



Frédéric PONT¹, Laurent VIENNET², Sophie REGAZZONI², Raymond LOYER³.

Comparaison automatique de chromatogrammes complexes assistée par ordinateur en CPG et HPLC. Application au contrôle de qualité dans l'industrie des parfums et à la protéomique

RÉSUMÉ

Le logiciel GC-LC CONCORDANCE permet d'automatiser les comparaisons de chromatogrammes de produits complexes, jusqu'à 1000 composants dans un mélange, en compensant simultanément les décalages et fluctuations aléatoires des temps de rétention de leurs composants, dus au vieillissement des phases des colonnes et à l'appareillage en général. Nous présentons dans cet article deux exemples d'applications permettant d'évaluer les capacités et l'intérêt de ce logiciel. Le premier porte sur le suivi, par chromatographie en phase gazeuse, de produits dans un contrôle qualité d'échantillons de compositions parfumées. L'échantillon d'un lot qui présente une anomalie est détecté automatiquement par le logiciel. La seconde application illustre un problème plus complexe, la séparation par chromatographie liquide haute performance d'extraits protéiques, issus du fractionnement du protéome cellulaire par chromatofocalisation. Des chromatogrammes très complexes ont été obtenus, intégrés par un logiciel de chromatographie standard, ils ont ensuite été traités par GC-LC CONCORDANCE afin de résoudre les décalages systématiques des pics. Des déformations locales des chromatogrammes sont plus délicates à analyser. Fixer manuellement des pics permet au logiciel, dans la majorité des cas, de modéliser correctement la déformation.

MOTS-CLÉS

Chromatographie en phase gazeuse, chromatographie liquide, concordance, chromatogramme complexe, comparaison de chromatogrammes, empreinte chromatographique, HPLC bidimensionnelle

Computer assisted comparison of complex chromatograms in gas and liquid chromatography. Application to quality control and proteomics

SUMMARY

The GC-LC CONCORDANCE software was designed to automatically compare complex chromatograms, up to 1000 compounds in a mixture, and automatically correct time shifts due to column degradation. We present in this article two applications in order to evaluate its functionalities and interest. The first is based on the quality control of perfume samples. A sample containing an abnormality was automatically detected by the software GC-LC CONCORDANCE. The second application, the separation by high performance liquid chromatography of cells protein extracts fractionated by chromatofocusing, illustrates a tougher problem. Complex chromatograms were obtained, integrated by a chromatography software and then analysed by GC-LC CONCORDANCE. The software managed to detect systematic peaks shifts in the chromatograms. Local chromatogram alterations were more difficult to analyse. In most cases the problem could be solved by manual peak picking.

KEYWORDS

Gas chromatography, liquid chromatography, concordance, complex chromatogram, comparison of chromatograms, chromatography print, match chromatograms, two dimensional HPLC

I - Introduction

Par la complexité des produits naturels entrant dans la fabrication des parfums, arômes et des huiles essentielles, l'industrie de la parfumerie a été pionnière dans l'utilisation de la chromatographie en phase gazeuse capillaire. Elle bénéficie toujours des dernières avancées de cette technique avec la mise en œuvre de séparation en chromatographie en phase gazeuse bidimensionnelle (CGxCG) sur des colonnes de plus en plus performantes, et l'utilisation de détections par spectrométrie de masse, ceci afin d'améliorer les

rendements des laboratoires de contrôle qualité.

Pourtant, devant les variations subtiles des chromatogrammes complexes de plusieurs dizaines ou centaines de pics, le contrôle par l'empreinte chromatographique des échantillons restait jusqu'alors manuel. L'analyste contrôlait visuellement, pic après pic, le chromatogramme de son échantillon par rapport à son témoin.

Aujourd'hui, la puissance de l'outil informatique associé à un logiciel spécifique peuvent permettre un traitement automatique de ces variations aléatoires tout en améliorant la qualité, la précision et la

¹INSERM – Institut Claude de Préal – IFR30, Plateau de spectrométrie de masse – Toulouse F-31300

²FRAGRANCE-RESSOURCES – Z.I. Bois de Grasse – 208, av. Louison Bobet – 06334 Grasse

³SPECTROCHROM, 2038 rue Victor Gelu – Domaine de La Salle – Bouc Bel Air 13320 – Tél : 04 42 22 96 34 – E-mail : raymond.loyer@spectrochrom.com



FICHE D'APPLICATION

REMERCIEMENTS
Les analyses de protéines ont été possibles grâce à l'aide d'Elsa Suberbielle qui a effectué la culture des cellules ; ce travail a bénéficié du support de la Région Midi-Pyrénées, de la Génopôle Toulouse Midi-Pyrénées et de la Cancéropôle Grand-Sud-Ouest.

rapidité du contrôle.

La chromatographie liquide à haute performance également, n'a cessé d'évoluer depuis son apparition dans les années 1970. La tendance actuelle est de diminuer la taille des particules (2 µm ou moins) des phases stationnaires, de travailler à haute température et à haute pression afin d'obtenir à la fois une haute résolution et un haut débit d'analyse. La comparaison entre les phases classiques et les phases de faible granulométrie a montré qu'il était possible d'obtenir un gain substantiel en performance en travaillant avec des colonnes à faible taille de particules (1, 2).

La séparation des protéines bénéficie également des avancées de ces colonnes à faible taille de particules. Les colonnes non poreuses (3, 4) sont particulièrement adaptées à la séparation de mélanges complexes. L'absence de porosité évite les phénomènes de diffusion, accélère les cinétiques de transferts et permet une récupération des protéines avec un haut rendement. La protéomique est particulièrement friande de techniques séparatives. L'étude des protéomes se heurte à la complexité de la machine cellulaire avec ses milliers de formes protéiques. Le fractionnement des échantillons biologiques se révèle nécessaire afin de réduire leur complexité avant une analyse par spectrométrie de masse.

À côté des approches qui mettent en œuvre l'électrophorèse monodimensionnelle et bidimensionnelle, il existe des stratégies basées sur la chromatographie liquide bidimensionnelle des protéines et des peptides. Une comparaison des performances de ces techniques montre qu'elles sont clairement complémentaires (5).

La séparation d'un grand nombre de molécules avec une haute résolution n'est pas réservée à la chromatographie gazeuse. Une des applications présentées dans cet article rapporte une utilisation de la chromatographie liquide bidimensionnelle pour fractionner un mélange extrêmement complexe : le protéome cellulaire. L'utilisation d'un logiciel de reconnaissance automatique de pics dans ce contexte expérimental permet de confronter celui-ci à un problème particulièrement difficile.

II - Première application : contrôle de qualité d'échantillons de compositions parfumées

1. Matériel et méthodes

Des flacons remplis de solutions parfumantes liquides diluées au 1/10 dans l'acétate d'éthyle ont été directement disposés sur le passeur automatique d'un chromatographe 6890N GC (Agilent Technologies, Santa Clara, États-Unis). La méthode a été programmée sur le logiciel ChemStation (Agilent Technologies) qui pilote le chromatographe. Le volume d'échantillon injecté est de 1,0 µl dans un injecteur en mode split chauffé à 250 °C sur lequel ont été montées deux colonnes capillaires de 60 m 250 µm x 0,50 µm, l'une polaire type Carbowax® 20 M, l'autre apo-

laire de type Méthylsilicone afin de ne pas manquer un composé non élué sur l'une des phases. Le gaz porteur utilisé est de l'hydrogène. Le programme de chauffage du four est le suivant : initialement chauffé à 80 °C sa température a été programmée pour atteindre les 250 °C avec une rampe de 2,7 °C/min. Le signal est récupéré sur deux détecteurs à Ionisation de Flamme (FID) chauffés à 250 °C et intégré par le logiciel ChemStation. Les paramètres d'intégration des pics dans la méthode ont été réglés pour intégrer tous les pics des chromatogrammes supérieurs à 0,01. Le fichier du rapport complet d'intégration du chromatogramme est généré par le logiciel ChemStation. C'est ce fichier qui sera analysé et traité par le logiciel GC-LC CONCORDANCE.

Le traitement mathématique appliqué par le logiciel GC-LC CONCORDANCE est une méthode dite standard qui reste performante sur l'ensemble des produits contrôlés en GC. Le paramétrage de cette méthode est de 4 coïncidences par pic pour déterminer une concordance de pics sur les deux chromatogrammes dans une fenêtre dynamique de 60 pics, avec une erreur maximum dans la classe de 4 %. Le logiciel recherchera automatiquement et optimisera la meilleure équation quadratique ($n \leq 5$) avec une extrapolation des positions des pics par pas de 0,001 seconde. Ce calcul est effectué aujourd'hui en 2 secondes pour un chromatogramme d'une centaine de pics. Les seuils d'acceptation de variations des surfaces des pics ont été adaptés aux conditions du laboratoire. Le début du traitement a été fixé à partir de 6 minutes, pour s'affranchir des pics non significatifs du début du chromatogramme.

2. Résultats et discussion

La présentation des chromatogrammes échantillon et témoin (*figures 1 et 2*) montre la difficulté pour un opérateur de contrôler pic à pic l'absence ou la variation de concentration de chaque constituant des chromatogrammes. La difficulté est augmentée par le contrôle sur les petits pics. La Figure 3 présente le résultat après traitement automatique des deux chromatogrammes par le logiciel GC-LC CONCORDANCE. Bien que cette étape en contrôle qualité soit ignorée le plus souvent au profit du rapport d'analyse papier, cette représentation permet de visualiser instantanément la concordance ou non de chaque composé. Elle donne également de nombreuses informations sur les résultats des calculs utilisés par le traitement automatique : le nombre de pics communs trouvés automatiquement par le logiciel est de 26, répartis entre 0 et 74 minutes. Ce premier traitement permet de calculer la dérive des temps de rétention entre les deux chromatogrammes pour faire concorder les 104 pics. Le traitement logiciel se trouve optimisé sur une équation du deuxième ordre ($y = a_0 + a_1x + a_2x^2$ (ordre 30 max)) avec une corrélation de 0.999999778 et une précision dans le positionnement des pics sur le témoin de 0,282 seconde. Un pouvoir de résolution de 15744 pics est obtenu en théorie sur ce chromatogramme. Ce résultat permet d'apprécier la précision du traitement dans un contrôle de parfums compo-

Comparaison automatique de chromatogrammes complexes assistée par ordinateur en CPG et HPLC. Application au contrôle de qualité dans l'industrie des parfums et à la protéomique.

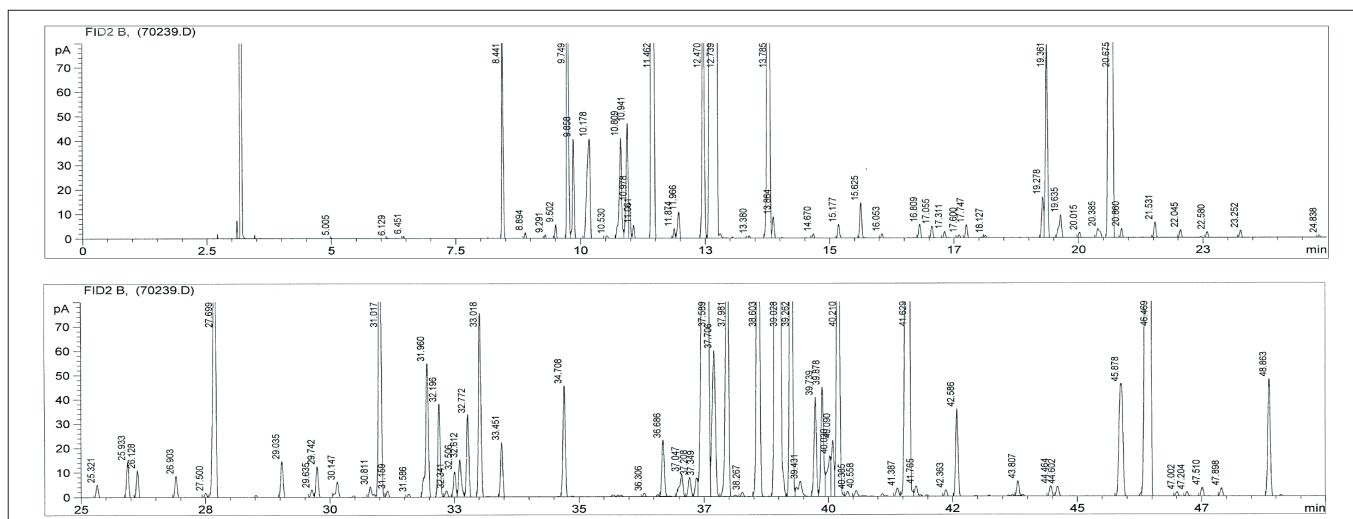


Figure 1

Chromatogramme « échantillon » de parfum obtenu par GC. Cent quatre pics ont été détectés et intégrés par le logiciel ChemStation à comparer avec le chromatogramme « témoin » de la figure 2. Une forte expansion du signal en ordonnée est utilisée pour contrôler les petits pics. On peut constater la difficulté de comparer deux chromatogrammes similaires dans le cas d'un contrôle visuel.

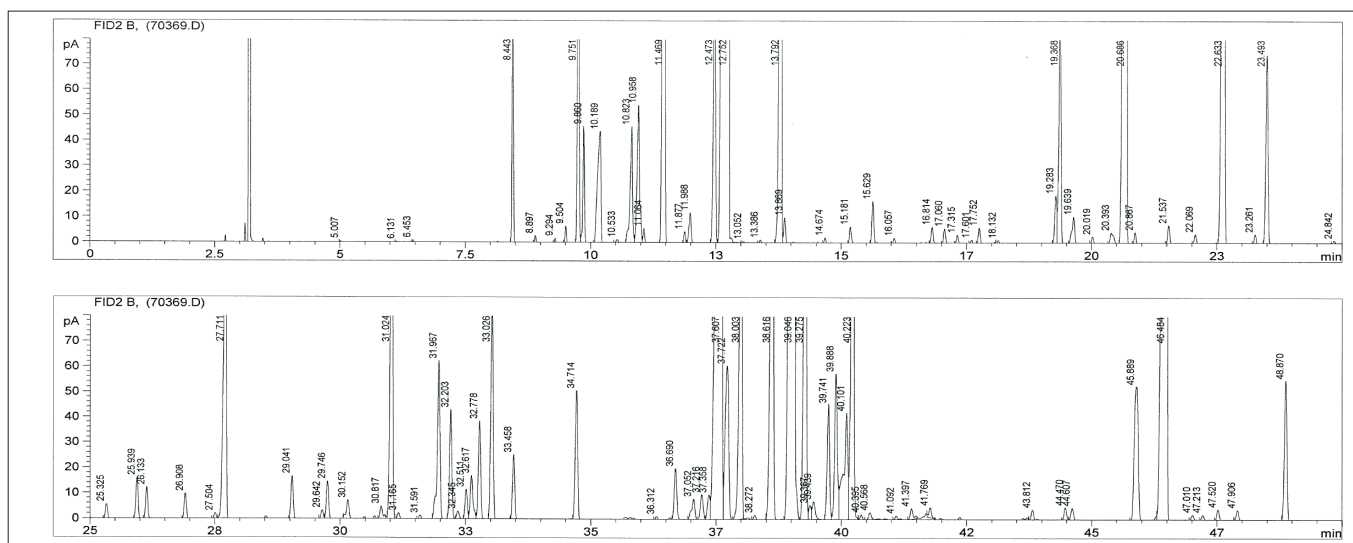


Figure 2

Chromatogramme « témoin » de parfum obtenu par CPG, à comparer avec le chromatogramme « échantillon » de la figure 1.

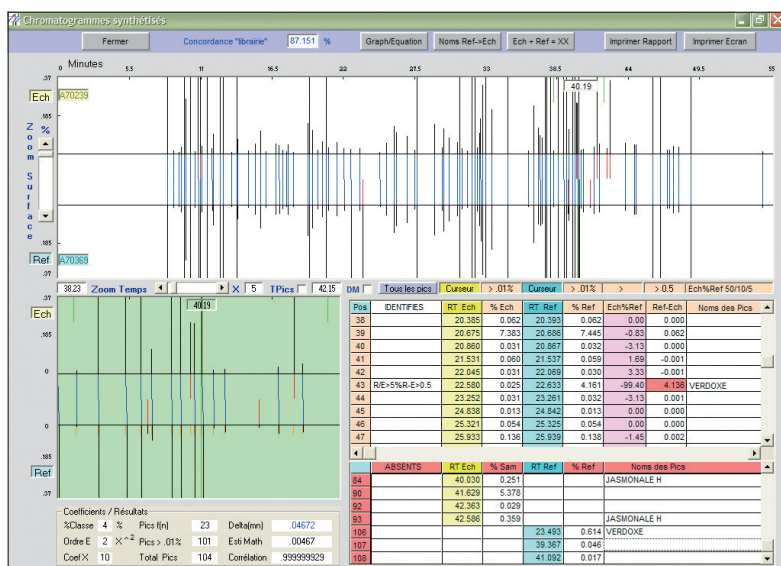


Figure 3

Représentation graphique de la concordance des 2 chromatogrammes. L'échantillon est présenté en haut du graphe, en bas le « témoin » est montré en miroir. Entre les deux axes, les traits bleus représentent les concordances des pics communs. Les marques rouges signalent les pics manquants pour l'échantillon et le témoin. Le traitement, fixé par la méthode, s'effectue entre 6 et 74 minutes. La corrélation des points de références concordants sur les deux chromatogrammes est de 0,999999778 et la précision dans le positionnement sur le témoin est de 0,47/100 minutes soit 0,282 seconde.

Le temps de calcul de concordance est inférieur à la seconde.



FICHE D'APPLICATION

RAPPORT							Analyse N° 071011_175203																									
QC Concordance en % § = 96.31																																
Ech: A70239 Réf: A70369	Surfaces		Nbre de pics		Concordance Moyennée (3 notes) 88.82																											
	93.90	96.97	99.32	95.05																												
opérateur	Titre de l'analyse	Nom de la séquence		commentaires																												
PC	APOLAIRE	PB2612_4INC		70239 REFUSE - ERREUR PESEE/COMPOSANT																												
X'n: 2	NPE: 23/104	C.Estimation: 0047	C.Correlation: 99999993	Rapport: COURT																												
RT_Ech	%Ech >0.010	RT_Ref	%Ref >0.010	Ref%Ech	%Ref-Ech >0.500	Delta/Math	Nom des composants																									
PICS IDENTIFIES HORS TOLERANCE : (0.01 - 0.1% > 50% , 0.1 - 1% > 10% , 1 - 10% > 5% , 10 - 100% > 5%)																																
10.94	0.417	10.96	0.507	<<	-17.75	0.090	.0077																									
22.58	0.025	22.63	4.161	<<	-99.40	** 4.136	.0414 #VERDOXE																									
36.69	0.235	36.69	0.185	>>	27.03	0.050	.0031																									
37.21	0.092	37.22	0.106	<<	-13.21	0.013	.0077																									
39.43	0.122	39.44	0.077	>>	58.44	0.045	.0112 ISO E																									
39.88	0.505	39.89	0.582	<<	-13.23	0.077	.0127																									
40.09	0.247	40.10	0.678	<<	-63.57	0.431	.0150 ISO E																									
43.81	0.056	43.81	0.032	>>	75.00	0.024	.0138																									
PICS MANQUANTS :																																
Sur REFERENCE																																
10.98	0.085	---	---																													
40.03	0.251	---	---	#JASMONALE H																												
41.63	5.378	---	---																													
42.36	0.029	---	---																													
42.59	0.359	---	---	#JASMONALE H																												
Sur ECHANTILLON																																
---	---	23.49	0.614	#VERDOXE																												
---	---	39.37	0.046																													
---	---	41.09	0.017																													
<table border="0"> <tr> <td>Total PI = 93.884 %</td> <td>99.302 %</td> <td>96 pics concordants (8 PI-HT)</td> <td>></td> <td>0.010 %</td> </tr> <tr> <td>Total PM= 6.101 % (5) pics</td> <td>0.678 % (3) pics</td> <td>RATIO PI(ref) / PI(ech)</td> <td>=</td> <td>1.0577</td> </tr> <tr> <td>PI + PM = 99.986 %</td> <td>99.980 %</td> <td>PI(ech) * 100 / PI(ref)+ PM(ref) (K)</td> <td>=</td> <td>93.9</td> </tr> <tr> <td>Reste = 0.014 %</td> <td>0.020 %</td> <td>PI(ref) * 100 / PI(ech)+ PM(ech)</td> <td>=</td> <td>99.32</td> </tr> <tr> <td colspan="2"></td> <td>E = (100 - (S(%Ref-Ech)+S(PM))) / 100 =</td> <td colspan="2">0.884</td> </tr> </table>								Total PI = 93.884 %	99.302 %	96 pics concordants (8 PI-HT)	>	0.010 %	Total PM= 6.101 % (5) pics	0.678 % (3) pics	RATIO PI(ref) / PI(ech)	=	1.0577	PI + PM = 99.986 %	99.980 %	PI(ech) * 100 / PI(ref)+ PM(ref) (K)	=	93.9	Reste = 0.014 %	0.020 %	PI(ref) * 100 / PI(ech)+ PM(ech)	=	99.32			E = (100 - (S(%Ref-Ech)+S(PM))) / 100 =	0.884	
Total PI = 93.884 %	99.302 %	96 pics concordants (8 PI-HT)	>	0.010 %																												
Total PM= 6.101 % (5) pics	0.678 % (3) pics	RATIO PI(ref) / PI(ech)	=	1.0577																												
PI + PM = 99.986 %	99.980 %	PI(ech) * 100 / PI(ref)+ PM(ref) (K)	=	93.9																												
Reste = 0.014 %	0.020 %	PI(ref) * 100 / PI(ech)+ PM(ech)	=	99.32																												
		E = (100 - (S(%Ref-Ech)+S(PM))) / 100 =	0.884																													
Note Librairie (100 - (S(%Ref-Ech)+ S PM)) =				87.151																												
				Note ECHANTILLON (E * K) =																												
				83.010																												
APPROUVE par : _____ Signature : _____ Date : 03/11/2007																																
03/11/2007 15:31:12		Page 1		Analyse N°: 071011_175203																												

Figure 4

Bulletin correspondant au résultat d'analyse par CPG d'un échantillon de parfum présentant une anomalie. Ce rapport fourni par GC-LC-CONCORDANCE, signale les différences trouvées entre l'échantillon et le témoin. De nombreuses lignes rouges dans le corps du document peuvent constituer une alerte visuelle directe relative à un problème avec l'échantillon.

tant entre 10 et 400 constituants (pics). Le rapport d'analyse de l'échantillon d'une composition parfumée de 104 pics présentant une anomalie est présenté en Figure 4. La lecture de ce rapport permet de relever de façon aisée plusieurs éléments d'informations importants.

En premier lieu, la valeur de la « Concordance Moyennée sur 3 notes », 88,82 %, indiquée en haut à gauche peut signifier rapidement un problème sur cet échantillon, cet élément est confirmé par de nombreuses lignes rouges dans le corps du rapport.

Dans cette partie centrale « PICS IDENTIFIES HORS TOLERANCE », la ligne mise en évidence en rouge apparaît significative. En effet, le produit VERDOXE mesuré à 4,161 % dans le témoin à 22,63 min n'est présent dans l'échantillon qu'à l'état de trace (0,025 %).

Second point, dans la partie « PICS MANQUANTS » du rapport, un pic à 41,63 min, dosé à 5,378 % apparaît dans l'échantillon et manque dans le témoin. Un autre pic de VERDOXE à 23,49 min est absent dans l'échantillon. Le constat est immédiat, le VERDOXE (acétate de 2-tert-butylcyclohexyle, CAS N°88-41-5) a été remplacé par un autre produit. Il n'a pas été possible dans cette étude d'identifier ce produit étranger. En effet, le temps de rétention d'un composé chimique sortant sur un type de colonne n'est pas suffisant pour l'identifier. Quoi qu'il en soit la connaissance des produits utilisés dans les compositions commercialisées par la société a permis de déterminer rapidement que le VERDOXE a été effectivement remplacé, par erreur, par du JASMONALE H (a-Hexylcinnamic aldéhyde CAS N°101-86-0). De plus, on notera qu'une

Comparaison automatique de chromatogrammes complexes assistée par ordinateur en CPG et HPLC. Application au contrôle de qualité dans l'industrie des parfums et à la protéomique.

nouvelle fonctionnalité du logiciel peut permettre cette identification en s'appuyant sur le calcul des indices de rétention (indices de Kovats) à partir des temps de rétention et en confrontant les résultats obtenus au contenu d'une bibliothèque d'indices spécifiques.

III - Seconde application : séparation d'extraits protéiques issus du fractionnement du protéome cellulaire par chromatofocalisation

1. Matériel et méthode

1.1- Culture cellulaire

Des cellules Vero NK ont été entretenues dans du milieu DMeM (Invitrogen, Carlsbad, Etats-Unis), 10 % SVF gold (PAA) avec Bufferall (Sigma-Aldrich, St-Louis, Etats-Unis) jusqu'à atteindre la confluence. Cent quarante millions de cellules ont été collectées dans du PBS à l'aide d'un grattoir et centrifugées 5 minutes à 1100 rpm, avant d'être lavées une nouvelle fois dans du PBS pour éliminer toute trace de sérum.

1.2- Lyse des cellules et échange des tampons

Les cellules collectées ont été utilisées afin de préparer les extraits protéiques. Un extrait total de protéine a été préparé selon la procédure de lyse des cellules humaines recommandée par la société Beckman Coulter dans le cadre de l'utilisation du système de fractionnement ProteomLab™ PF 2D (Beckman Coulter, Fullerton, Etats-Unis). Après centrifugation 5 minutes à 1100 rpm, les cellules ont été resuspendues dans le tampon de lyse contenant : 6M d'urée, 2M de thiourée, 10 % de glycérol, 50mM de Tris-HCl, 2 % de n-octylglucoside et 1mM d'inhibiteurs de protéase. Les cellules sont ultracentrifugées (>20000g, 60 min, 18 °C), le surnageant est stocké à -80 °C. Avant l'analyse, l'extrait protéique est décongelé et l'échange entre le tampon de lyse et le tampon de première dimension est effectué sur une colonne PD-10 G25 (Amersham Biosciences, Piscataway, Etats-Unis).

1.3- Séparation des protéines en première dimension : chromatofocalisation

Les séparations sont effectuées sur ProteomLab™ PF 2D. La séparation des protéines en première dimension ou chromatofocalisation est effectuée sur une colonne HPCF-1D (250 x 2,1 mm) (Beckman Coulter). Le système ProteomLab™ PF 2D est constitué de deux

HPLC, deux détecteurs UV, d'un collecteur-injecteur de fraction entre les deux HPLC et d'un collecteur de fraction après la seconde HPLC. La colonne HPCF-1D est équilibrée avec le tampon de départ, start buffer (Beckman Coulter) ajusté à pH 8,5. Après équilibration, 1,5 mg d'extrait protéique est injecté sur la colonne. L'élution des protéines est effectuée à l'aide d'un tampon d'élution, elution buffer (Beckman Coulter) ajusté à pH 4. Un gradient linéaire de pH est alors généré sur la colonne, et les protéines sont éluées séquentiellement en fonction de leur point isoélectrique. Les protéines sont collectées toutes les 0,3 unités de pH de 8,5 à 4,0 sur une plaque de 96 puits.

1.4- Séparation des protéines en deuxième dimension : NPS-RP-HPLC

Après la chromatofocalisation, les protéines collectées en première dimension sont séparées par NPS-RP-HPLC (nonporous reversed-phase HPLC). Une séparation très résolutive des protéines est effectuée sur une colonne de 4,6 x 33 mm contenant une phase ODS constituée de billes de silice non poreuse de 1,5 µm de diamètre (Beckman Coulter). La séparation est effectuée à 50 °C à 0,75 mL/min et le signal UV est enregistré à 214 nm. La phase mobile est constituée d'eau avec 0,1 % de TFA (A) et d'acétonitrile avec 0,08 % de TFA (B). Le gradient est le suivant : 0 % de B pendant 2 min, 0-100 % de B en 30 minutes.

Afin de tester la reconnaissance automatique des pics, des extraits protéiques issus de la première dimension ont été réinjectés plusieurs fois en seconde dimension. La fraction correspondant à un point isoélectrique entre 6,8-7,1 a été réinjectée, ainsi que la fraction non retenue sur la colonne de chromatofocalisation contenant toutes les protéines dont le point isoélectrique est supérieur à 8,5.

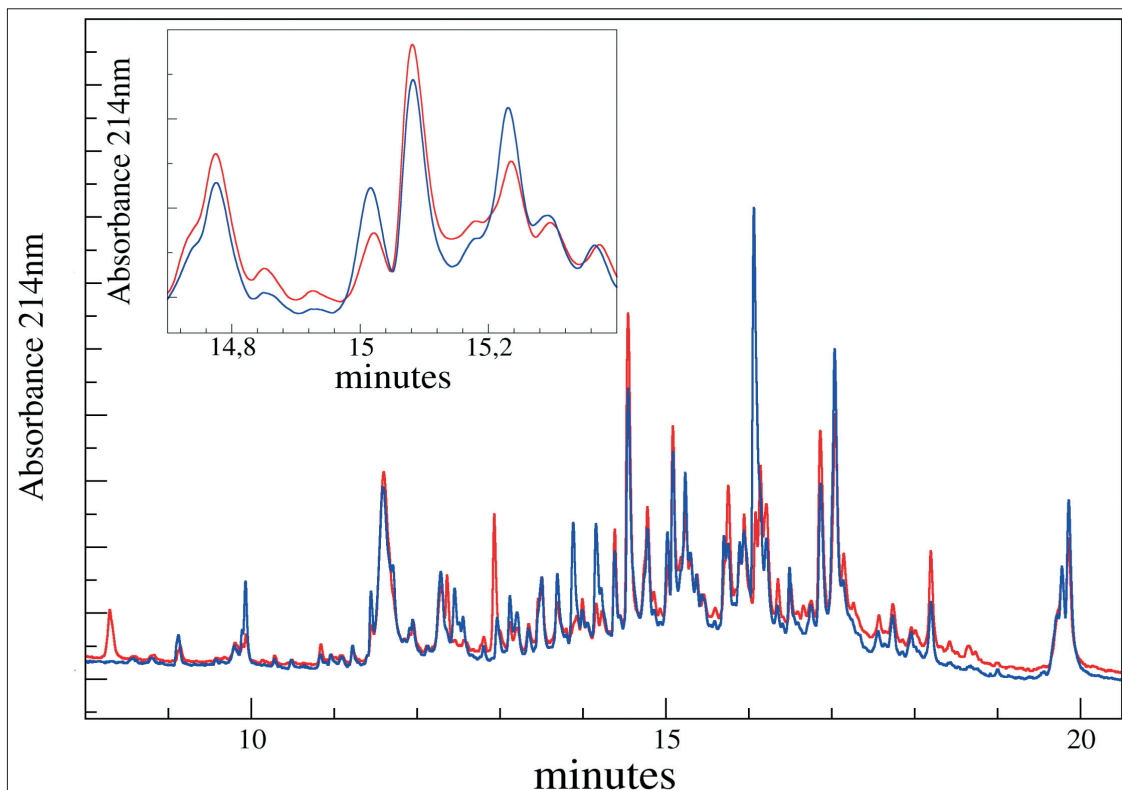
1.5 - Analyse des chromatogrammes

Les chromatogrammes obtenus en seconde dimension ont été intégrés à l'aide du logiciel 32 Karat™ (Beckman Coulter). Le paramètre « shoulder sensitivity » a été réglé à 500. Ce paramètre contrôle la détection des épaulements. Plus la valeur de ce paramètre augmente, plus la sensibilité de détection des épaulements diminue. Une valeur de 500 permet d'éviter un découpage excessif du chromatogramme sachant que dans ce cas particulier la majorité des pics présentait des épaulements. Les pics sont ensuite exportés dans un fichier texte puis repris dans le logiciel GC-LC CONCORDANCE. L'erreur aléatoire sur le temps de rétention pour la recherche automatique des pics a été réglée entre 3 et 10 %, alors que la valeur par défaut était de 5 %.



FICHE D'APPLICATION

Figure 5
Séparation sur une colonne C18 non poreuse (taille de particules 1,5 μm) d'un extrait complexe de protéines dont le point isoélectrique se situe entre 6,0 et 6,25. Les protéines, issues de deux lignées de cellules cancéreuses (6) (en rouge et en bleu), ont été fractionnées au préalable par chromatofocalisation. L'agrandissement montre une bonne reproductibilité et une haute résolution de la séparation avec des pics dont la largeur se situe entre 3 et 5 secondes.



2. Résultats et discussion

2.1- Qualité des chromatogrammes

La chromatographie liquide en deux dimensions, basée sur une étape de chromatofocalisation et de chromatographie en phase inverse, permet de simplifier fortement un mélange de protéines avant son analyse en spectrométrie de masse. Les colonnes non poreuses C18 de taille de particules 1,5 μm jouent un rôle essentiel dans la qualité finale du fractionnement. Il est possible d'obtenir avec ces colonnes des pics fins de quelques secondes seulement (*figure 5*). Cependant, la complexité du mélange de départ est telle que, même en travaillant sur un sous-protéome, on observe des coélutions. C'est le cas sur les chromatogrammes (*figure 5*) obtenus en séparant les protéines cytosoliques de deux lignées de cellules cancéreuses (6). Pour éliminer les coélutions, il serait nécessaire d'augmenter le nombre de dimensions chromatographiques.

Cette solution apparaît réalisable en chromatographie liquide mais le nombre de fractions à gérer devient problématique. Et, de fait, une approche fondée sur une séparation 2D puis une étape de séparation des peptides par couplage nano-LC et spectrométrie de masse est généralement privilégiée.

La gamme dynamique des chromatogrammes obtenus en seconde dimension est d'environ 10^3 , il apparaît en effet possible de travailler sur des quantités de protéine situées dans une fourchette allant de ng au μg (4).

2.2- Analyse automatique de chromatogrammes complexes concordants

Selon le point isoélectrique des protéines séparées en première dimension, les fractions sont d'une complexité variable. La fraction utilisée dans le chromatogramme (*figure 6*), est constituée de protéines dont le point isoélectrique est situé entre 6,8 et 7,1. Le chromatogramme présente une trentaine de pics en seconde dimension. Il ne faut pas cependant se fier à l'apparente simplicité de ce chromatogramme, car on sait qu'il est possible d'identifier plus de 20 protéines dans les pics de grande taille. L'injection renouvelée de cette fraction a permis d'obtenir des résultats présentant une répétabilité satisfaisante et malgré la présence de coélutions, l'intégration des pics a également abouti à des résultats répétables.

L'analyse de ces chromatogrammes par GC-LC CONCORDANCE n'a posé aucun problème et la concordance des pics est de 100 %, sans contrainte de surface.

2.3- Analyse automatique de chromatogrammes complexes discordants

Pour augmenter encore la complexité du mélange de protéines analysées, la fraction des protéines non retenues en première dimension a été injectée en seconde dimension. Cette fraction contient donc toutes les protéines caractérisées par un point isoélectrique

Comparaison automatique de chromatogrammes complexes assistée par ordinateur en CPG et HPLC. Application au contrôle de qualité dans l'industrie des parfums et à la protéomique.

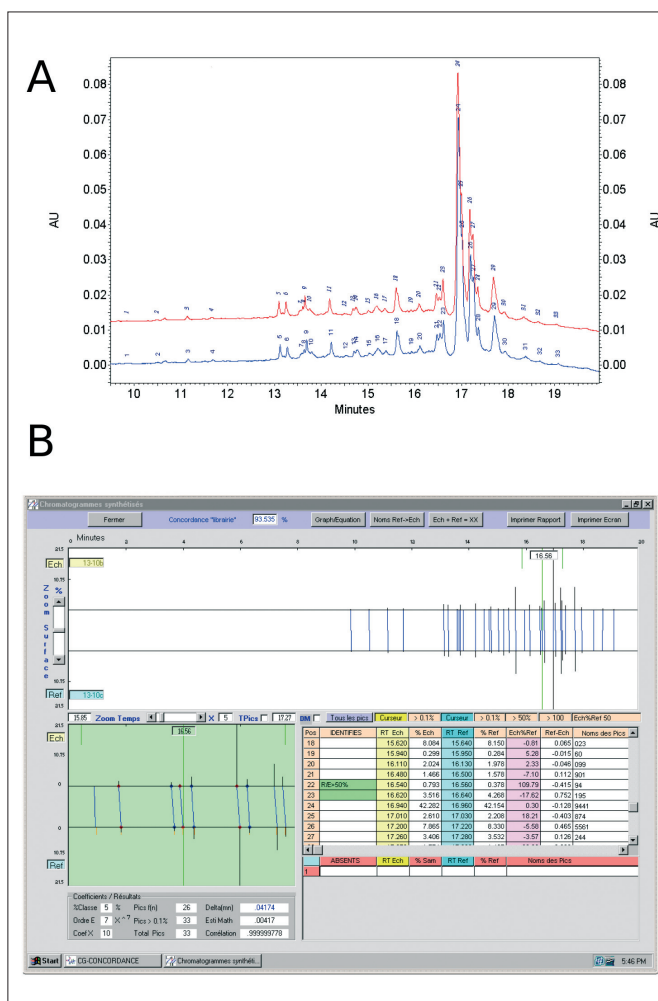


Figure 6

Chromatogrammes simples d'une trentaine de pics (A) obtenus en réinjectant deux fois sur une colonne C18 non poreuse (taille de particules 1,5 μm) un mélange de protéines de point isoélectrique entre 6,8 et 7,1, préparé à partir d'un extrait cellulaire fractionné par chromatofocalisation. Les chromatogrammes ont été soumis à une analyse informatique permettant de détecter les concordances entre les pics. Les pics une fois intégrés, sont convertis en histogrammes proportionnels à leur surface. Les deux histogrammes en miroir (en noir) correspondant aux deux chromatogrammes, sont représentés en haut de la capture d'écran (B). L'analyse informatique de ces chromatogrammes montre une concordance parfaite entre les pics, matérialisée par les lignes bleues reliant les histogrammes.

supérieur au pH du tampon de départ, c'est-à-dire 8,5. Des chromatogrammes présentant un décalage et des discordances ont été choisis. On remarque (figure 7) que les pics sont décalés et que la richesse du mélange est telle que la plupart des pics n'atteignent pas la ligne de base. Lorsque des chromatogrammes de ce type sont analysés par le logiciel, il est souvent nécessaire de revenir à l'intégration initiale. En effet, la présence d'épaulements sur la plupart des pics est particulièrement difficile à intégrer. Un épaulement peut être

détecté sur un chromatogramme et pas sur l'autre conduisant à une discordance immédiatement détectée par le logiciel GC-LC CONCORDANCE. L'analyse de ce type de chromatogramme par le logiciel est possible, mais nécessite un réglage fin de l'erreur sur les temps de rétention. En outre, comme dans le cas des chromatogrammes de la Figure 7, où l'équation de variation des pics est très complexe, il peut se révéler nécessaire de fixer manuellement des concordances, si le chromatogramme présente des déformations. L'origine de ces déforma-

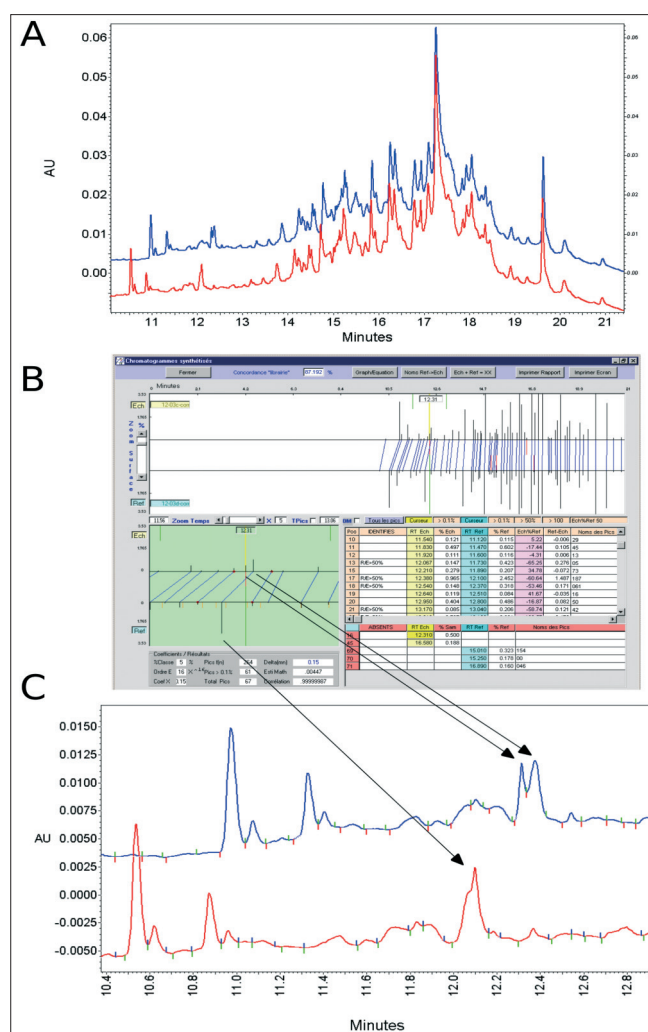
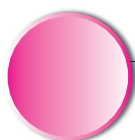


Figure 7

Chromatogrammes complexes comportant plus de 80 pics sur une dizaine de minutes (A) obtenus en réinjectant deux fois sur une colonne C18 non poreuse (taille de particules 1,5 μm) un mélange de protéines préparé à partir d'un extrait cellulaire fractionné par chromatofocalisation. Les chromatogrammes ont été soumis à une analyse informatique permettant de détecter les concordances entre les pics. Les pics une fois intégrés, sont convertis en histogrammes proportionnels à la surface des pics. Les deux histogrammes en miroir (en noir), correspondant aux deux chromatogrammes, sont représentés en haut de la capture d'écran (B). Les pics concordants sont reliés par des lignes bleues, les pics non concordants sont repérés par un trait rouge. L'analyse informatique de ces chromatogrammes montre comment le logiciel a géré le décalage des chromatogrammes (B). Le logiciel a également détecté une discordance due à un pic dédoublé sur le chromatogramme bleu puisque l'épaulement correspondant sur le chromatogramme rouge n'a pas été intégré (C).



FICHE D'APPLICATION

tions est probablement due à de légères variations du gradient. En effet, en HPLC, un gradient obtenu par un mélange de solvants, n'est pas aussi simple à réguler que la température et/ou la pression d'un appareil de chromatographie en phase gazeuse. En procédant de la sorte, on peut voir qu'il est possible de compenser des différences de temps de rétention, tout en conservant la capacité à détecter des discordances. Dans le cas des chromatogrammes de la Figure 7, la concordance obtenue était légèrement supérieure à 95 %, sans contrainte de surface. Les exemples cités précédemment concernent des études de répétabilité. Le programme a été utilisé pour comparer des chromatogrammes provenant d'expériences de 2D-LC distinctes. Les chromatogrammes obtenus ont généralement plus de différences que dans les exemples ci-dessus car on cumule les étapes de chromatographie liquide et de préparation des échantillons. On retrouve les trois situations décrites précédemment : des chromatogrammes parfaitement alignés, des chromatogrammes globalement décalés et des chromatogrammes présentant de grandes déformations partielles et aléatoires. Cette dernière situation étant la plus délicate à gérer. En effet, le programme s'accommode bien d'un décalage sur l'ensemble des chromatogrammes, en suivant des lois de régressions linéaires ou quadratiques « régulières ».

BIBLIOGRAPHIE

- (1) NOVÁKOVÁ L., SOLICHOVÁ D., SOLICH P., Advantages of ultra performance liquid chromatography over high-performance liquid chromatography: comparison of different analytical approaches during analysis of diclofenac gel, *J. Sep. Sci.*, 2006, 29, 2433-2443.
- (2) WU N., CLAUSEN AM, Fundamental and practical aspects of ultrahigh pressure liquid chromatography for fast separations, *J. Sep. Sci.*, 2007, 30, 1167-1182.
- (3) ITOH H., NIMURA N., KINOSHITA T., NAGAE N., NOMURA M., Fast protein separation by reversed-phase high-performance liquid chromatography on octadecylsilyl-bonded nonporous silica gel. ii. improvement in recovery of hydrophobic proteins. *Anal. Biochem.*, 1991, 199, 7-10.
- (4) DAULY C., PERLMAN DH, COSTELLO CE, MCCOMB ME, Protein separation and characterization by np-rp-hplc followed by intact maldi-tof mass spectrometry and peptide mass mapping analyses. *J. Proteome Res.*, 2006, 5, 1688-1700.
- (5) LI X., GONG Y., WANG Y., WU S., CAI Y., HE P., LU Z., YING W., ZHANG Y., JIAO L., HE H., ZHANG Z., HE F., ZHAO X., QIAN X., Comparison of alternative analytical techniques for the characterisation of the human serum proteome in hupo plasma proteome project. *Proteomics*, 2005, 5, 3423-3441.
- (6) CUSSAC D., PICHEREAUX C., COLOMBA A., CAPILLA F., PONT F., GAITS-IACOVONIF, LAMANT L., ESPINOS E., BURLET-SCHILTZ O., MONSARRAT B., DELSOL G., PAYRASTRE, B., Proteomic analysis of anaplastic lymphoma cell lines : identification of potential tumour markers. *Proteomics*, 2006, 6, 3210-3222.

IV - Conclusion

Le premier exemple présenté dans cet article a permis de démontrer l'utilité du logiciel pour la modélisation des variations aléatoires due au vieillissement graduel des phases des colonnes capillaires. Ce logiciel apporte de la sorte une solution automatisée et innovante pour les laboratoires de contrôle qualité dans l'industrie des parfums. Le second exemple, l'analyse de chromatogrammes des extraits de protéiques cellulaires, présentant de nombreuses coélutions, illustre un problème plus difficile à résoudre. Avant même l'utilisation du logiciel de concordance de pics, la détection automatique de ces pics par un logiciel d'intégration standard montre ses limites lorsque des épaulements sont présents sur la plupart des pics. Plusieurs cas de figure ont été rencontrés : des chromatogrammes parfaitement alignés, des chromatogrammes présentant un décalage systématique aléatoire de tous les pics et des chromatogrammes avec de grandes déformations partielles aléatoires. Les deux premiers cas ne posent pas de problèmes de traitement particuliers et sont gérés automatiquement par le logiciel GC-LC CONCORDANCE. Le dernier cas apparaît plus délicat car il n'est pas modélisable. Le logiciel laisse alors la possibilité à l'utilisateur de fixer manuellement des pics afin de permettre, en général, de compenser ces déformations critiques.