALYSES BIOLOGIQUES

Guide théorique et pratique

Coordonnateur Jacques Béraud

Editions Lavoisier TEC & DOC, 2001

MASS SPECTROMETRY SECOND EDITION

James Barker

Editions John Wiley & Sons, 1999

SPECTROMETRIE DE MASSE

De Hoffmann, Charrette, Stroobant

Editions Dunod, 1999

SPECTROMETRIE DE MASSE

PRINCIPES ET APPLICATIONS

Emilia Constantin en collaboration avec Pietro Traldi, Donato Favretto et André Schnell

Editions Lavoisier TEC & DOC, 1996

PERIODIQUES

BIOFUTUR ; Protéomique

Hors-série N°4 décembre 2002

LA REVUE DES SAMU ; Le nouveau Code des Marchés Publics -2001-168

LA REVUE DE L'ACHAT PUBLIC ; La réforme du Code des Marchés Publics
N°1/2001

LE TECHNOSCOPE ; Spectrométrie de masse
Cahier N°89 dans la revue BIOFUTUR N°164 février 1997

LE TECHNOSCOPE ; Spectrométrie de masse en tandem
Cahier N°106 dans la revue BIOFUTUR N°181 septembre 1998

TECHNIQUES HOSPITALIERES ; La fonction conseil de maître d'ouvrage hospitalier
Mai 2001, n°656

THESES

Nouvelles méthodes de séparations chirale et non chirale des acides aminés non dérivés par chromatographie en phase liquide et couplage à différents modes de détection, Petritis Konstantinos, 2002, Université d'Orléans, thèse de doctorat chimie et physicochimie des composés d'intérêt biologique.

Optimisation d'une méthode de dosage des benzodiazépines par chromatographie liquide haute performance, couplée à la spectrométrie de masse dans les liquides biologiques, 2002, Université de Montpellier I, thèse d'exercice UFR des sciences pharmaceutiques et biologiques.

ADRESSES INTERNET

- fournisseurs spectromètre de masse LC/MS/MS

<http://www.applera.com>

<http://www.waters.com/micromass>

<http://www.thermofinnigan.com>

- journaux de spectrométrie de masse

Journal of the American Society for Mass Spectrometry (Elsevier)

<http://www-east.elsevier.com/webjam/Menu.html>

Journal of Mass Spectrometry (Wiley)

<http://www.interscience.wiley.com/jpages/1076-5174/>

Rapid Communications in Mass Spectrometry (Wiley)

<http://www.interscience.wiley.com/jpages/0951-4198/>

- formation spectrométrie de masse

<http://www.u-psud.fr/Orsay/Formations/maitrisechimie.nfs/>

<http://www.ionsource.com/tutorial/spectut/spec1.htm>

- divers

<http://www.legifrance.gouv.fr>

<http://www.emea.eu.int>

<http://www.leem.org>
<http://www.fda.gov/>

ANNEXES

ANNEXE 1



Centre de Gestion des Laboratoires

APPEL D'OFFRES DU <> 2003

ACQUISITION D'UN DISPOSITIF IN VITRO DE
CHROMATOGRAPHIE LIQUIDE
COUPLE A LA MASSE : CLPH-SM-SM

POUR LE LABORATOIRE DE PHARMACOLOGIE –
TOXICOLOGIE
DU CHU DE NANTES
- HOTEL DIEU -

CAHIER DES CLAUSES TECHNIQUES PARTICULIERES

La procédure de consultation utilisée est celle de l'appel d'offres ouvert, en application de l'article 33-2 du code des marchés publics.

Le présent Cahier des Clauses Techniques Particulières comporte
5 pages numérotées de 1 à 5

Conclusion

Article 1 – OBJET DU MARCHE DEFINITION DE L'EQUIPEMENT ET DES PRESTATIONS / ALOTISSEMENT

La présente consultation a pour objet la fourniture, l'installation, et la mise en service d'un dispositif in vitro de chromatographie en phase liquide couplé à un spectromètre de masse (CLHP-SM-SM) pour le laboratoire de pharmacologie -Toxicologie du C.H.U. de Nantes.

1- 1 CARACTERISTIQUES

Destiné au laboratoire de pharmacologie - toxicologie, le système de chromatographie en phase liquide couplé à un spectromètre de masse (CLHP-SM-SM) assurera l'analyse quantitative et/ou qualitative de médicaments, composés toxiques ou stupéfiants dans les liquides biologiques (sang et urine).

Il fonctionnera en routine et permettra la prise en charge d'un certain nombre d'analyses : - dosages réalisés actuellement en CLHP couplée à la détection UV ou par technique immunologique.

- dosages d'acides aminés sanguins et urinaires et d'acides organiques : accord avec l'unité de Biochimie. A ce jour ils sont envoyés à l'extérieur.

Par ailleurs, il sera utilisé :

- pour le développement de nouvelles méthodes de dosages ou de diagnostics dans les domaines, du suivi thérapeutique médicamenteux ou de la toxicologie clinique et médico-légale.

1-2 AIIOTISSEMENT

L'appel d'offres est composé de 2 lots.

Article 2 : SPECIFICATIONS GENERALES ET TECHNIQUES - EQUIPEMENT

Ce système devra répondre aux caractéristiques minimales suivantes :

1. Un système de pompage CLHP capable d'assurer un gradient quaternaire à des débits variant de 50 ou 100 $\mu\text{L}/\text{min}$ à plusieurs mL/min .
2. Un système de dégazage de solvants en ligne
3. Un système d'injection automatique (passeur d'échantillons) à volume variable de 0,1 à 500 μL avec possibilité de dilution des échantillons dans un environnement réfrigéré.
4. Un four à colonnes équipé d'un « switch » permettant l'utilisation automatique de différentes colonnes.
5. Un spectromètre de masse complet couvrant une gamme de masse de 50 à 1500 amu, et équipé de deux interfaces interchangeables : Electrospray (ES) et ionisation chimique à pression atmosphérique (APCI).

Conclusion

Possibilité de nettoyage de l'interface sans rompre le vide.

6. Une station de travail complète (ordinateur, logiciels, imprimante laser) permettant
 - de contrôler l'intégralité du système LC-MS-SM, incluant l'injecteur.
 - saisie possible par lecteur de code barre.
 - d'acquérir, de traiter et d'achever les données.
 - équipé d'un graveur interne et d'une carte réseauEnvironnement Windows souhaité
7. un générateur d'azote adapté au fonctionnement du système

OPTIONS

Le coût unitaire des options apparaîtra explicitement détaché de la proposition de base :

- a) Bibliothèque de spectres, de molécules et logiciel de recherche automatique
- b) Logiciels d'application relatif aux acides aminés
- c) Traitement de la connexion informatique :

Le candidat chiffrera le coût de la connexion informatique de type bidirectionnelle (au minimum). Connexions à notre informatique de laboratoire utilisant le réseau PGP existant.

Le candidat précisera la possibilité de fonctionner en mode dégradé en cas d'interruption du SIL.

Article 3 : DOCUMENTATION TECHNIQUE - GARANTIE-MAINTENANCE - FORMATION :

3. 1 DOCUMENTATION TECHNIQUE

A la livraison, le titulaire fournira la documentation technique obligatoirement rédigée en langue française, rassemblant toutes les conditions et modalités techniques (caractéristiques, schémas, nomenclatures techniques, procédures) permettant une utilisation adaptée et performante, par les opérateurs techniques et biologiques.

Ces documents seront exigés pour l'admission de l'équipement.

3. 2 GARANTIE ET MAINTENANCE

La période de garantie est au minimum d'un an à compter de l'admission de l'équipement. Pendant, cette période, la maintenance est assurée par le constructeur sans supplément de prix. La garantie s'entend comme une prestation complète, intégrant la maintenance préventive de l'équipement.

Le candidat proposera un contrat "tous risques" applicable au terme de la garantie. Il en précisera le contenu (préventif / curatif - tarifs), en indiquant les contrôles périodiques réguliers et les interventions occasionnelles qu'ils recouvrent éventuellement, les délais et périodes d'intervention assurés, les coûts directs et annexes (principaux consommables associés notamment.)

Le candidat précisera notamment les moyens mis en oeuvre pour une intervention sur l'équipement, après qu'il ait été informé du dysfonctionnement.

Le candidat apportera également des précisions quant au coût des interventions ponctuelles hors contrat (tarif horaire - remise sur pièces détachées - listes des pièces d'usure considérées comme consommables; frais de déplacement)

Conclusion

Le fournisseur précisera la localisation de son Service Après Vente, les moyens en personnels qui y sont affectés, ainsi que les délais moyens d'intervention constatés, pour les principales opérations susceptibles d'en nécessiter l'implication.

3. 3 FORMATION DU PERSONNEL

La formation des futurs utilisateurs du système, aux diverses phases de manipulation, à l'utilisation du logiciel informatique et aux opérations de maintenance courante relevant de leur compétence devra être assurée sur le site de l'Hôtel Dieu.

La formation d'un minimum sur site de deux biologistes et de trois techniciens à une utilisation approfondie de toutes les possibilités du système notamment la résolution des pannes accessibles au personnel de laboratoire et l'exploitation des données générées par le système, devra être assurée, soit dans le cadre du CHU de Nantes, soit au sein des structures de formation du fournisseur, qui en supportera alors l'intégralité de la charge financière (acheminement - hébergement - enseignement).

Les manuels d'utilisation seront rédigés en langue française et livrés avec l'équipement.

Les tâches d'archivage et de sauvegarde des données informatiques incombant obligatoirement au technicien du laboratoire, le candidat se donnera les moyens, à l'occasion de la mise en œuvre du système de mettre en place un schéma opérationnel afin de garantir le bon déroulement de chacune de ces étapes tout au long de la vie du système.

3. 4 NOTIONS D'EVOLUTIVITE DU MATERIEL

Le fournisseur présentera, dans son offre, les évolutions technologiques connues ou envisagées pour les trois années suivant la livraison de l'équipement.

Article 4 : CONTRAINTES D'INSTALLATION :

Il est demandé au candidat :

- a) un plan d'implantation, sur lequel figureront la position du matériel, son repérage ainsi qu'une légende définissant chaque matériel et les aménagements techniques nécessaires.
- b) une note et un schéma explicatif de l'implantation proposée
- c) un programme détaillé d'acheminement du matériel dans les locaux prévus

Aménagements techniques

Le candidat devra faire connaître, de manière très précise, les conditions auxquelles devront répondre les locaux où seront installés les appareils, notamment en terme de :

Génie civil

- les charges au sol (surfaciées et ponctuelles pour chaque élément) avec leurs points de répartition
- plans de réservation

Conclusion

Génie climatique (indiquer ces paramètres par salle) :

- les dissipations calorifiques instantanées, unitaires et totales maximales à prendre en compte, température, gradient de température).
- le taux d'hygrométrie, gradient maximale d'hygrométrie
- le type de ventilation et de climatisation préconisé.

Génie électrique :

- la puissance électrique nécessaire à l'équipement en régime stabilisé et en appel de puissance (schéma des arrivées avec protection à charge du CHR).
- la variation de fréquences admissibles.
- les sections des câbles nécessaires.
- le nombre de phases.

Le candidat s'assurera de la capacité et de la qualité du câble force arrivant dans le local.

Génie hydraulique :

- Les caractéristiques d'arrivée d'eau (pression, TH, T°, filtration souhaitée)

Article 5 : DEMONSTRATION EXPOSITION / NATURE DES ESSAIS :

5-1 DEMONSTRATION

Le candidat devra prévoir la fourniture des équipements proposés aux fins de démonstration ou l'organisation d'un visite d'un site équipé avec le matériel proposé.

La mise à disposition de cet équipement et des consommables associés, ainsi que leur enlèvement à l'issue de la période de démonstration, est à la charge exclusive des candidats.

Chaque candidat est responsable de ses équipements.

5-2 NATURE DES ESSAIS

Médicaments : Tacrolimus et Sirolimus dans le sang total
selon une méthode fournie

Toxicologie : détection de différentes Benzodiazépines et leurs métabolites
mesure en milieu aqueux pour une application dans les urines

Acides Aminés :

Article 6 : RENSEIGNEMENTS COMPLEMENTAIRES :

Pour obtenir tous renseignements complémentaires, les candidats pourront contacter :

Conclusion

Pour la partie utilisateurs :

Dr Marie France KERGUERIS----- Tél. 02 40 08 40 95

Pour la partie administrative :

M. Bernard BENSADOUN----- Tél. 02 40 08 41 13

----- Fax. 02 40 08 42 66

ANNEXE 2

Nature des Essais

Ce type de matériel devrait nous permettre le dosage de différents médicaments pour lesquels :

- la sensibilité de la détection UV est insuffisante
- ou pour tenter la mesure en milieu biologique complexe dans le but d'écourter la préparation des échantillons

Nous avons choisi pour les essais :

Médicaments : Tacrolimus et Sirolimus dans le sang total
après simple déprotéinisation selon une méthode
proposée

Toxicologie : détection de différentes Benzodiazépines et leurs
métabolites
mesure en milieu aqueux pour une application dans les
urines

Autres essais d'application biochimique :

- Acides Aminés :**
- Homocystéine
 - Asparagine
 - Sérums avec et sans surcharge des acides aminés
 - Urines avec et sans surcharge des acides aminés

Les produits de référence seront fournis lors des essais

Ces essais prendrons en compte la sensibilité analytique ainsi que le temps passé pour la préparation des échantillons, le temps machine et l'exploitation des résultats.

**UNIVERSITE DE NANTES
FACULTE DE PHARMACIE**

Année de Soutenance : 2004

Nom – Prénoms : BAUDIMENT Cécile, Simone, Odette

**Titre de la Thèse : Procédures technique, administrative et commerciale en vue de l'acquisition d'un matériel analytique.
Application : intégration d'un spectromètre de masse au laboratoire de pharmacologie/toxicologie du CHU de Nantes.**

Résumé de la Thèse :

L'utilisation du couplage spectrométrie de masse en tandem/Chromatographie Liquide Haute Performance (LC/MS/MS) en biologie médicale remonte au milieu des années 1980. Cette technique analytique est actuellement plébiscitée par les biologistes hospitaliers qui la considèrent comme une alternative ou une référence intéressante pour le dosage de nombreuses biomolécules.

Dans ce contexte, le CHU de Nantes mène une réflexion sur l'acquisition d'un appareil LC/MS/MS dont la motivation analytique est essentiellement le dosage des immunosuppresseurs. Ce travail propose une vue d'ensemble des procédures technique, commerciale et administrative engagées lors de l'achat d'un équipement analytique lourd en milieu hospitalier. Il est question de l'analyse des besoins et de la présentation de la genèse du projet. Les différentes technologies sont décrites avec l'étude de marché dans laquelle les enjeux financiers sont évalués. Les essais techniques sont abordés ainsi que les modalités administratives inhérentes à un tel achat.

MOTS CLES : SPECTROMETRE DE MASSE, COUPLAGE CHROMATOGRAPHIE LIQUIDE, ETUDE DE MARCHE, ESSAIS TECHNIQUES, APPEL D'OFFRES

JURY

PRESIDENT :Monsieur Alain PINEAU, Professeur de Toxicologie, Doyen de la Faculté de pharmacie de Nantes

ASSESEURS :Monsieur Patrick LUSTENBERGER, Professeur de Biochimie, Faculté de médecine de Nantes et, Directeur du Pôle de Biologie Hôtel Dieu, CHU de Nantes

Monsieur Alain TRUCHAUD, Professeur de Technologie biomédicale, Faculté de pharmacie, Nantes

Monsieur Bernard BENSADOUN, Ingénieur des laboratoires, responsable des achats du Pôle de Biologie Hôtel Dieu, CHU de Nantes

Adresse de l'auteur : 41, Rue de l'Allouée, 44 100 Nantes