

Shimadzu et le CHU de Limoges : un partenariat dédié à l'innovation en toxicologie

Nous avons rencontré Monsieur Franck SAINT-MARCOUX, PU-PH au Service de Pharmacologie, Toxicologie et Pharmacovigilance du CHU de LIMOGES (87), responsable de la toxicologie clinique et médico-légale. Il nous présente son laboratoire et le partenariat qu'il conduit avec la société Shimadzu.



Pr Franck SAINT-MARCOUX

Spectra Biologie : Professeur SAINT-MARCOUX, pouvez-vous nous présenter votre laboratoire ?

Franck SAINT-MARCOUX : Dans le Service de Pharmacologie Toxicologie et Pharmacovigilance du CHU de LIMOGES qui est dirigé par le Pr Pierre MARQUET, nous sommes 5 hospitalo-universitaires (4 PU-PH et 1 MCU-PH), 4 praticiens hospitaliers, 24 techniciens, 3 ingénieurs analystes, 1 ingénieur qualité, 1 ingénieur informaticien et 2 ingénieurs qui gèrent la recherche clinique. En termes d'instrumentation, nous comptons 23 systèmes de chromatographie dont 11 systèmes LC-MS/MS. Le laboratoire comprend une salle de garde qui tourne 24h/24 et permet de réaliser des méthodes de recherche ou de dosage, en GCMS-MS, LC-MS/MS et bien entendu en immunochimie. Nous sommes également responsables de la gazométrie sanguine dans l'Établissement. Toutes activités confondues, demandes internes ou externes au CHU de Limoges, qu'il s'agisse de pharmacologie pour le suivi thérapeutique (ajustement de posologie des médicaments), de toxicologie biologique hospitalière ou médico-légale, de toxicologie professionnelle (surveillance des travailleurs), de toxicologie environnementale (recherche et dosages de pesticides, de perturbateurs endocriniens...) et d'analyses faisant l'objet de contrats (études de phar-

macocinétique pour des laboratoires pharmaceutiques, études de toxicologie environnementale, analyses dans le cadre de protocoles de recherche...), nous traitons environ 200 000 analyses par an. Notre laboratoire est accrédité COFRAC selon la norme NF EN ISO 17025 depuis 2003 et NF EN ISO 15189 depuis 2010.

Spectra Biologie : Votre laboratoire est fortement outillé, principalement en systèmes LC-MS/MS.

A quoi attribuez-vous cet avantage ?

Franck SAINT-MARCOUX : Notre outil principal est aujourd'hui la LC-MS/MS. Si notre laboratoire est très bien équipé, c'est le fruit de son histoire. Les chefs de service qui se sont succédés ont compris que si nous possédions la connaissance, il fallait les outils analytiques pour la mettre en valeur et qu'ils constituaient le cœur de notre métier. La GC-MS est présente dans le laboratoire depuis le début des années 1980 et nous utilisons la LC-MS/MS depuis plus de vingt ans, en routine. La première publication du service basée sur cette méthode date de 1996.

Spectra Biologie : Ce savoir-faire est-il le moteur du développement de votre activité ?

Franck SAINT-MARCOUX : Sans aucun doute. Aujourd'hui, 30 à 40 % des dosages hospitaliers que nous réalisons proviennent de prescriptions extérieures à notre CHU. Un établissement de 2 000 lits comme le CHU de Limoges ne génère pas à lui seul une activité annuelle de 200 000 analyses dans nos spécialités. Nous sommes parfois considérés comme un centre de recours en pharmaco-toxicologie et nous recevons des demandes d'analyse selon deux types de circuit : soit en direct avec des confrères hospitaliers qui nous envoient ce qu'ils ne peuvent pas réaliser, soit avec des confrères de ville via des gros laboratoires centralisateurs qui nous sous-traitent certaines de leurs demandes. L'étendue de notre parc d'instruments et des méthodes que nous mettons en œuvre sont les garants de notre expertise. Mais, notre image repose à la fois sur l'étendue de notre catalogue et sur notre volonté forcenée de travailler vite et bien. En toxicologie hospitalière, nous devons prendre en charge les échantillons dès qu'ils nous parviennent. Nous sommes organisés et outillés pour nous adapter aux contextes qui requièrent une réponse ou une partie de réponse en deux heures (le laboratoire fonctionne 24h/24). Toutefois, ces dosages qui changent la prise en charge médicale des patients sont relativement rares. Ils servent la plupart du temps à confirmer un diagnostic et à déterminer la gravité d'une intoxication.

Spectra Biologie : Comment jugez-vous l'évolution des méthodes que vous utilisez ?

Franck SAINT-MARCOUX : Leur sensibilité s'est globalement accrue, notamment lorsque vous ciblez ce que vous cherchez. Tout en conservant, voire en simplifiant les méthodes d'extraction, et tout en diminuant le volume d'échantillon analysé, il n'est pas rare que les systèmes les plus récents détectent des médicaments ou des toxiques à des concentrations significativement plus faibles que leurs prédécesseurs. L'impact de cette meilleure sensibilité est également important pour une analyse clé de toxicologie : le screening (General Unknown Screening en anglais d'origine) qui est une recherche sans a priori, c'est-à-dire une méthode qui doit mettre en évidence la présence de tout xénobiotique dans une matrice biologique (ou non biologique). En toxicologie médico-légale, la mission de l'expert gravite essentiellement autour de la question « voyez-vous quelque chose dans ce(s) prélèvement(s) ? », et la hantise de l'expert est bien entendu la suivante : « je n'ai rien trouvé, suis-je sûr qu'il n'y avait rien ? ». Plus une méthode de screening est robuste et sensible, plus l'expert est rassuré. Consciente de l'importance de cette analyse, la Société Française de Toxicologie Analytique (SFTA) a mis en place un groupe spécifique de travail sur le screening. En l'état, je rappelle qu'au sens de la nomenclature des actes de Biologie Médicale, le screening se définit comme une recherche qui porte au moins sur 200 molécules.

Spectra Biologie : Pouvez-vous nous décrire l'évolution de ces méthodes de screening ?

Franck SAINT-MARCOUX : Dans les temps plus anciens, les screenings détectaient déjà beaucoup de composants, mais pour la plupart à des concentrations élevées et l'outil n'était utilisé qu'en toxicologie hospitalière, en première intention pour mettre en évidence une intoxication aiguë. Les systèmes sont aujourd'hui tellement sensibles, spécifiques et rapides que l'on peut construire des procédures de screening capables de détecter des concentrations infra thérapeutiques. Petit à petit, le General Unknown Screening (GUS) répond à la question « que trouve-t-on, quelle que soit sa concentration ? ». Une approche voisine du GUS est le Multi Target Screening (MTS) qui permet de limiter la recherche à quelques dizaines de molécules et de répondre à la question « Trouve-t-on quelque chose parmi la liste des produits suivants ? ». On peut ainsi travailler à façon, pour chercher parmi des listes de psychotropes, de stupéfiants, de pesticides... en fonction des éléments du contexte. La sensibilité s'améliorant, la liste de ces produits ciblés simultanément peut désormais être très importante (on peut compter en centaines). Cela ne s'appellera jamais du GUS (car seul ce dernier peut mettre en évidence quelque chose qui n'était pas a priori recherché) mais, avec du MTS, on peut raisonnablement aujourd'hui chercher parmi tout ce qui est « usuel ». Faire évoluer ces bibliothèques nous oblige à jouer au jeu du chat et de la souris car ce qui est « usuel » varie de façon incessante. Un effort constant est réalisé pour répertorier tout nouveau médicament et tout ce qui peut se trouver en circulation, en termes de stupéfiants et de nouvelles drogues.

Spectra Biologie : En matière de screening, sur quoi travaillez-vous avec la société Shimadzu ?

Franck SAINT-MARCOUX : L'évolution de ces outils de screening est proprement fascinante et c'est tout l'objet de notre partenariat avec Shimadzu. Un screening demeure un compromis, permettant d'extraire, d'identifier plus de 1 500 à 2 000 composés, mais nous travaillons pour que ce dernier se rapproche des capacités d'une méthode de dosage spécifique à chaque composé. Ce que nous sommes en train de valider avec Shimadzu est un screening qui ne se contente pas de mettre en évidence la présence d'une molécule, mais qui la quantifie au cours de la même analyse. Si nous sommes capables de détecter des composés à des concentrations toxiques, thérapeutiques, voire infra thérapeutiques, autant aller au bout de la démarche en dosant ces composés. Techniquement, nous travaillons avec un système LC-MS/MS, le LCMS-8060 de Shimadzu. Nous ciblons pour l'instant nos efforts sur des listes de quelques dizaines de molécules dont nous savons qu'elles sont couramment impliquées dans les intoxications ou couramment présentes chez les patients. Cette innovation représente un énorme travail de développement et de validation mais notre objectif est de rendre des résultats à la fois qualitatifs et quantitatifs avec cette méthode. Bien entendu, si la précision des valeurs obtenues pourra parfois être moindre qu'avec une méthode spécifique, un résultat assez précis pour influencer la prise en charge du patient sera rendu plus rapidement que nous ne pouvons le faire aujourd'hui. Pour des applications en toxicologie médico-légale, notre objectif est d'avoir à disposition un screening qui nous guérisse de notre angoisse en répondant positivement à la question « suis-je sûr qu'il n'y ait rien ? ».

Spectra Biologie : Quel est le cadre de votre collaboration avec la société Shimadzu ?

Franck SAINT-MARCOUX : Notre collaboration a commencé avec l'acquisition de deux systèmes de LC-MS/MS, deux LCMS-8050, en 2014 pour réaliser toute notre activité concernant les stupéfiants et les traitements de substitution aux opiacés, soit jusqu'à plusieurs centaines de dosages par semaine sur certaines périodes. D'autres méthodes de dosage de psychotropes (benzodiazépines, neuroleptiques...) et d'agents anti-infectieux sont également réalisées sur ces systèmes. Ils ont globalement absorbé la plus grosse routine du laboratoire durant les trois dernières années, sans interruption de service. Ils sont connectés en bidirectionnel sur notre système informatique de gestion du laboratoire, via un concentrateur PGP. En mars 2017, nous avons signé un contrat de collaboration, faisant de notre laboratoire un des « Innovation Centers » de Shimadzu. Dans le cadre de ce partenariat, la société Shimadzu nous a confié le LCMS-8060 pour développer des méthodes innovantes de toxicologie. Depuis le mois de septembre 2016, nous avons pu également recruter une étudiante en doctorat, Tiphaine ROBIN, dans le cadre d'un projet CIFRE (Conventions Industrielles de Formation par la Recherche) signée entre l'Université de Limoges et la société Shimadzu France. La thématique de cette thèse qui s'intègre pleinement dans notre partenariat,

est le développement de la méthode de screening que nous avons évoquée et l'évaluation d'un automate d'extraction Shimadzu : le CLAM-2000.

Spectra Biologie : Quelle est la nature de vos travaux avec l'instrument CLAM-2000 de Shimadzu ?

Franck SAINT-MARCOUX : La LC-MS/MS est une méthode manuelle, en ceci qu'une étape préalable d'extraction est nécessaire. A partir d'un échantillon d'organe, de sang ou d'urine, nous devons réaliser une extraction liquide-liquide, en phase solide et/ou une déprotéinisation. Cette étape de purification/concentration est souvent longue et coûteuse. Shimadzu propose aujourd'hui le CLAM-2000, un instrument qui, à partir du tube primaire, va réaliser la centrifugation et l'extraction de manière automatique, pour ensuite directement injecter l'extrait obtenu dans le système LC-MS/MS.

La LC-MS/MS est une affaire de « spécialistes » qui demande un investissement en formation important en plus du coût d'acquisition du matériel. Notre objectif est de rendre cette méthode analytique utilisable en routine par tous. Avec le CLAM-2000, Shimadzu franchit une étape vers la mise à disposition d'un automate de LC-MS/MS, avec une cadence accélérée et une méthode utilisable par un non-spécialiste. L'analogie avec un automate d'immunochimie s'arrête là, car le système demeure totalement ouvert en termes de méthodes qui peuvent être implémentées. Ce dernier point est un plus certain.

Spectra Biologie : Quel est l'impact attendu de vos travaux pour les futurs utilisateurs des systèmes Shimadzu ?

Franck SAINT-MARCOUX : Les méthodes développées vont être vendues « clé en main », avec des standards. Historiquement, chaque laboratoire a toujours acheté ses propres poudres, préparé ses propres standards, mis au point sa propre méthode sur son appareil. Cette situation participe grandement à la variabilité inter-laboratoire et nuit au suivi des patients. Paradoxalement, l'expérience de CQE internationaux a prouvé qu'en LC-MS/MS, nous pouvions avoir des CV plus importants que des méthodes d'immunochimie connues pour être moins spécifiques. Quand un laboratoire dose des dizaines, voire des centaines de paramètres, les coûts liés aux achats et à la préparation des solutions mères et des standards, à la vérification de leur stabilité sont très importants. Lorsqu'il existe des mélanges à façon et des CQI préparés, avec un surcoût raisonnable, alors on franchit le pas. Dans la méthode de screening, nous sommes en train de mettre au point différents mélanges permettant la validation de la méthode et la qualification opérationnelle de l'instrument. La finalité est bien sûr que ces mélanges soient ensuite proposés aux clients faisant l'acquisition d'un système LC-MS/MS Shimadzu, avec ou sans CLAM-2000.

Spectra Biologie : Quel premier bilan faites-vous de votre partenariat avec Shimadzu ?

Franck SAINT-MARCOUX : Pour Shimadzu, je pense que notre valeur ajoutée est d'une part, notre expertise en toxicologie



Tiphaine ROBIN, en charge des innovations sur les instruments Shimadzu LCMS-8060 et CLAM-2000

analytique, clinique et médico-légale, et d'autre part notre environnement de travail qui permet de tester concrètement les différentes méthodes développées. Aujourd'hui, ce partenariat est déjà valorisé par la publication de plusieurs notes d'application et par de multiples communications en congrès internationaux, grâce aux travaux de Tiphaine Robin dont nous co-encadrons la thèse. Pour notre laboratoire, ce partenariat est le premier qui va au-delà d'une collaboration ponctuelle. Les échanges sont nombreux et ce travail « à deux têtes » est très enrichissant.



• Contact laboratoire : Pr Franck SAINT-MARCOUX
Responsable Toxicologie Biologique et Médico-légale
Service de Pharmacologie, Toxicologie et Pharmacovigilance – CHU de LIMOGES
franck.saint-marcoux@unilim.fr
INSERM UMR-S850 – Université de LIMOGES



• Contact Shimadzu : Cynthia LE ROUX - Responsable Marketing Opérationnel & Communication – clr@shimadzu.fr

Shimadzu France – Le Lizard II, Bât. A. Bd Salvador Allende – Noisiel
77448 Marne La Vallée Cedex 2 – www.shimadzu.fr

Shimadzu, a fait l'acquisition en juin dernier de 100 % de l'entreprise AlsaChim, une société spécialisée dans la production de molécules marquées aux isotopes stables, de métabolites et des substances pharmaceutiques associées. Cette technologie complète les solutions Shimadzu en spectrométrie de masse, plus particulièrement sur les marchés cliniques, pharmaceutiques, agro-alimentaires et environnementaux où les contraintes réglementaires imposent des calibrations de grande qualité.