

Analyse d'une protéine ciblée par immunoaffinité et digestion sur micro-réacteur enzymatique couplés en ligne à une analyse par chromatographie liquide et spectrométrie de masse : synthèse, caractérisation et miniaturisation des outils bioanalytiques

Annabelle Cingöz

▶ **To cite this version:**

Annabelle Cingöz. Analyse d'une protéine ciblée par immunoaffinité et digestion sur micro-réacteur enzymatique couplés en ligne à une analyse par chromatographie liquide et spectrométrie de masse : synthèse, caractérisation et miniaturisation des outils bioanalytiques. Chimie. Université Pierre et Marie Curie - Paris VI, 2009. Français. NNT : . pastel-00005500

HAL Id: pastel-00005500
https://pastel.hal.science/pastel-00005500

Submitted on 12 Oct 2009

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

THESE DE DOCTORAT DE L'UNIVERSITE
PIERRE ET MARIE CURIE (PARIS VI)

Spécialité

Chimie Analytique - ED 388

Présentée par

Annabelle CINGÖZ

Pour obtenir le grade de

Docteur de l'université Pierre et Marie Curie

Analyse d'une protéine ciblée par immunoaffinité et digestion sur micro-réacteur enzymatique couplés en ligne à une analyse par chromatographie liquide et spectrométrie de masse : synthèse, caractérisation et miniaturisation des outils bioanalytiques.

Soutenue le 21 septembre 2009, devant le jury composé de :

M. Christian ROLANDO	Rapporteur
M. Jean-Luc VEUTHEY	Rapporteur
Mme Marie-Claude MILLOT	Examinateur
M. Jean-Claude TABET	Examinateur
Mme Florence CHAPUIS-HUGON	Examinateur
Mme Valérie PICHON	Directrice de thèse

TABLE DES MATIERES

Table des matières ..... ***I***

Résumé ..... ***V***

Liste des publications et des communications orales et écrites ..... ***VII***

Introduction ***1***

Chapitre I : Analyse des protéines ***3***

I.1. Structure et propriétés des protéines **3**
I.1.1. Structure des protéines 3
I.1.1.1.Les acides aminés 3
I.1.1.2. La liaison peptidique 3
I.1.1.3. Conformations des protéines 4
I.1.1.4. Stabilité des protéines 5
I.1.1.5. Le protéome 6
I.1.2. Les protéines du plasma sanguin 7

I.2. Méthodes analytiques pour l'identification de protéines **9**
I.2.1. Méthodes électrophorétiques pour l'analyse de protéines 10
I.2.2. Digestion enzymatique 12
I.2.2.1. Les enzymes 12
I.2.2.2. Principe de la digestion enzymatique 14
I.2.2.3. La digestion sur gel et en solution 16
I.2.2.4. Digestion sur support d'enzymes immobilisées 17
I.2.2.5. Conclusion 18
I.2.3. Méthodes chromatographiques 18
I.2.3.1. Approches conventionnelles 18
I.2.3.2. Nanochromatographie 19
I.2.3.3. Chromatographie multidimensionnelle 21
I.2.4. Détection par spectrométrie de masse 22
I.2.4.1. Principe 22
I.2.4.2. Les sources d'ionisation 23
I.2.4.3. Les analyseurs 28
1.2.4.4. Identification des protéines par spectrométrie de masse en tandem 37
1.2.4.5. Quantification des protéines 38
I.2.5. Conclusion 41

I.3. Traitement de l'échantillon **42**
I.3.1 Principe de l'extraction sur phase solide 42
I.3.2. Analogie avec la chromatographie liquide 43
I.3.3. Modes de couplage 44
I.3.3.1. Extraction en différé 45
I.3.3.2. Couplage en ligne de l'extraction avec l'analyse 45
I.3.4. Diversité des supports 47
I.3.4.1. Les supports hydrophobes 47
I.3.4.2. Les supports échangeurs d'ions 47
I.3.4.3. Les supports polaires 48
I.3.4.4. Les phases à accès restreint 49
I.3.4.5. Les supports d'affinité 49

I.4. Conclusion 51

I.5. Références 52

Chapitre II : Utilisation d'outils bioanalytiques pour l'analyse d'une protéine ciblée 55

II.1. Extraction sélective d'une protéine ciblée 55
II.1.1. Présentation des supports sélectifs 55
II.1.2. Principe de l'immunoextraction 57
II.1.2.1. Les immunoglobulines ou anticorps 57
II.1.2.2. Mode d'obtention des anticorps 59
II.1.2.3. L'immunoextraction 60
II.1.3. Développement d'un immunoadsorbant 64
II.1.3.1. Techniques et supports d'immobilisation 64
II.1.3.2. Apport en sélectivité 72
II.1.3.3. Capacité et rendements d'extraction 74
II.1.3.4. Analyse en ligne 75
II.1.4. Conclusion 76

II.2. Digestion sur réacteur enzymatique 77
II.2.1. Introduction 77
II.2.2. Les techniques d'immobilisation non covalentes 79
II.2.2.1. L'adsorption 79
II.2.2.2. Encapsulation dans un gel 79
II.2.3. Les supports d'immobilisation covalente en formats conventionnels 79
II.2.3.1. Introduction 79
II.2.3.2. Digestion sur supports particulaires d'enzymes immobilisées 80
II.2.3.3. Les supports monolithiques en format conventionnel 88
II.2.4. Les IMERs en formats miniaturisés 93
II.2.4.1. Supports particulaires 93
II.2.4.2. Les phases à tube ouvert 94
II.2.4.3. Les monolithes organiques en formats miniaturisés 97
II.2.4.4. Les monolithes de silice en formats miniaturisés 102
II.2.5. Conclusion 106

II.3. Analyse totale en ligne d'une protéine ciblée 107

II.4. Conclusion 110

II.5. Références 112

Chapitre III : Développement d'une méthode de digestion en ligne 115

III.1. Une protéine modèle, le cytochrome *c* 115

III.2. Mise au point de l'analyse par LC-MS/MS 117
III.2.1. Montage expérimental pour l'analyse des peptides 117
III.2.2. Digestion trypsique en solution – Rappel des essais préliminaires 118
III.2.3. Analyse du digestat trypsique par LC-MS/MS et identification du cytochrome c. 120
III.2.3.1. Analyse du mélange peptidique 120
III.2.3.2. Identification du cytochrome *c* 122
III.2.3.3. Méthode de quantification du cytochrome *c* 124
III.2.4. Analyse d'un digestat à la pepsine et identification du cytochrome c 127

III.3. Développement d'un microréacteur de trypsine 131
III.3.1. Digestion en ligne sur un support commercial de trypsine immobilisée 131
III.3.1.1. Présentation du montage 131
III.3.1.2. Développement d'une procédure de digestion en ligne 132
III.3.2. Synthèse et évaluation de réacteurs de trypsine 138
III.3.2.1. Choix du support et principe du greffage covalent 138
III.3.2.2. Principe d'évaluation des performances des réacteurs enzymatiques 139
III.3.2.3. Evaluation des réacteurs enzymatiques 143
III.3.2.4. Digestion en ligne du cytochrome *c* sur l'IMER de trypsine 156

III.4. Synthèse et caractérisation du réacteur de pepsine 164
III.4.1. Préparation de l'IMER 165
III.4.2. Développement de la procédure de digestion 165
III.4.2.1. Digestion du cytochrome *c* 165
III.4.2.2. Comparaison à la digestion en solution 166
III.4.2.3. Comparaison des performances avec l'IMER de trypsine 167
III.4.2.4. Linéarité de la réponse 169
III.4.3. Caractérisation de l'IMER de pepsine 170
III.4.3.1. Répétabilité de la synthèse 170
III.4.3.2. Influence de la densité de greffage sur la digestion du cytochrome *c* 171
III.4.4. Application à un mélange 175

III.5. Conclusion 176

III.6. Références 178

Chapitre IV : Analyse en ligne d'une protéine ciblée dans du plasma 179

IV.1. Stratégie analytique 179

IV.2. Immunoextraction du cytochrome *c* 180
IV.2.1. Synthèse de l'immunoadsorbant 180
IV.2.2. Caractérisation de l'immunoadsorbant 181
IV.2.2.1. Principe 181
IV.2.2.2. Développement d'un protocole d'extraction du cytochrome *c* 183
IV.2.2.3. Capacité des immunoadsorbants 188
IV.2.3. Conclusion 190

IV.3. Analyse en ligne d'une protéine par immunoextraction 191
IV.3.1. Présentation du montage 191
IV.3.2. Optimisation du couplage 191
IV.3.2.1. Couplage de l'IS 1 avec l'IMER de pepsine 192
IV.3.2.2. Couplage de l'IS 2 avec l'IMER de pepsine 195
IV.3.3. Analyse en ligne du cytochrome c dans le plasma 198

IV.4. Conclusion 200

IV.5. Références 201

Chapitre V : Miniaturisation de l'analyse en ligne d'une protéine ciblée 203

V.1. Miniaturisation du système chromatographique 203
V.1.1. Digestion en ligne et analyse par microchromatographie 204

V.1.1.1. Montage expérimental 204
V.1.1.2. Analyse des peptides après digestion en ligne du cytochrome *c* 205
V.1.1.3. Optimisation du protocole de digestion 209
V.1.1.4. Sensibilité de la méthode 210
V.1.2. Analyse totale du cytochrome c par immunoaffinité, digestion en ligne et analyse par chromatographie capillaire 211
V.1.2.1. Mise au point de la digestion en ligne et analyse par cap-LC 211
V.1.2.2. Digestion en ligne sur l'IMER de pepsine 215
V.1.2.3. Sensibilité de la méthode de digestion 218
V.1.2.4. Stabilité de l'IMER 218
V.1.3. Couplage de l'immunoadsorbant au système de digestion en ligne par chromatographie capillaire 220
V.1.3.1. Mise au point du couplage 220
V.1.3.2. Analyse totale du cytochrome *c* par IS-IMER-cap-LC-UV dans un échantillon pur 223
V.1.3.3. Analyse totale du cytochrome *c* par IS-IMER-cap-LC-UV dans un échantillon de plasma 224
V.1.4. Conclusion 227

V.2. Miniaturisation de l'IMER 228
V.2.1. Introduction 228
V.2.2. Synthèse et caractérisation du support monolithique 229
V.2.2.1. Stratégie de synthèse 229
V.2.2.2. Procédure de synthèse 231
V.2.2.3. Caractérisation du monolithe 233
V.2.3. Synthèse et caractérisation du réacteur enzymatique en format miniaturisé 238
V.2.3.1. Immobilisation de la trypsine sur le monolithe 238
V.2.3.2. Evaluation des performances de l'IMER miniaturisé 239
V.2.4. Conclusion 246

V.3. Analyse d'un digestat de cytochrome *c* par HPLC-Chip/MS 247
V.3.1. Description 247
V.3.2. Développement de la méthode d'analyse du digestat du cytochrome *c* 248
V.3.2.1. Conditions de séparation et de détection 248
V.3.2.2. Analyse du digestat 249
V.3.2.3. Utilisation de l'outil de quantification 250

V.4. Conclusion 252

V.5. Références 253

Conclusion et perspectives 255

Annexes 257

Liste des tableaux 275

Liste des figures 277

RESUME

L'étude de protéines ciblées comme des biomarqueurs dans des échantillons biologiques est de nos jours un réel défi pour le diagnostic médical. D'un point de vue analytique, la chromatographie en phase liquide couplée à la spectrométrie de masse a supplanté l'électrophorèse en gel bidimensionnel. Cependant, l'étape de digestion des protéines est le plus souvent réalisée en solution impliquant alors un manque d'automatisation de la méthode et des temps d'analyse relativement longs. De plus, l'analyse d'une protéine ciblée induit obligatoirement une étape de traitement d'échantillon performante afin de purifier au mieux la matrice biologique compte tenu de la complexité de l'échantillon et de la faible concentration des biomarqueurs recherchés.

En vue d'une automatisation totale du processus analytique, une étape d'immunoextraction a été couplée à un réacteur de digestion enzymatique suivie de l'analyse par CPL-SM. Tous ces développements ont été réalisés *via* l'étude d'une protéine modèle, le cytochrome *c*. Tout d'abord, des microréacteurs synthétisés à partir de différents supports d'immobilisation et de quantités d'enzymes greffées variées ont été évalués. Par un outil simple de caractérisation, un IMER à base de trypsine a pu être élaboré et appliqué à la digestion du cytochrome *c* couplée en ligne à la CPL-SM. Par l'exploitation des résultats obtenus, un IMER de pepsine a pu également être rapidement développé et intégré au système d'analyse.

Dans un second temps, une méthode d'extraction sélective a été développée par immobilisation d'anticorps anti-cytochrome *c* sur un support solide (immunoadsorbant, IS). Le protocole d'immunoextraction a été mis au point, puis l'IS a été caractérisé en termes de sélectivité et de capacité avant d'envisager son couplage au digesteur enzymatique. Le transfert entre l'IS et le digesteur ayant lieu à pH acide, l'IMER à base de pepsine a été choisi pour une compatibilité optimale des deux étapes. La faisabilité du couplage a pu être clairement démontrée et l'ensemble de ce dispositif automatisable a été mis à profit pour l'extraction sélective et l'analyse du cytochrome *c* dans du plasma humain dopé.

Enfin, un des challenges analytiques actuels est la miniaturisation du système analytique afin d'augmenter la sensibilité, de réduire le volume d'échantillon et la consommation des réactifs. Ainsi, après avoir miniaturisé le système d'analyse chromatographique, un IMER a été préparé dans un capillaire de 100 µm par immobilisation covalente de la trypsine sur un monolithe à base de silice. L'efficacité de digestion a été démontrée sur un substrat de faible masse moléculaire. Ces premiers résultats confirment que le support développé présente un fort potentiel pour l'immobilisation de biomolécules en format miniaturisé et la synthèse d'un immunoadsorbant sera envisagé dans le but d'un couplage avec l'IMER et l'analyse par nano-CPL/SM.

LISTE DES PUBLICATIONS ET DES COMMUNICATIONS ORALES ET ECRITES

LISTE DES PUBLICATIONS

"Evaluation of various immobilized enzymatic microreactors coupled on-line with liquid chromatography and mass spectrometry detection for quantitative analysis of cytochrome *c*."A. Cingöz, F. Hugon-Chapuis, V. Pichon, *J. Chromatogr.,* A 1209 (2008) 95.

"Automated analysis of a target protein from a biological fluid by immunoaffinity coupled on-line with an enzyme microreactor and liquid chromatography-mass spectrometry analysis." A. Cingöz, F. Hugon-Chapuis, V. Pichon, *J. Chromatogr., B*, sous presse.

COMMUNICATIONS ORALES

Conférences présentées

Symposiums internationaux

A. Cingöz, F. Hugon-Chapuis, V. Pichon. "*Development of an automated selective and quantitative analysis of a target protein in biological matrices by coupling immunoextraction with enzymatic digestion and LC-MS/MS*." ISC 2008 – 27th International symposium on Chromatography, 21-25 sept. Munster, Allemagne

A. Cingöz, F. Hugon-Chapuis, V. Pichon. « *Development of a miniaturized on-line analysis of a target protein in plasma samples by coupling immunoextraction with enzymatic digestion in capillaries to the analysis by LC-MS*." HPLC 2009, International Symposium on High Performance Liquid Phase Separations and Related Techniques, juin 2009, Dresden, Allemagne.

Symposiums nationaux

A. Cingöz, F. Hugon-Chapuis, V. Pichon. « *Analyse quantitative d'une protéine ciblée par couplage en ligne d'un immunoadsorbant et d'un réacteur enzymatique à l'analyse par LC/MS/MS.*», Afsep - Club Ile de France, Traitement de l'échantillon, 2007, Paris.

A. Cingöz, F. Hugon-Chapuis, V. Pichon. « *Utilisation d'outils bioanalytiques pour l'analyse d'une protéine ciblée.* » Colloque de recherche FGL, décembre 2008, Rennes.

Autres conférences

A. Cingöz, F. Hugon-Chapuis, V. Pichon. "*Development of an automated on-line set-up for the analysis of a target protein by coupling immunoextraction with enzymatic digestion and LC-MS/MS.*" Extech 10, Advances in Extraction Technologies, 28-30 janvier 2008, Bruges, Belgique ***Prix jeune chercheur.***

V. Pichon, S. Vo Duy, **A. Cingöz**, F. Bel Hadj-Kaabi, F. Hugon-Chapuis. "*Molecularly Imprinted Polymers for the selective extraction of compounds from real samples*." Extech 10, Advances in Extraction Technologies, 28-30 janvier 2008, Bruges, Belgique

A. Cingöz, F. Bel Hadj-Kaabi, F. Chapuis, M.C. Hennion, V. Pichon. « *Molecular recognition applied to the selective trace analysis of biological fluids: synthesis and characterisation of suitable sorbents, on-line coupling with LC and miniaturization*. » HPLC 2007, International Symposium on High Performance Liquid Phase Separations and Related Techniques, 17-21 juin 2007, Ghent, Belgique

V. Pichon, **A. Cingöz**, F. Bel Hadj-Kaabi, F. Chapuis. "*Molecularly imprinted polymers applied to the selective trace analysis of complex matrices: synthesis, characterisation, comparison to immunosorbents, on-line coupling and miniaturization"*. ExTech 2007, Advances in Extraction Technologies, 3-7 juin 2007, Aalesund, Norvège

F. Hugon-Chapuis, F. Bel Hadj-Kaabi, **A. Cingöz**, V. Pichon. « *Development of selective sample pretreatment methods for their integration in miniaturized devices ». 5th France-China Workshop on "Surface Electrochemistry of Molecules of Biological Interest. Biosensor Applications*", Changsha, Chine, mai 2008.

V. Pichon, B. Madru, V. Thibert, **A. Cingöz**, F. Chapuis-Hugon "*Extraction sélective de molécules à l'état de traces d'échantillons complexes : apport des anticorps, des aptamères et des polymères à empreintes moléculaires »,* Journées « Analyse de traces et ultra-traces – Enjeux et perspectives », Société de BioChromatographie et Nanoséparation, Paris, 4 juin 2009

COMMUNICATIONS ECRITES

Symposiums internationaux

A. Cingöz, M. de Person, F. Chapuis-Hugon, V. Pichon. "*Application of an optimized trypsin microreactor for the digestion of cytochrome c coupled on-line with LC-MS/MS*." HPLC 2007, International Symposium on High Performance Liquid Phase Separations and Related Techniques, 17-21 juin 2007, Ghent, Belgique

A. Cingöz, F. Hugon-Chapuis, V. Pichon. "*Development and characterization of real-time trypsin microreactor coupled on-line with LC-MS/MS*." ExTech 2007, Advances in Extraction Technologies, 3-7 juin 2007, Aalesund, Norvège

A. Cingöz, F. Chapuis-Hugon, V. Pichon. **"***Application of optimized enzymatic microreactors coupled on-line with LC-MS/MS for quantitative analysis of cytochrome*." Extech 10, Advances in Extraction Technologies, 28-30 janvier 2008, Bruges, Belgique.

A. Cingöz, F. Hugon-Chapuis, V. Pichon. "*Application of an immunosorbent coupled on-line with an enzymatic microreactor for the quantitative analysis of a target protein in biological sample by LC-MS/MS*." ISC 2008 – 27th International symposium on Chromatography, 21-25 septembre Munster, Allemagne

Symposiums nationaux

A. Cingöz, F. Hugon-Chapuis, V. Pichon. «*Développement d'un microréacteur de trypsine couplé à l'analyse par LC-MS/MS pour la digestion en ligne d'une protéine ciblée*.» JFSM 2008 - 25ème Journées Françaises de Spectrométrie de Masse, Septembre 2008, Grenoble.

A. Cingöz, F. Hugon-Chapuis, V. Pichon**. «** *Développement d'une méthode automatisable pour l'analyse d'une protéine ciblée dans des échantillons biologiques par immunoextraction couplée à une digestion enzymatique et analyse par LC-MS/MS* » JFSM 2008 - 25ème Journées Françaises de Spectrométrie de Masse, Septembre 2008, Grenoble.

INTRODUCTION

Depuis le séquençage de nombreux génomes dont celui de l'homme, l'étude du protéome dédié à la description de l'ensemble des protéines exprimées par une cellule ou un tissu à un temps donné suscite encore un grand intérêt dans le domaine des sciences du vivant. En effet, les protéines jouent de nombreux rôles dans l'organisme et permettent d'accéder à la compréhension des mécanismes biologiques ainsi qu'à la physiopathologie de nombreuses maladies humaines. La protéomique a connu un incroyable essor ces dernières années et est actuellement utilisée dans le domaine de la recherche clinique pour la découverte de biomarqueurs. Les biomarqueurs sont des molécules caractéristiques d'un dysfonctionnement de l'organisme ou de la réponse à un traitement thérapeutique. Dans ce contexte, l'analyse de protéines ciblées est un véritable challenge compte tenu de la complexité des échantillons et des faibles concentrations recherchées.

Les techniques d'analyse d'une protéine ciblée découlent directement du grand essor de la protéomique qui s'est traduit par des progrès considérables en termes d'instrumentation. En ce qui concerne l'identification des protéines et leur caractérisation, la spectrométrie de masse est actuellement l'outil de choix, en particulier grâce à sa grande spécificité et au développement d'analyseurs de plus en plus sensibles. En parallèle, les techniques séparatives d'électrophorèse en gel bidimensionnel ont été supplantées par la chromatographie en phase liquide plus sensible et plus facilement automatisable. De plus, les techniques chromatographiques sont facilement couplées à la spectrométrie de masse grâce à la source d'ionisation électrospray. Toutefois, la gamme de masse des spectromètres de masse de basse résolution n'est pas suffisamment grande pour l'analyse de protéines de haute masse moléculaire. Une étape de digestion des protéines par une enzyme protéolytique est alors indispensable en amont de l'analyse chromatographique. Les peptides ainsi générés sont alors séparés par chromatographie et détectés par spectrométrie de masse. La digestion est généralement effectuée en solution mais elle est très longue et l'autodigestion de l'enzyme peut limiter l'efficacité de digestion. De plus, l'automatisation complète de l'analyse implique d'incorporer l'étape de digestion en ligne en immobilisant les enzymes sur un support solide intégrable au système analytique. Le réacteur enzymatique ainsi développé permet de diminuer considérablement le temps de digestion et de rendre l'analyse automatisable.

Les protéines d'intérêt dans des échantillons biologiques complexes sont la plupart du temps présentes en faible quantité et peuvent être masquées par de nombreux autres composants de la matrice biologique. L'élaboration du procédé analytique nécessite alors l'incorporation d'une étape de traitement d'échantillon avant l'analyse par spectrométrie de masse afin de purifier la matrice.

Aujourd'hui, l'extraction sur phase solide ou SPE (*Solid phase extraction*) est de loin la méthode de traitement des échantillons liquides la plus répandue notamment en raison de la diversité des supports actuellement disponibles. Les supports classiques d'extraction tels que des supports hydrophobes, polaires ou échangeurs d'ions ont d'ailleurs été utilisés pour l'extraction de protéines. Cependant ces supports mettent en jeu des interactions non sélectives conduisant à la co-extraction de composés interférents. Pour pallier ce manque de sélectivité, un support sélectif fondé sur un mécanisme de reconnaissance moléculaire peut être utilisé. Ainsi, l'immunoadsorbant (IS) est un support d'extraction à reconnaissance moléculaire constitué d'anticorps développés contre un analyte cible (antigène) et greffés sur un support solide. La grande spécificité de ces supports provient de la parfaite complémentarité stérique et fonctionnelle de l'anticorps vis-à-vis de l'antigène. L'interaction antigène-anticorps a d'ailleurs été largement exploitée pour l'analyse des protéines à travers les immunoessais et les techniques d'immunodéplétion. Toutefois, la déplétion ne permet l'élimination que des protéines majoritaires du plasma et de nombreuses autres protéines peuvent interférer lors de l'analyse d'une protéine ciblée présente en très faible concentration.

L'objectif de cette étude est donc de mettre au point l'analyse d'une protéine ciblée par extraction sélective de la protéine d'intérêt sur un immunoadsorbant couplée en ligne à la digestion sur un réacteur d'enzymes immobilisées et à l'analyse en ligne par LC-MS/MS. Avant d'envisager cette approche totalement intégrée, un immunoadsorbant et un réacteur enzymatique ont été tout d'abord été développés et caractérisés dans l'optique de leur miniaturisation. Un outil de quantification a été développé et a permis d'évaluer le système mis au point.

En effet, ces dernières années, de nombreux travaux portant sur la miniaturisation du dispositif analytique avec le concept de « laboratoire-sur-puce » (« *lab-on-a chip* ») ont été menés avec pour objectif final l'intégration de la préparation de l'échantillon, de la séparation analytique et de la détection sur un microsystème analytique unique (*Micro total analysis system*, *μ-TAS*). La miniaturisation présente un intérêt majeur pour l'analyse d'échantillons disponibles en très faibles volumes (cellules, tissus, …). Son évolution actuelle se justifie non seulement par le coût de certains réactifs (molécules d'intérêts, enzymes, anticorps, …) mais aussi par la nécessité croissante de gagner en temps d'analyse. Des séparations chromatographiques sont déjà réalisées dans des micro-canaux, toutefois la réduction du pouvoir séparatif ainsi que les faibles volumes injectés constituent un argument supplémentaire à la nécessité d'intégrer une étape de traitement d'échantillon sélectif dans ces systèmes miniaturisés.

La synthèse d'IS et de réacteurs enzymatiques en format miniaturisé s'avère donc intéressante. Dans cette optique, un IMER en format capillaire a été développé.

CHAPITRE I : ANALYSE DES PROTEINES

I.1. Structure et propriétés des protéines

I.1.1. Structure des protéines

Les protéines sont des macromolécules constituées d'un enchaînement d'acides aminés unis par des liaisons peptidiques [1].

I.1.1.1.Les acides aminés

Chez l'Homme, ainsi que chez de nombreuses espèces, il existe vingt acides aminés différents qui composent les protéines. Un acide aminé est une substance organique contenant un carbone tétraédrique central (α) sur lequel sont fixés une fonction amine, une fonction acide carboxylique, un hydrogène et un groupement variable appelé chaîne latérale (R) (figure I-1).

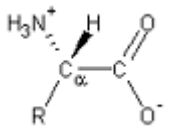


Figure I-1 : Structure des acides L-α-aminés. R correspond aux chaînes latérales.

Hormis la glycine pour laquelle R est un hydrogène, ce carbone est asymétrique pour tous les acides. Pour les acides aminés naturels, la configuration stéréochimique de ce centre chiral est en général L (nomenclature de Fischer). Les formes D des acides aminés sont extrêmement rares. A l'état naturel, les acides aminés possèdent une structure zwitterionique. Cela signifie que l'entité est globalement neutre alors que la fonction amine porte une charge positive ($-NH_3^+$) et la fonction acide carboxylique porte une fonction négative ($-COO^-$). Ces acides aminés présentent différentes propriétés physicochimiques suivant la nature des chaînes latérales. Ils peuvent être polaires, hydrophobes, acides ou basiques. Un code de trois lettres et un code d'une lettre permettent de désigner les 20 acides aminés qui sont présentés en annexe 1.

I.1.1.2. La liaison peptidique

La liaison entre deux acides aminés, appelée liaison peptidique, est représentée sur la figure I-2. Elle se forme par une réaction de condensation entre le groupe α-carboxyle d'un acide aminé et

le groupe α-amine d'un autre acide aminé donnant lieu à une liaison amide. Il en résulte une chaîne d'acides aminés constituant des peptides ou des protéines suivant le nombre d'acides aminés impliqués. Le terme protéine désigne les chaînes polypeptidiques dont le nombre de résidus est supérieur à 100. Lorsque le nombre de résidus est inférieur à 50, on parle de peptides, entre 50 et 100, on parle indifféremment de peptides, de petites protéines ou de polypeptides. Les groupes libres situés aux extrémités opposées d'une chaîne peptidique sont appelés le groupe N-terminal pour le groupe amine et le groupe C-terminal pour le groupe carboxyle.

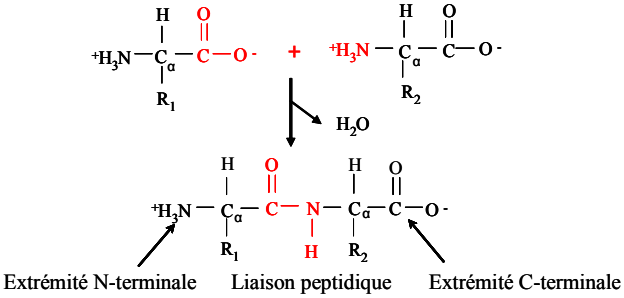


Figure I-2 : Formation d'une liaison peptidique.

Il est convenu de numéroter les acides aminés d'une chaîne peptidique en allant de l'extrémité N-terminale à l'extrémité C-terminale. Du fait de la présence de nombreux groupements acido-basiques, la charge globale portée par une protéine dépend donc du nombre de résidus acides et de résidus basiques ainsi que du pH de la solution dans laquelle elle se trouve. Le pH pour lequel la protéine ne possède aucune charge nette correspond au point isoélectrique (pI) de la protéine.

I.1.1.3. Conformations des protéines

Il a été montré que la liaison peptidique est plane en raison de la présence d'un système conjugué. Il n'existe donc que deux configurations possibles du groupe peptidique, les isomères *trans* et *cis*. En général, les groupes peptidiques sont dans la configuration *trans*. L'isomère *cis* est en effet très défavorisé par l'encombrement stérique des chaînes latérales. Cependant, les autres liaisons N-Cα et Cα-C (figure I-2) sont des liaisons simples à libre rotation. Il en résulte de nombreuses conformations (c'est-à-dire des repliements) ou structures tridimensionnelles possibles des protéines. Cependant, dans les conditions physiologiques, chaque protéine possède une seule conformation spécifique, appelée état natif.

La structure des protéines, illustrée en figure I-3, peut être définie selon quatre niveaux :

- La *structure primaire* (I) qui correspond à la séquence proprement dite de la protéine, c'est-à-dire à l'enchaînement des acides aminés.

- La *structure secondaire (II)* qui décrit le premier niveau de repliement de l'enchaînement peptidique. Elle est assurée par des interactions de type liaisons hydrogène entre les acides aminés voisins et se caractérise par une conformation répétitive localisée. Il existe deux types de structure secondaire : l'hélice α et le feuillet β.

- La *structure tertiaire (III)* correspond au repliement et à l'assemblage en domaine des différents éléments de la structure secondaire. Il s'agit de la structure tridimensionnelle de la protéine. Elle est stabilisée par des interactions hydrophobes, des liaisons hydrogène, des liaisons ioniques ou encore des ponts disulfures (S-S), véritable liaison covalente formée par oxydation entre les fonctions thiols de deux cystéines.

- La *structure quaternaire (IV)* concerne les protéines constituées de plusieurs chaînes polypeptidiques et correspond à l'association de celles-ci par des interactions semblables à celles établies à l'intérieur d'une chaîne polypeptidique, c'est-à-dire des interactions hydrophobes, des liaisons hydrogène et dans certains cas, des ponts disulfures.

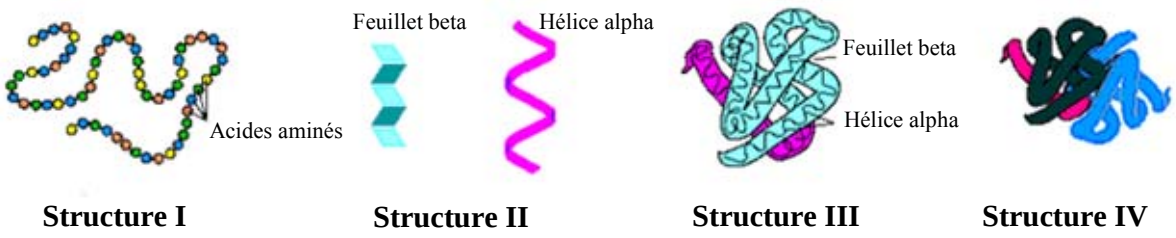


Figure I-3 : Les quatre niveaux de structures des protéines.

La structure primaire d'une protéine détermine une conformation spatiale unique décrite par la structure tertiaire ou quaternaire. D'une façon générale, la fonction d'une protéine dépend de sa conformation et repose sur sa capacité à interagir avec une autre molécule (ligand) de manière spécifique. La fixation du ligand entraîne souvent un changement conformationnel dans la structure de la protéine qui est impliqué dans son mécanisme d'action.

I.1.1.4. Stabilité des protéines

La structure finale des protéines est stabilisée par des interactions non covalentes entre les acides aminés, voire covalente avec la formation de ponts disulfures. La rupture de ces interactions aboutit à la perte de la conformation tridimensionnelle de la protéine. La protéine est dite alors

dénaturée et ne peut plus assurer sa fonction biologique. Les facteurs pouvant provoquer la dénaturation d'une protéine sont :

- la chaleur qui engendre une agitation thermique des atomes de la macromolécule et provoque une rupture des interactions faibles, comme les liaisons hydrogène,
- des pH extrêmes qui modifient les charges des chaînes latérales des acides aminés et altèrent donc les liaisons ioniques et hydrogène,
- une forte force ionique,
- un solvant organique,
- des agents réducteurs de thiols qui permettent la rupture des ponts disulfures.

Suivant certaines conditions douces de dénaturation, les protéines peuvent se replier spontanément et retrouver leur conformation native lorsqu'elles sont replacées dans des solvants adéquats comme un tampon au pH optimum de l'activité de la protéine.

I.1.1.5. Le protéome

Les protéines sont indispensables aux processus biologiques et jouent de nombreux rôles sur la structure et sur le fonctionnement de l'organisme. Elles sont donc présentes aussi bien dans les fluides biologiques que dans les membranes, les tissus, les muscles... Par analogie avec le terme génome, le protéome désigne l'ensemble des protéines exprimées par le génome d'une cellule, d'un tissu ou d'un organe à un instant donné et dans un environnement donné. Le génome est constant alors que le protéome est dynamique. En effet, il varie selon le type de cellule, son environnement et son activité. Un gène peut coder pour plusieurs protéines. De plus, en raison des variations possibles de la séquence des 20 acides aminés, du nombre d'acides aminés et des conformations, il existe bien plus de protéines de que gènes dont le nombre est estimé entre 20 000 et 25 000. De plus, des modifications post-traductionnelles telles que des acétylations, des phosphorylations et des glycosylations peuvent avoir lieu et contribuent à l'immense diversité des protéines.

En fonction de leurs activités biologiques, on distingue plusieurs grandes classes de protéines comme les enzymes, les protéines de régulation (hormones peptidiques), les protéines de structure, qui assurent la rigidité structurale de la cellule (collagène), les protéines de protection (immunoglobulines ou anticorps), les protéines de transport (hémoglobine) et les protéines contractiles qui participent à la contraction musculaire... Les protéines remplissent des fonctions beaucoup trop nombreuses pour qu'une liste ou une classification précise puisse être établie. Dans le cadre de cette étude, le plasma sanguin a été utilisé comme matrice réelle. A cet effet, seules seront détaillées les protéines contenues dans ce fluide biologique.

I.1.2. Les protéines du plasma sanguin

Le sang circule dans le corps tout entier et sert de milieu de transport et d'échange de nombreuses substances (nutriments, métabolites, oxygène, hormones...) vers les cellules et dans tous les organes. Il permet de réguler le milieu intérieur et participe à la défense de l'organisme. En terme de volume, 45 % du sang est constitué d'éléments figurés représentés à 99 % par les globules rouges (ou érythrocytes), à 0,2 % par les globules blancs (ou leucocytes) et de 0,6 à 1 % par les plaquettes (thrombocytes). Les 55 % restants constituent la partie liquide du sang, le plasma sanguin. Le plasma est constitué de 90 % d'eau et de 10 % de solutés tels que des substances nutritives comme des sels minéraux (électrolytes), des glucides, des lipides, des vitamines, des hormones ou encore des déchets métaboliques (Tableau I-1).

Constituant	**Quantité (mmol.L^{-1}) / Concentration**
Eau	91 % de la masse plasmatique
Ions inorganiques	< 1 % de la masse plasmatique
Na^+	145 mmol.L^{-1}
K^+	4 mmol.L^{-1}
Ca^{2+}	2,5 mmol.L^{-1}
Mg^+	1,5 mmol.L^{-1}
Cl^-	103 mmol.L^{-1}
HCO^{3-}	24 mmol.L^{-1}
Phosphates (surtout HPO_4^{2-})	1 mmol.L^{-1}
SO_4^{2-}	0,5 mmol.L^{-1}
Protéines	7 % de la masse plasmatique
Albumines	40-45 g.L^{-1}
Globulines	25-40 g.L^{-1}
Fibrinogènes	2-4 g.L^{-1}
Nutriments	
Glucoses et autres glucides	5,6 mmol.L^{-1} / 1 g.L^{-1}
Acides aminés totaux	2 mmol.L^{-1} / 0,4 g.L^{-1}
Lipides totaux	7,5 mmol.L^{-1} / 5 g.L^{-1}
Cholestérol	4 – 7 mmol.L^{-1} / 1,5 – 2 g.L^{-1}
Vitamines	0,05–100 µmol.L^{-1} / 0,001–3 mg.L^{-1}
Oligo-éléments	0,1–10 µmol.L^{-1} / 0,01 – 3 mg.L^{-1}
Hormones	10 ng.L^{-1}– 0,5 g.L^{-1}
Déchets	
Urée	5,7 mmol.L^{-1} / 340 mg.L^{-1}
Créatinine	0,09 mmol.L^{-1} / 10 mg.L^{-1}
Acide urique	0,3 mmol.L^{-1} / 50 mg.L^{-1}
Bilirubine	3 – 18 µmol.L^{-1} / 0,2 – 1,2 mg.L^{-1}
Gaz	
CO_2	1 mmol.L^{-1}
O_2	0,1 mmol.L^{-1}
N_2	0,5 mmol.L^{-1}

Tableau I-1 : Principaux constituants du plasma humain [2].

Le plasma est un fluide extrêmement riche en protéines si bien qu'il constitue le milieu le plus étudié pour leurs analyses. La protéine la plus abondante du plasma est l'albumine qui joue un

rôle essentiel dans le transport. Les protéines de coagulation comme le fibrinogène et les immunoglobulines, qui protègent l'organisme d'agressions externes par des agents pathogènes, sont également présentes en forte concentration. En outre, le plasma contient des protéines messagères (hormones peptidiques et protéiques) pour réguler le métabolisme. D'autres protéines peuvent être anormalement présentes dans le plasma et marquent alors un dysfonctionnement de l'organisme [3]. Pour illustration, après une crise cardiaque, la myoglobine est libérée dans le plasma. Certaines peuvent être sécrétées à partir de cellules cancéreuses ou de tissus malades. Ces protéines sont des marqueurs biologiques ou biomarqueurs potentiels. Par définition, un biomarqueur est une caractéristique qui peut être mesurée objectivement comme indicateur d'un processus biologique normal, d'un processus pathologique ou comme réponse à une intervention thérapeutique [4].

Grâce à l'abondance et l'hétérogénéité des protéines présentes dans le plasma, ce milieu est extrêmement riche d'informations pour le diagnostic clinique [5], mais en pratique, l'analyse des protéines demeure très complexe. Plus de 300 protéines ont déjà été répertoriées comme protéines du plasma et elles sont représentées sur une très large gamme dynamique de concentrations. Comme en témoigne la figure I-4, l'albumine est présente à une concentration d'une dizaine de $mg.mL^{-1}$ alors que les interleukines, protéines minoritaires, sont seulement à des teneurs de l'ordre du $pg.mL^{-1}$.

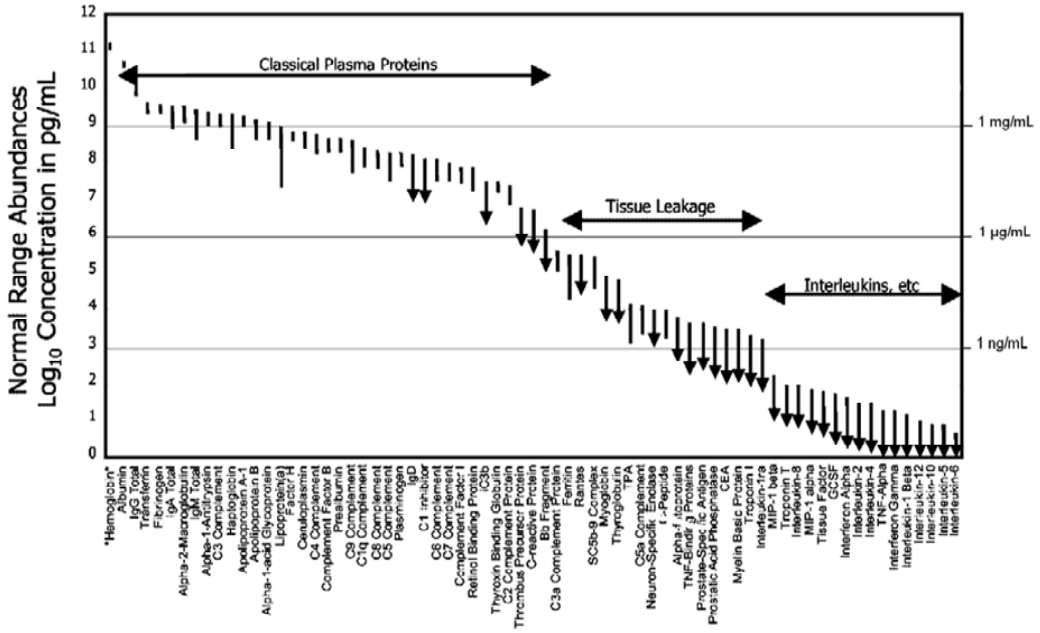


Figure I-4 : Abondances de 70 protéines du plasma exprimées sur échelle en logarithme décimal qui s'étend sur 12 ordres de grandeur, d'après [3].

L'albumine représente à elle seule plus de la moitié de la totalité des protéines du plasma et les 10 protéines majoritaires correspondant à 90 % de la totalité des protéines du plasma. Il s'agit

par exemple des immunoglobulines, de la transferrine, de l'haptoglobuline, et des lipoproteines etc... Si on prend en compte toutes les protéines majoritaires et moyennement majoritaires, il apparaît au final que 22 protéines correspondent à 99 % de la masse totale des protéines du plasma comme illustré sur la figure I-5.

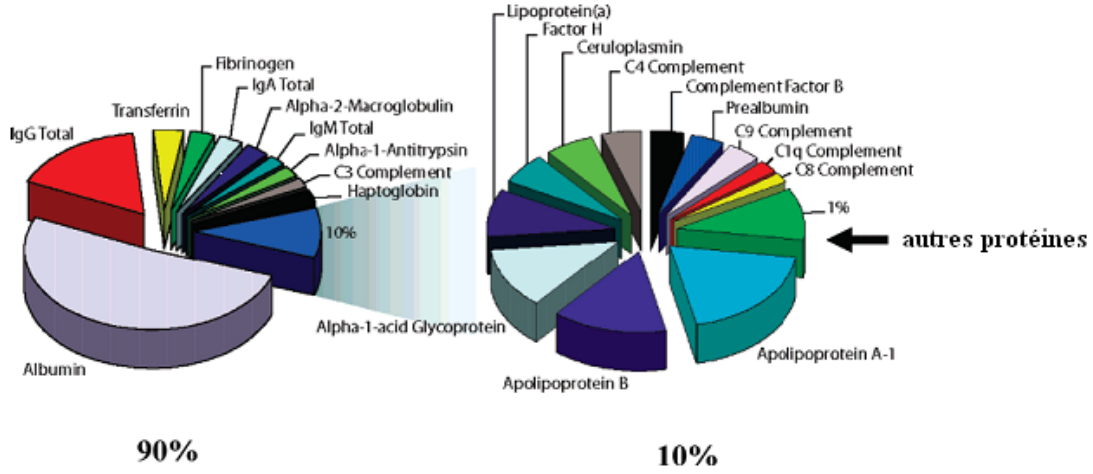


Figure I-5 : Représentation de la gamme dynamique de concentrations des protéines dans le plasma humain [5].

De forts besoins émergent actuellement au niveau de l'analyse des protéines minoritaires et les grandes tendances actuelles concernent notamment l'identification et la quantification de biomarqueurs. Pour illustration, les protéines marqueurs de cancers (l'antigène prostatique spécifique, PSA ou l'antigène carcino-embryonnaire, ACE) sont présentes dans le plasma à des concentrations de l'ordre du $ng.mL^{-1}$ voire du $pg.mL^{-1}$. Leur analyse dans le plasma constitue actuellement un réel challenge lié à la sensibilité des outils analytiques.

I.2. Méthodes analytiques pour l'identification de protéines

On distingue différentes approches pour l'analyse de protéines. L'approche la plus classique dite de « protéomique descriptive » consiste à analyser de manière exhaustive l'ensemble des protéines exprimées à un instant donné dans un échantillon biologique. La seconde approche est plus spécifique et est appelée « protéomique clinique » [6,7]. Cette approche en pleine expansion actuellement est fondée sur l'analyse de profils protéiques dans des échantillons biologiques pour la détection de nouveaux biomarqueurs protéiques spécifiques d'un état physiologique ou pathologique. La détection de biomarqueurs va ainsi permettre de réaliser un dépistage, un diagnostic d'une pathologie ou encore le suivi d'un traitement. D'une façon générale, dans la recherche de biomarqueurs, la découverte de biomarqueurs potentiels est suivie d'étapes

d'évaluation et de validation jusqu'au développement du dosage de la molécule pour des applications cliniques. En raison de la complexité des fluides biologiques, de la gamme dynamique étendue des protéines plasmatiques et de la très faible concentration des biomarqueurs, les techniques analytiques doivent être extrêmement spécifiques et sensibles.

Il existe deux stratégies d'analyse des protéines : du haut vers le bas (« top-down ») et du bas vers le haut (« bottom-up ») [8]. Dans l'approche « top-down », un mélange protéique est séparé en plusieurs fractions et chaque protéine individuelle intacte est analysée par spectrométrie de masse. Cette approche nécessite notamment des spectromètres de masse hautement résolutifs car les protéines sont identifiées par leur masse moléculaire. L'approche « bottom-up » quant à elle consiste à passer par une étape de digestion des protéines soit après une étape de séparation des protéines, soit sans séparation préliminaire (« Shotgun »). Les peptides peuvent être ensuite séparés avant d'être analysés par spectrométrie de masse. L'étape de digestion consiste à cliver les protéines (isolées ou en mélange) au moyen d'une enzyme protéolytique pour produire des fragments peptidiques. L'attribution de chaque peptide détecté est faite par comparaison des masses expérimentales aux masses théoriques des peptides générés *in silico* des banques de données informatiques. Cette technique permet l'identification des peptides qui sont attribués à chaque protéine digérée.

I.2.1. Méthodes électrophorétiques pour l'analyse de protéines

L'approche la plus courante pour l'analyse des protéines est l'électrophorèse bidimensionnelle sur gel de polyacrylamide, appelé gel 2D – PAGE («*two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis*») introduit par O'Farrel en 1975 [9] couplée à une identification par spectrométrie de masse (MS) [10].

Le gel 2D est un système orthogonal combinant deux séparations électrophorétiques permettant la séparation des protéines suivant leur point isoélectrique (pI) et leur masse moléculaire. La première dimension consiste en une focalisation isoélectrique (IEF). Cette séparation est devenue aisée et reproductible grâce à l'utilisation d'un gel dans lequel est immobilisé un gradient de pH (IPG, « *Immobilized pH Gradients* ») [11]. Les protéines migrent alors sous l'action d'un champ électrique jusqu'à une zone de pH égale à leur pI. La seconde dimension utilise un gel d'électrophorèse de polyacrylamide (PAGE) en présence de dodécylsulfate de sodium (SDS) qui va permettre de séparer les protéines en fonction de leur masse moléculaire [12]. La seconde dimension est le plus souvent effectuée dans des conditions dénaturantes afin de rompre les

éventuels ponts disulfure des protéines. Comme les paramètres de la séparation sont indépendants, cette technique est particulièrement résolutive : plusieurs centaines de protéines peuvent être séparées. Sur le gel, les protéines sont révélées par des techniques de coloration utilisant le bleu de Coomassie, 1'argent ou des réactifs fluorescents ou encore par autoradiographie (marquage radioactif). Les protéines apparaissent alors sous forme de taches de protéines ou spots sur un gel dont les intensités sont proportionnelles à la quantité de protéine.

Dans certains cas, les spots révélés ne correspondent pas à une seule protéine. Une alternative consiste à identifier les protéines par la technique d'immunoempreinte. Ainsi, les protéines, préalablement révélées, sont transférées sur une membrane de nitrocellulose par adsorption. Puis, tous les sites de fixation potentiels inutilisés de la membrane sont bloqués en saturant cette dernière. Cette étape est particulièrement importante car elle assure la spécificité de la technique. Des anticorps capables de reconnaître les protéines ciblées sont alors incubés (anticorps primaires) avec la membrane. Une fois le complexe antigène-anticorps formé, la détection s'effectue grâce à l'incubation d'anticorps secondaires qui détectent les emplacements des anticorps primaires fixés. L'anticorps secondaire est couplé à une enzyme qui, en présence d'un substrat, va le transformer en un produit détectable en UV ou par fluorescence.

Le plus souvent, après séparation sur le gel 2D, les tâches correspondant aux protéines d'intérêt sont découpées du gel et digérées par une enzyme. Ensuite, l'hydrolysat est analysé par spectrométrie de masse. Les masses des peptides ainsi obtenus expérimentalement sont comparées aux masses théoriques obtenues par digestion *in silico* des protéines présentes dans les banques de données, ce qui permet de retrouver l'identité de la protéine d'intérêt. Suivant le type de spéctrométrie (détaillé ultérieurement), on obtient une carte peptidique massique (« *Peptide Mass Fingerprint* », PMF) ou les séquences d'acides aminés des peptides. Ces stratégies sont illustrées sur la figure I-6.

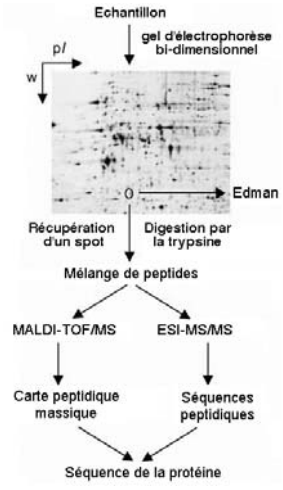


Figure I-6 : Schématisation de l'approche protéomique classique [13].

Même si l'électrophorèse en gel est très longue à mettre œuvre et consommatrice d'échantillon, elle reste très utilisée grâce à son pouvoir séparatif. Cependant, cette technique présente quelques limites. Hormis la possibilité de plusieurs protéines présentes pour un seul spot, les protéines ayant une masse moléculaire supérieur à 200 kDa ou inférieur à 10 kDa ainsi que les protéines particulièrement hydrophobes, acides (pI < 3) ou basiques (pI > 10) telles que les protéines membranaires et phosphorylées ne sont que très difficilement séparées. Enfin, cette technique reste difficilement automatisable, ce qui limite toutes analyses à haut débit. Dans ce contexte, des stratégies alternatives de séparations ont été développées.

Actuellement, la méthode d'analyse la plus utilisée pour les protéines consiste à effectuer une digestion enzymatique sur l'échantillon protéique, puis à séparer les peptides ainsi obtenus par chromatographie en phase liquide avant leur analyse par spectrométrie de masse.

I.2.2. Digestion enzymatique

Bien que la digestion des protéines engendre un mélange complexe d'un grand nombre de peptides, elle simplifie grandement l'analyse par spectrométrie de masse. En effet, la gamme limitée en masse des spectromètres basse résolution ne permet pas d'analyser des protéines intactes de haute masse moléculaire. De plus, dans le cas d'une source électrospray (ESI, détaillée ci-après), l'ionisation de macromolécules crée une enveloppe très complexe d'ions multichargés qui nécessite l'utilisation d'algorithmes de déconvolution menant au spectre dérivé et à la masse moléculaire de la protéine. A cet effet, une digestion peut être réalisée avant une détection par ESI-MS.

I.2.2.1. Les enzymes

Les enzymes sont des catalyseurs très spécifiques de réactions biologiques. Cette propriété est liée à la présence, dans leur structure, d'un site actif qui en forme de cavité au sein de laquelle se déroule la réaction enzymatique proprement dite. De manière générale, le site actif est d'une taille restreinte par rapport à la taille globale de l'enzyme. Il constitue donc le site de reconnaissance spécifique de l'enzyme. Deux modèles décrivent cette reconnaissance spécifique [14]. Le premier repose sur l'existence d'une complémentarité stérique et fonctionnelle entre le site actif de l'enzyme et le substrat, analogue à celle existant entre une clé et une serrure. Le second implique un changement de conformation du site actif de l'enzyme lors de la fixation du substrat, c'est l'ajustement induit. Dans les deux cas, la fixation du substrat sur l'enzyme a pour conséquence la formation du complexe enzyme-substrat (ES) indispensable à la réaction enzymatique pour

transformer le substrat en produit. A la fin de la réaction décrite figure I-7, comme tout catalyseur, l'enzyme est régénérée et peut de nouveau intervenir sur une autre molécule de substrat.

$$E + S \underset{k_{-1}}{\overset{k_1}{\rightleftharpoons}} ES \xrightarrow{k_2} E + P$$

Figure I-7 : Réaction globale de l'action enzymatique comportant la formation d'un complexe (ES) entre l'enzyme (E) et le substrat (S) qui se décompose ensuite pour donner le produit (P) et l'enzyme.

La cinétique d'une réaction enzymatique est décrite par l'équation de Michaelis-Menten obtenue par application de l'approximation de l'état quasi-stationnaire. Pour des temps courts, la vitesse peut être approximée à la vitesse initiale (V_0) qui s'exprime en fonction de la concentration en substrat [S], de V_{max} (vitesse maximum de la réaction pour des concentrations infinies en substrat) et de K_m, la constante de Michaelis (figure I-8).

$$V_o = \frac{V_{\max}[S]}{K_m + [S]} \qquad \text{où} \qquad V_{\max} = k_2[E]_0 \qquad K_m = \frac{k_{-1} + k_2}{k_1}$$

Figure I-8 : Equation de Michaelis-Menten.

La constante de Michaelis correspond en fait à la constante de dissociation pour le complexe ES (Kd). Autrement dit, 1 / K_m représente l'affinité du site actif de l'enzyme pour le substrat.

Une enzyme est aussi caractérisée par son activité. Il s'agit d'une mesure de la quantité d'enzymes active dans une préparation donnée. L'unité d'activité enzymatique (U) est définie comme la quantité d'enzyme qui catalyse la transformation d'une µmol de substrat par minute. Elle est obtenue par mesure de la vitesse de la réaction qu'elle catalyse dans des conditions définies.

Il existe plus de 3 500 enzymes différentes répertoriées. Les enzymes sont classées en fonction du type de réaction qu'elles catalysent. On distingue les oxydoréductases, les transférases, les hydrolases, les lyases, les isomérases et les ligases. Parmi les hydrolases, citons les peptidases (ou protéases, ou enzymes protéolytiques) qui catalysent les réactions d'hydrolyse de liaisons peptidiques et en particulier les endoprotéases qui agissent à l'intérieur de la chaîne peptidique. La plupart des peptidases clivent préférentiellement la chaîne peptidique à des positions précises en fonction de la nature des chaînes latérales des acides aminés qui entourent le site de coupure. Il existe cinq groupes de protéases classées selon leur mécanisme d'action qui est lui-même fonction de la nature du ou des acides aminés du site actif de l'enzyme. On distingue les protéases acides, à sérine, à thiol, à thréonine, à acide glutamique et les métalloprotéases. Dans le contexte de l'étude, la trypsine (23 800 Da), protéase à sérine et la pepsine (34 500 Da), protéase acide ont été utilisées.

Les protéases à sérines sont appelées ainsi car le site catalytique comprend une sérine en plus d'une histidine et d'un aspartate. Le groupement hydroxyle de la sérine joue le rôle de nucléophile et attaque le carbone du carbonyle de la liaison peptidique. La sérine forme une triade avec une histidine et un aspartate de manière à ce que la liaison O-H soit fortement polarisée. Le groupement hydroxyle de la sérine est déprotoné, transférant son proton à un noyau histidine qui lui même est activé par un aspartate. Le mécanisme commence par une première étape dans laquelle la protéine fixée se coupe en libérant sa partie C terminale, tandis que la partie N terminale acyle la sérine. Ensuite l'eau, qu'on appelle le second substrat, coupe la liaison acyle, ce qui permet de libérer le second peptide, régénérant la forme initiale de l'enzyme. Parmi les protéases à sérine, citons la chymotrypsine et la trypsine.

Les protéases acides possèdent un acide aspartique sur leur site actif et agissent à pH acide. Le mécanisme général ressemble beaucoup à celui des protéines à sérine. Les groupes importants sont deux aspartates qui jouent alternativement l'un le rôle de catalyseur acide et l'autre de catalyseur basique. L'intermédiaire serait une amine dihydroxylée, dont le mécanisme de coupure est analogue au mécanisme de formation, avec une molécule d'eau comme intermédiaire. La pepsine est une protéase acide.

A l'heure actuelle, certaines enzymes comme la trypsine, la papaïne, la chymotrypsine et la pepsine sont utilisées pour digérer les protéines et ainsi obtenir des peptides qui, selon l'enzyme utilisée et les conditions de digestion, seront caractéristiques de la protéine digérée.

I.2.2.2. Principe de la digestion enzymatique

La digestion enzymatique consiste à fragmenter de manière localisée une protéine au moyen d'une protéase. Les enzymes, comme toutes les protéines, sont très sensibles à la température, au pH et à la force ionique ; les conditions de digestion doivent donc être adaptées selon les enzymes immobilisées. En effet, les enzymes sont des molécules amphotères comportant un grand nombre de groupements acides et basiques. Les charges de ces groupements varient selon leur constante d'acidité et le pH de leur environnement. Ces variations ont un effet sur la charge globale de l'enzyme, la distribution des charges à sa surface et par conséquent sur la réactivité du site catalytique. Chaque enzyme possède donc un pH caractéristique pour lequel l'activité enzymatique est optimale. Le plus souvent, le pH optimal d'activité d'une enzyme reflète le pH de son environnement physiologique. Concernant la température, comme pour la plupart des réactions chimiques, la vitesse des réactions catalysées par des enzymes augmente en général avec la température. Cependant, l'élévation de la température au-dessus de 50 à 60°C peut modifier la

structure des protéines. Pour les enzymes, le maintien de leur structure est nécessaire à la fixation du substrat. Aussi, une élévation trop importante de la température peut conduire à la perte de l'activité enzymatique. Il existe donc une température optimale correspondant à la température physiologique, 37 °C.

L'enzyme la plus couramment utilisée est la trypsine. C'est une enzyme extrêmement spécifique hydrolysant la liaison peptidique côté C-terminal après les acides aminés, lysine et arginine sauf si ces acides aminés sont suivis par une proline, comme l'illustre la figure I-9.

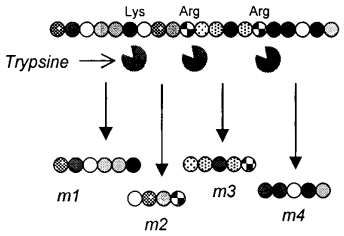


Figure I-9 : Obtention de peptides à partir d'une protéine par digestion trypsique, [15].

La trypsine est active dans des milieux légèrement basiques (pH 8) en présence de sels (tampons salins). La chymotrypsine, synthétisée en même temps que la trypsine au niveau du pancréas, peut induire des coupures supplémentaires lors de la digestion trypsique, ce qui complique l'interprétation des spectres de masse. Pour pallier ce problème, il existe une trypsine traitée avec un inhibiteur irréversible de la chymotrypsine, le Tosyl-L-phenylalanine chlorométhylcétone (TPCK). Le TPCK inhibe l'activité de la chymotrypsine sans modifier l'activité de la trypsine.

D'autres enzymes comme la pepsine peuvent être utilisées. La pepsine, synthétisée dans l'estomac, est active à pH acide (pH 1-3), elle coupe les liaisons peptidiques dans lesquelles est engagé un acide aminé aromatique. La pepsine, bien que moins spécifique que la trypsine, coupe préférentiellement au niveau des acides aminés phénylalanine, tyrosine, tryptophane et leucine [16]. Les ruptures sont d'ailleurs plus spécifiques à pH 1,3 au niveau des résidus phénylalanine et leucine. Cette spécificité est plus faible pour des pH supérieurs à 2.

La présence de cystéines dans la séquence d'acides aminés d'une protéine mène à la formation de ponts disulfures qui rigidifient considérablement la structure des protéines. La digestion de ces protéines est alors rendue difficile puisque les sites de coupures ne sont pas tous facilement accessibles. Aussi, avant la digestion enzymatique, un protocole de réduction-alkylation des ponts disulfures est très souvent appliqué pour rompre cette structure. Classiquement, un agent comme le dithiothréitol (DTT) est utilisé pour réduire les cystéines. Cette étape est généralement réalisée à chaud en présence d'un agent dénaturant comme l'urée en forte concentration (8 $mol.L^{-1}$)

pour solubiliser les protéines. Puis, une seconde étape consiste à bloquer les cystéines afin d'éviter leur oxydation et la reformation des ponts disulfures. Ainsi, en ajoutant un agent alkylant comme l'iodoacétamide, les groupements thiols (-SH) sont protégés [17,18].

I.2.2.3. La digestion sur gel et en solution

Après la séparation des protéines sur un gel d'électrophorèse, la digestion peut se faire directement sur le gel et suit un protocole standard [19]. Après lavage des gels pour éliminer les différents sels, les protéines subissent une réduction-alkylation des ponts disulfures. Les morceaux de gel d'intérêt sont découpés puis déshydratés par de l'acétonitrile et le tampon dans lequel se trouve l'enzyme est ajouté. Les échantillons sont ensuite analysés par spectrométrie de masse.

Lorsque que seule la chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse (LC-MS) est la méthode choisie pour l'analyse des protéines, celles-ci sont digérées le plus souvent en solution. Le protocole consiste à ajouter l'enzyme de digestion à l'échantillon de protéines dans les conditions optimales de pH et de température.

Théoriquement, plus il y a d'enzymes, meilleure est l'efficacité de digestion. Cependant, une concentration trop importante d'enzymes peut conduire à une autodigestion de celles-ci et donc à une efficacité de digestion limitée. De manière générale, les ratios enzyme/substrat (E/S), c'est-à-dire enzyme/protéine, utilisés sont entre 1/100 et 1/10 [20]. Ils permettent la digestion des protéines par l'enzyme tout en limitant son autolyse. Pour la trypsine, il est connu que la présence de calcium dans le milieu de digestion améliore l'efficacité de la digestion en inhibant le phénomène d'autolyse de l'enzyme [21].

L'inconvénient majeur de la digestion en solution reste la durée de digestion qui est très lente (de 4 à 20 heures) et limite considérablement les délais d'identification des protéines [22,23]. Pour cela, différentes modifications ont permis de réduire la durée de cette étape, comme par exemple l'augmentation de la température de digestion, la digestion assistée par micro-ondes [24] ou par ultra-sons [25]. La figure I-10 illustre l'amélioration de l'efficacité de digestion grâce à l'utilisation d'irradiations micro-ondes. La figure I-10 a) correspond au spectre de masse MALDI (décrit ci-après) obtenu après une digestion en solution de 12 minutes du cytochrome *c*. Comme attendu, compte tenu du temps court de digestion, aucun peptide trypsique n'est observé. La figure I-10 b) correspond au spectre de masse MALDI de la solution obtenu après une même durée de digestion assistée cette fois-ci par micro-ondes et l'on observe la digestion quasi-complète de la protéine.

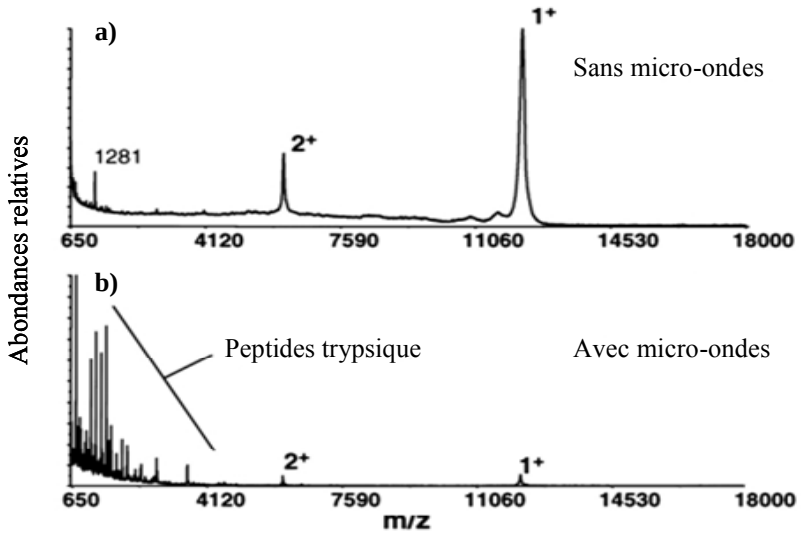


Figure I-10 : Spectres de masse MALDI du cytochrome c après 12 minutes de digestion trypsique (1/25) sans (a) ou avec (b) irradiations micro-ondes [24].

Même si ces techniques présentent un gain de temps, l'étape de digestion reste une étape manuelle, source d'erreurs et de contaminations. Pour ces raisons, l'équipe d'Irth a mis au point une digestion en solution capable d'être couplée en ligne à l'analyse par l'intermédiaire d'une source électrospray (décrite ci-après). Le système est constitué d'un long capillaire dans lequel une enzyme protéolytique est infusée en continu et mélangée avec la protéine d'intérêt amenée par la phase mobile après [26] ou avant [27] la séparation sur la colonne chromatographique. Ce système a été testé pour la digestion à la pepsine de différentes protéines comme la BSA, HSA, la myoglobine, l'hémoglobine et le cytochrome *c* [26] et pour la digestion de protéine HSA par la pronase [27] en donnant des résultats satisfaisants. Cependant, malgré toutes ces améliorations, les problèmes liés à l'autodigestion de l'enzyme et à la présence de trypsine dans le milieu à analyser persistent toujours.

I.2.2.4. Digestion sur support d'enzymes immobilisées

Pour réduire la durée de digestion et le phénomène d'autodigestion, il existe une alternative à la digestion en solution : la digestion sur support d'enzymes immobilisées. Cette technique consiste à immobiliser l'enzyme sur un support solide et à mettre en contact l'échantillon à analyser. L'immobilisation d'enzymes permet d'augmenter fortement la concentration locale en enzymes tout en limitant son autodigestion et sa présence dans le milieu après digestion. La durée de digestion est alors fortement diminuée par rapport à une digestion en solution car en moins de 30 minutes, la protéine peut être digérée. De plus, les enzymes peuvent être réutilisées et leur

immobilisation les rend moins sensibles aux agents dénaturants [28]. Les enzymes immobilisées peuvent être utilisées en différents formats comme en pipette ou en plaques 96-puits. Elles peuvent également être placées dans une microcolonne ou disque pour former un microréacteur enzymatique appelé IMER (« *IMmobilized Enzyme Reactor* »). L'IMER présente l'avantage de pouvoir être directement couplé aux méthodes analytiques comme la chromatographie liquide et la spectrométrie de masse. La digestion en ligne offre donc une identification plus rapide des protéines. L'immobilisation d'enzymes sur support solide pour la digestion des protéines étant un des développements de ce travail, elle sera étudiée plus en détail dans le chapitre II.

I.2.2.5. Conclusion

En conclusion, l'étape de digestion est le plus souvent réalisée en solution. Cependant, elle est longue et implique une étape manuelle, donc un risque de contamination. La digestion sur réacteur d'enzymes immobilisées permet de s'affranchir de ces inconvénients puisque l'immobilisation implique l'augmentation du ratio E/S tout en limitant les phénomènes d'autodigestion de l'enzyme. De plus, l'utilisation de ces supports sous des formats colonnes permet de coupler en ligne la digestion à la séparation chromatographique, ce qui rend l'analyse automatisable. Enfin, les enzymes une fois immobilisées sont réutilisables. C'est pourquoi cette approche suscite actuellement un intérêt croissant et sera développée dans cette étude.

I.2.3. Méthodes chromatographiques

I.2.3.1. Approches conventionnelles

Aujourd'hui, la chromatographie en phase liquide (LC) est devenue un outil indispensable pour l'analyse des protéines en raison de son pouvoir résolutif, de sa reproductibilité et surtout de la facilité de couplage avec la spectrométrie de masse [29,30]. Tout comme l'électrophorèse en gel, la chromatographie liquide peut être utilisée pour la séparation de protéines avant l'analyse par spectrométrie de masse précédée ou non d'une digestion enzymatique. Le plus grand nombre d'applications porte surtout sur la séparation des peptides obtenus après digestion enzymatique d'une ou de plusieurs protéines.

Un autre avantage de la LC est la diversité des phases stationnaires disponibles permettant de mettre en œuvre différents types de mécanismes d'interactions comme de l'échange d'ions, de

l'exclusion stérique ou encore des interactions hydrophobes par l'utilisation de phases stationnaires à polarité de phase inversée (RP, *Reversed Phase*). Ces phases stationnaires RP sont utilisées pour l'analyse des peptides puisque les phases mobiles utilisées sont particulièrement adaptées au couplage LC-MS. En effet, les phases mobiles sont des mélanges hydro-organiques qui sont idéaux pour l'ionisation des molécules.

Les phases stationnaires employées en RP-LC sont des particules de silice greffées par des chaînes alkyles (C_{18}, C_8...) ou encore des polymères (PLRP-S). Ces particules de phase stationnaire ont des diamètres compris entre 1,6 et 5 µm, la taille des pores variant entre 80 et 300 Å. Les colonnes analytiques sont de diamètres compris entre 1 et 4.6 mm avec des débits de phase mobile choisis en conséquence et allant de 40 $\mu L.min^{-1}$ à 1 $mL.min^{-1}$, pour les plus classiques.

I.2.3.2. Nanochromatographie

Plus récemment, des colonnes de plus faible diamètre interne, entre 20 et 250 µm d.i., ont été développées dans des capillaires de silice fondue induisant l'utilisation de faibles débits compris entre 20 $nL.min^{-1}$ et 10 $\mu L.min^{-1}$. La réduction du diamètre des colonnes a permis une forte augmentation de la sensibilité et une diminution de la quantité de solvants utilisés. En effet, la miniaturisation du système analytique présente un intérêt majeur pour l'analyse d'échantillons disponibles en très faible volume (cellules, tissus,…) et se justifie également par le coût de certains réactifs (molécules d'intérêts, enzymes, anticorps, …).

Des phases particulaires existent pour ce format mais impliquent l'utilisation de capillaires de larges diamètres. A ce propos, des phases avec des particules de silice C_{18} non poreuses de diamètre 1 µm ont été développées pour l'analyse de petits composés et a obtenu une grande efficacité avec plus de 200 000 plateaux théoriques en 6 minutes [31]. Cette colonne a ensuite été utilisée pour la séparation des peptides d'un digestat trypsique de l'ovalbumine et une capacité de pic de 300 a été obtenue. A priori, la détection de 35 peptides était attendue, mais un grand nombre d'autres composés ont été observés résultant probablement d'une digestion incomplète engendrant des peptides supplémentaires, de fragments d'autolyse de la trypsine et d'impuretés des réactifs. Toutefois, la faible taille des particules a nécessité l'utilisation de systèmes de pompage à haute pression (5000 à 9000 bars), donc un équipement spécial et coûteux. De plus, les phases particulaires posent le problème du remplissage laborieux dans les capillaires et de la délicate fabrication de frittés de bonne qualité. Pour ces raisons, l'utilisation de phases particulaires en format capillaire a été abandonnée au profit de nouvelles phases.

Récemment, des phases monolithiques synthétisées *in situ* dans les capillaires ont été développées. La structure monolithique est continue et constituée de pores interconnectés, elle ne possède donc pas de volumes interstitiels comme pour les colonnes particulaires. Les monolithes possèdent une distribution bimodale des pores. Cette structure est représentée sur la figure I-11.

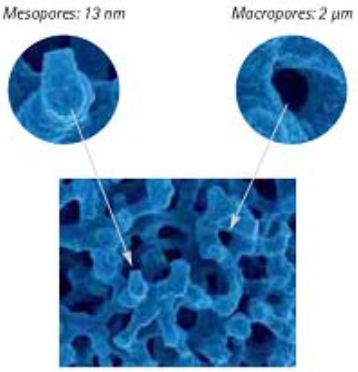


Figure I-11 : Image d'une phase monolithique commerciale, la Chromolith® (Merck) représentant la structure bimodale.

Les mésopores assurant au support une grande surface et les macropores assurant une grande perméabilité [32]. Ainsi, le transfert de masse est plus rapide ce qui permet d'améliorer l'efficacité des séparations [33]. De plus, la grande perméabilité des phases monolithiques induit une faible perte de charge permettant l'utilisation de plus longues colonnes ou des débits plus élevés pour améliorer les performances des séparations [34]. Enfin, les monolithes en format capillaire ne nécessitent plus l'utilisation de frittés puisque la phase est liée de façon covalente à la paroi interne du capillaire. Deux types de monolithes peuvent être utilisés pour la séparation des peptides : des monolithes inorganiques et organiques. Les monolithes à base de silice ont été développés en 1996 par Tanaka et Nakanishi [35] et sont actuellement commercialisés par Merck (Darmstadt, Allemagne) sous le nom Chromolith^{TM} disponible en diamètre de 100 µm. Les monolithes organiques les plus développés sont ceux à base de poly-(styrène-divinylbenzène) (PS-DVB) [33,34,36]. La séparation d'un digestat trypsique sur un capillaire monolithique de PS-DVB de 20 µm d.i. couplée à une détection par spectrométrie de masse ont ainsi permis l'obtention d'une efficacité de séparation de 100 000 plateaux.m^{-1} et une sensibilité d'environ 10 amol [37]. En comparant cette colonne à la même phase monolithique dans un capillaire de 75 µm d.i., la sensibilité a été améliorée d'un facteur 20. Cependant, même si les monolithes à base de polymères organiques présentent une très bonne compatibilité aux composés biologiques avec une large gamme de pH utilisable, des phénomènes de gonflement en milieu organique ont été observés. Enfin, ils peuvent contenir des micropores qui affectent l'efficacité et la symétrie des pics [38].

La miniaturisation de la colonne chromatographique requiert forcément un couplage à une méthode de détection adaptée pour obtenir un gain en sensibilité. Le couplage de la nano-chromatographie avec une détection UV nécessite ainsi des cellules de détection de très faible volume tout en conservant un trajet optique suffisamment long. On peut citer la cellule nano UZ-view de chez Dionex (Ultimate–LC Packings) dont la géométrie en Z induit une cellule de très faible volume (3 nL) avec un trajet optique de 10 ou 30 mm. Le couplage de la nanochromatographie avec une détection par spectrométrie de masse demande également une source adaptée fonctionnant à faibles débits associée à des analyseurs très sensibles. Par couplage nanoLC-MS, un gain important en sensibilité a été obtenu, ce qui permet une réelle avancé pour l'analyse des protéines [39].

Malgré ce gain en sensibilité et en efficacité, après digestion d'un mélange complexe de protéines, les peptides obtenus ne peuvent pas être séparés avec une résolution optimale sur une seule colonne LC. Pour améliorer la résolution, la chromatographie multidimensionnelle basée sur différents mécanismes de séparation peut être utilisée pour augmenter la capacité de pic.

I.2.3.3. Chromatographie multidimensionnelle

Le principe de la chromatographie multidimensionnelle consiste à coupler deux colonnes chromatographiques induisant deux mécanismes de rétention différents. Plusieurs modes ont été combinés (phase inverse, échange d'ions, exclusion, affinité, interactions hydrophiles) pour des séparations de peptides [29,30,38,40]. Cependant la configuration la plus utilisée est celle couplant une colonne échangeuse de cations assurant une première séparation à pH acides de peptides majoritairement chargés positivement, avec une colonne à polarité de phase inversée pour une seconde séparation orthogonale par interactions hydrophobes [41,42]. Tout d'abord, des formats classiques de colonnes analytiques ont été utilisés mais la nanochromatographie multidimensionnelle couplée à la spectrométrie de masse se développe actuellement, ce qui constitue une grande avancée pour l'élaboration de procédés analytiques miniaturisés [43]. Dans ces systèmes, les deux colonnes utilisées sont généralement séparées physiquement par une boucle *via* une vanne de commutation. Ainsi, les fractions issues de la première dimension peuvent être collectées puis injectées une à une vers la colonne séparative de la seconde dimension.

Une autre approche appelée MudPIT pour « *Multi-Dimensional Protein Identification Technology* » a été introduite par l'équipe de Yates en 2001 [44]. Le principe repose sur l'utilisation d'une colonne capillaire bi-phasique remplie en série par une résine échangeuse de cations et d'une résine de phase inverse. Dans un premier temps, les peptides sont élués selon leur charge par une

série de paliers de force ionique croissante pour se déposer en tête de la deuxième phase constituant la colonne, celle-ci à polarité de phase inversée. Ils sont ensuite élués une seconde fois en fonction de leur hydrophobicité croissante vers le spectromètre de masse. Le principe de l'approche MudPIT est schématisé sur la figure I-12.

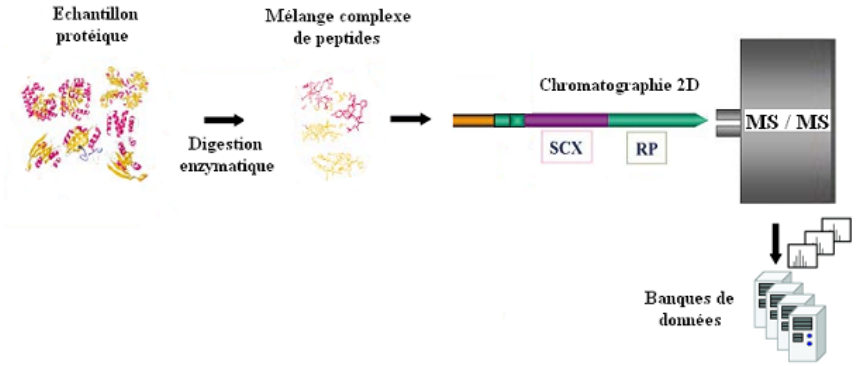


Figure I-12 : Analyse d'un mélange de protéines par la méthode MudPIT (« Multidimensional Protein Identification Technology »*).*

Le grand intérêt de ce système est qu'il ne nécessite pas d'interface entre les deux dimensions et donc pas de volumes morts associés aux systèmes de commutation de vannes. Par la méthode MudPIT, l'analyse du protéome de *Saccharomyces cerevisiae* a permis de détecter 5 540 peptides et donc d'identifier 1 484 protéines incluant des protéines faiblement abondantes et des protéines ayant des pI extrêmes. De plus, la gamme dynamique des protéines détectées a été estimée à 10 000 [45].

La chromatographie liquide tridimensionnelle couplée à la spectrométrie de masse a aussi été envisagée pour augmenter la capacité de pic et améliorer la résolution de la séparation des peptides [46,47]. La colonne utilisée étant alors constituée d'un support triphasique avec une première partie de support hydrophobe, une partie échangeuse de cation et la dernière partie est à nouveau un support hydrophobe.

Malgré ces résultats intéressants, la chromatographie en phase liquide multidimensionnelle demeure complexe à mettre en œuvre et nécessite des étapes d'optimisation assez longues.

I.2.4. Détection par spectrométrie de masse

I.2.4.1. Principe

La complexité des systèmes biologiques pose de nombreux problèmes pour l'analyse des protéines en raison de leur hétérogénéité sur le plan physico-chimique comme sur le plan dynamique d'expression. La grande sensibilité et la grande spécificité de la spectrométrie de masse

en font l'outil quasi incontournable pour leur identification mais aussi pour leur caractérisation (modifications post-traductionnelles, chimiques, mutations d'acides aminés…).

Pendant de nombreuses années, la spectrométrie de masse, au même rang que la résonance magnétique nucléaire (RMN), a été utilisée pour élucider la structure de molécules organiques isolées. Les avancées technologiques de ces dernières années (instrumentation, techniques d'ionisation, analyse et exploitation des données...) ont permis un essor extraordinaire et l'ouverture vers de nouvelles perspectives dans l'analyse des biomolécules.

D'une manière générale, la spectrométrie de masse consiste à produire des ions à partir de composés et à les détecter en fonction de leur rapport masse/charge (noté *m/z*, où m est la masse du composé et z son nombre de charge). Les informations obtenues permettent d'établir les abondances relatives des ions en fonction du rapport *m/z*. La détection par spectrométrie de masse comprend principalement quatre étapes :

• l'introduction de l'échantillon à analyser,

• l'ionisation des molécules à analyser et leur passage en phase gazeuse,

• la séparation des ions dans l'analyseur qui sert à mesurer le rapport *m/z* des ions générés,

• la détection des ions et le traitement du signal : le courant d'ion doit être converti en courant électrique et amplifié afin de permettre l'obtention de données exploitables *via* un traitement informatique.

I.2.4.2. Les sources d'ionisation

L'analyse des molécules par spectrométrie de masse passe par une première étape qui est leur ionisation. De nombreuses techniques d'ionisation sont actuellement utilisées en spectrométrie de masse, leur choix est fonction de la nature de l'échantillon et du type d'analyse. Cette étape fait éventuellement suite à une séparation des molécules par chromatographie en phase gazeuse ou liquide dans le cas de mélanges complexes comme ceux rencontrés en bioanalyse. La production des ions en phase gazeuse implique, au préalable, l'évaporation de l'échantillon dans le vide. Si cette approche est adéquate pour les molécules organiques qui sont des systèmes volatiles, les biomolécules telles que les peptides ou les protéines sont molécules de large gamme de polarité, thermolabiles et/ou de haute masse molaire sont dégradées par pyrolyse avant même d'être ionisées. L'incroyable essor des applications de la spectrométrie de masse pour l'étude de biomolécules est lié au développement, à partir des années 80, de nouvelles sources de désorption-ionisation dites douces que sont les sources électrospray (ESI) [48] et de désorption-ionisation laser assistée par matrice (MALDI) [49]. Ces deux techniques d'ionisation largement utilisées pour l'analyse des

macromolécules biologiques ont comme point commun le processus de désorption qui conduisent à des espèces quasi microscopiques, les agrégats. Ces agrégats sont constitués d'un grand nombre de molécules de solvant en mode ESI ou de matrice pour le MALDI. Ils stabilisent une (ou plusieurs) biomolécules multichargées selon leur taille et leur forme. Par le jeu de transferts d'énergie, une cascade de désolvatations conduit à la libération d'ions quasi moléculaires désolvatés, avec le minimum d'énergie interne.

(i) L'électrospray

L'électrospray (ou électronébulisation) est une technique qui permet de produire des ions à partir de composés en solution. La spécificité de l'ESI est de générer des ions à pression atmosphérique, ce qui facilite grandement le couplage avec la LC. Le principe est schématisé sur la figure I-13.

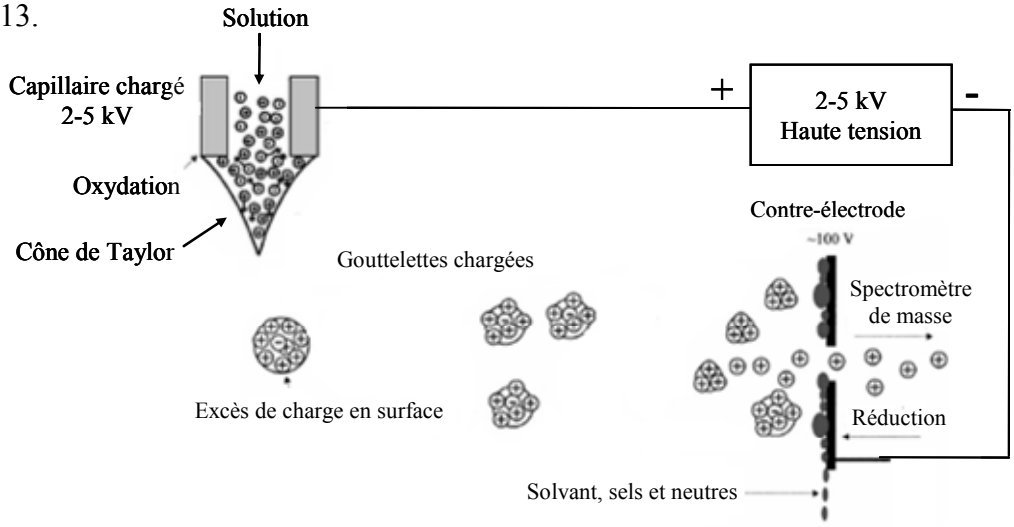


Figure I-13 : Schéma du fonctionnement de la source électrospray en mode d'ionisation positive, d'après [50].

Les mécanismes d'ionisation sont bien décrits dans la littérature [51] et peuvent être résumés comme suit. L'échantillon liquide passe à travers un capillaire métallique soumis à un potentiel électrique élevé provoquant une polarisation du liquide et une séparation des charges positives et négatives. L'accumulation de charges à la pointe du capillaire déforme le liquide qui prend la forme d'un cône appelé « cône de Taylor ». Ce cône va s'étirer jusqu'à éclater en nombreuses gouttelettes fortement chargées. Ces gouttelettes vont alors se déplacer sous l'action du champ électrique et du gradient de pression entre la source et l'analyseur. Ce phénomène est en général assisté par un gaz co-axial (azote) stabilisant la formation des gouttelettes. Au cours de ce trajet, le solvant contenu dans les gouttelettes est évaporé au contact de l'azote chauffé produisant des agrégats chargés. L'évaporation du solvant entraîne une diminution de la taille des gouttelettes possédant une charge constante et donc une augmentation de la densité de charge à leur surface. Lorsque les forces de

répulsion coulombienne deviennent supérieures à la tension superficielle (limite de stabilité de Rayleigh), les gouttelettes sont instables et une cascade d'explosions coulombiennes se produit (fission des gouttelettes). Ce phénomène se reproduit jusqu'à ce que les nouvelles gouttelettes aient à nouveau atteint la limite de Rayleigh. Puis, afin d'attirer les ions à l'intérieur du spectromètre de masse, une tension opposée à la charge des ions analytes est appliquée à l'entrée de celui-ci.

Deux théories sont proposées pour expliquer ce mécanisme d'ionisation-désolvatation : le modèle du résidu chargé ou « *charged residue model* » (CRM) proposé par Dole [52] et le principe de l'évaporation ionique ou *« ion evaporation model »* (IEM) d'Iribarne et Thomson [53]. Le premier est présenté sur la figure I-14 a). Ce mécanisme propose une succession d'explosions coulombiennes jusqu'à obtenir une dernière gouttelette ne contenant qu'un seul ion. Puis, les dernières molécules de solvant contenues dans cette gouttelette vont s'évaporer permettant l'obtention d'ions multichargés en phase gazeuse.

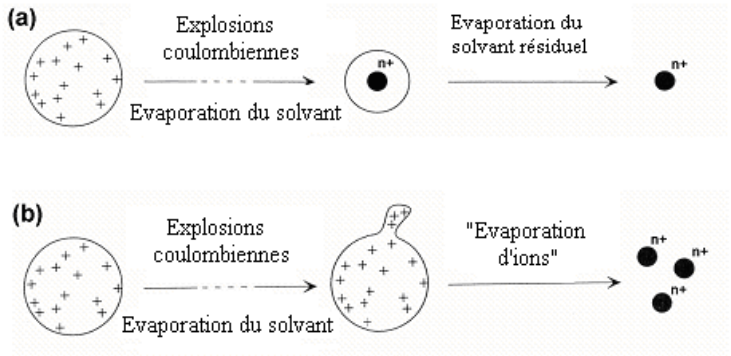


Figure I-14 : Représentation schématique de l'émission des ions en phase gazeuse en électrospray d'après le modèle de Dole (a) et le modèle d'Iribarne et Thomson (b).

D'après la seconde théorie d'Iribarne et Thomson illustrée sur la figure I-14 b), lorsque les gouttelettes atteignent un rayon de l'ordre de 10 nm après évaporation du solvant et une série d'explosions coulombiennes, la densité de charge est suffisamment élevée pour que l'ion soit directement expulsé en phase gazeuse. Il est dorénavant admis que le modèle de Dole expliquerait le processus de désorption/ionisation des macromolécules (protéines) alors que le modèle d'Iribarne et de Thomson s'appliquerait plutôt aux molécules de faible taille [54].

L'électrospray est aujourd'hui une méthode d'ionisation-désorption couramment utilisée dans des domaines variés et notamment dans l'étude des peptides et des protéines. En effet, dans le cas de molécules possédant plusieurs sites basiques ou acides, l'ionisation par électrospray conduit à des ions multichargés de type $[M+nH]^{n+}$ ou $[M-nH]^{n-}$. Il existe différentes géométries de source, où le capillaire porté à haute tension fait un angle avec la contre-électrode. Les sources peuvent être

orthogonales, c'est-à-dire que le capillaire par lequel arrive la solution est positionné pratiquement perpendiculairement par rapport à l'entrée du spectromètre de masse. La géométrie Z-spray (Waters) est aussi assez répandue. Ces géométries limitent l'introduction des molécules non ionisées et des sels dans la source.

De manière générale, pour l'électrospray, les phases mobiles sont acidifiées par des acides organiques volatils tels que l'acide acétique ou l'acide formique pour favoriser la protonation de l'analyte, notamment au niveau des sites basiques des protéines. Pour l'analyse des peptides et des protéines, on considère que ce sont les fonctions amines des lysines, des arginines ainsi que l'extrémité N-terminale qui sont protonées. Par ailleurs, les contre-ions des acides comme l'ion trifluoroacétate peuvent former une paire d'ions très stable avec les groupements positifs de l'analyte ($-NH_3^+$ pour les peptides) qui n'est pas dissociée dans les sources électrospray, ce qui induit alors une diminution du signal. Il est également important de ne pas injecter dans la source électrospray des sels et des détergents non volatils comme ceux classiquement utilisés en biologie (NaCl, KCl, SDS…), notamment ceux utilisés lors de la digestion enzymatique. En effet, ceux-ci peuvent entrer en compétition avec les analytes durant l'étape d'ionisation ou encore former des adduits aboutissant parfois à l'extinction du signal des ions caractéristiques de la molécule à analyser [55]. En particulier dans le cas d'analyses d'échantillons biologiques, il est souvent nécessaire d'ajouter une étape de dessalage avant l'introduction dans la source électrospray. Pour cela il existe des kits de dessalage (Zip Tip®, Millipore), qui consistent en un embout de pipette contenant un lit de phase hydrophobe permettant la concentration et le dessalage des molécules d'intérêts [56]. Ce dessalage peut aussi être réalisé en ligne et donc couplé à l'analyse en LC-MS.

La source électrospray n'est pas adaptée aux faibles débits utilisés en nanochromatographie. Pour cela les sources micro-électrospray [57] et nano-électrospray (ou nanospray) [58] ont été développées. La source nanospray est constituée d'un capillaire en verre étiré de 1 à 3 µm de diamètre interne et recouvert de métal qui assure sa conductivité. Une différence de potentiel est alors appliquée entre cette aiguille et la contre-électrode afin de créer le spray. Le nanospray fonctionne avec des débits de l'ordre de quelques centaines de $nL.min^{-1}$. Ce débit étant très faible, aucun gaz de nébulisation n'est nécessaire pour former le spray, et les tensions appliquées sont beaucoup plus faibles (quelques centaines de volts contre plusieurs milliers de volts en électrospray). L'inconvénient principal lié à cette technique est le manque de reproductibilité du spray, en particulier lié à l'obturation possible du capillaire. Malgré cet inconvénient, le gain en sensibilité apporté par la miniaturisation fait du couplage nanoLC-MS une technique particulièrement bien adaptée pour l'analyse de biomolécules, et en particulier de protéines.

Récemment, un système clé en main, miniaturisé de LC-MS a été mis sur le marché par Agilent Technologies, le « 1200 Series HPLC-Chip/MS system ». Comme l'illustre la figure I-15, il s'agit d'un microsystème analytique, c'est-à-dire d'une puce intégrant une précolonne d'enrichissement d'échantillon et une colonne de séparation directement terminée par une pointe « nanospray » pour une détection par spectrométrie de masse qui sera plus longuement décrit au dernier chapitre [59].

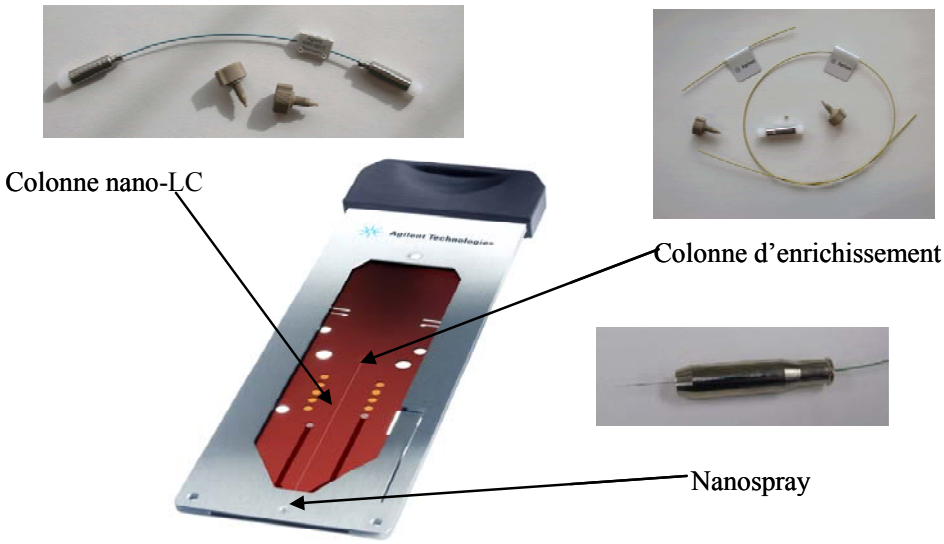


Figure I-15 : Représentation d'une puce-MS Agilent. Adapté de [60].

Encore peu de publications traitent de l'analyse par la puce-MS. On peut citer l'analyse d'un échantillon de plasma de rat qui met en avant la très bonne reproductibilité d'analyse en termes de temps de rétention et d'intensité de pics pour plus des 600 peptides détectés issus de la digestion d'un mélange de 8 protéines [61]. Les protéines ont toutes été identifiées avec succès, des limites de détection de l'ordre du fmol et une excellente linéarité des intensités de pic ont été obtenues. La méthode a même été améliorée en couplant une étape d'extraction sur une colonne échangeuse de cations permettant de piéger les peptides avant l'analyse sur la puce-MS, ce qui a facilité la détection de protéines très peu abondantes comme l'insuline présente à 80 $ng.mL^{-1}$ dans le plasma. Une étude a également porté sur l'analyse protéomique d'un échantillon de cellule cancéreuse du colon [62].

(ii) Ionisation laser assistée par matrice

Essentiellement couplée à des analyseurs à temps de vol (décrits ci-après), l'ionisation MALDI est particulièrement adaptée à l'étude des biomolécules. En effet, cette technique permet de

travailler sur une grande gamme de masses (500 Da à plusieurs centaines de kDa) avec une bonne sensibilité, une grande résolution en masse et également une bonne tolérance aux sels non volatils et aux tampons couramment utilisés en biologie. La source MALDI est utilisée pour l'ionisation de protéines intactes ou de peptides.

La technique MALDI consiste à utiliser un faisceau laser pulsé pour désorber et ioniser une matrice organique co-cristallisée avec l'analyte. Le principe est illustré en figure I-16. L'excitation de la matrice par le laser génère des ions moléculaires qui sont ensuite conduits dans un analyseur à temps de vol [63].

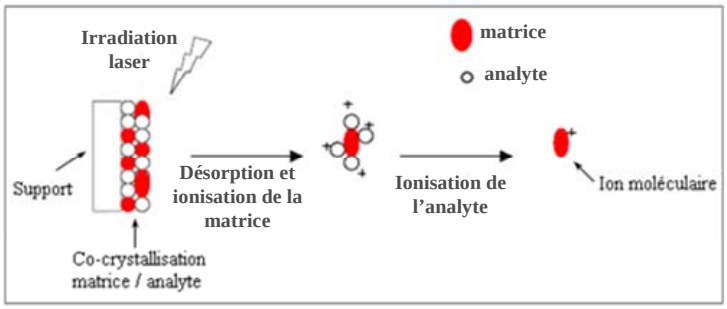


Figure I-16 : Principe de la désorption / ionisation MALDI [64].

La matrice joue un rôle essentiel en MALDI. Déposée en large excès par rapport à l'analyte, elle va permettre de protéger la molécule de la dégradation par le faisceau laser. Elle va absorber l'énergie des photons du faisceau laser provoquant ainsi l'ionisation, la dissociation et la sublimation de la matrice, favorisées par la température élevée. Le processus d'ionisation de la molécule a lieu en phase gazeuse après désorption par transfert de charge entre la matrice photoexcitée et l'analyte. Les ions sont ensuite accélérés par l'application d'un champ électrique intense entre la cible et la première lentille, appelée lentille d'extraction, avant de gagner l'analyseur. De manière générale, les ions observés sont monochargés. Toutefois, des ions multichargés ($[M+nH]^{n+}$) peuvent aussi être observés, selon la matrice utilisée et/ou l'intensité du laser.

I.2.4.3. Les analyseurs

Une fois les molécules ionisées par électrospray ou par MALDI, les ions sont extraits de la source au fur et à mesure de leur formation et sont transmis vers l'analyseur *via* une interface qui a pour but d'une part d'assurer leur transfert de la pression atmosphérique vers un vide poussé de 10^{-5} à 10^{-7} mbar, de refocaliser le faisceau d'ions divergent d'autre part et enfin de terminer le processus de désolvatation déjà entrepris au niveau de la source. Les ions sont alors acheminés vers

l'analyseur sous l'action combinée de champs électriques et de gradients de pression, et refocalisés par un jeu de lentilles électrostatiques et/ou par l'utilisation de multipôles (quadripôles, hexapôles ou octopôles) à leur entrée dans l'analyseur.

Une grande variété d'analyseurs, couplés à une source d'ionisation ESI ou MALDI, peut être utilisée pour la recherche protéomique. On distingue plusieurs types d'analyseurs utilisant un champ magnétique variable (spectromètre de masse à secteur magnétique), un champ magnétique fixe (résonance cyclotronique ionique à transformée de Fourier : FT ICR), un champ électrique fixe (spectromètre à temps de vol : TOF, Orbitrap) ou un champ électrique variable (filtre quadripolaire ; piège à ions). Dans certains cas, plusieurs analyseurs peuvent être couplés entre eux afin d'obtenir des appareils hybrides tels que des spectromètres de masse de type Q-TOF ou TOF-TOF développés pour des applications MS/MS.

(i) Performances des analyseurs

Les principales caractéristiques d'un analyseur sont la résolution (R), la précision sur la mesure de masse, la sensibilité et la gamme de masse détectable, c'est-à-dire la gamme de rapports *m/z* qu'il peut identifier.

La résolution caractérise la capacité de l'instrument à séparer deux pics proches, c'est-à-dire deux ions de rapport *m/z* voisins. En spectrométrie de masse, la résolution correspond aussi à la finesse des pics et peut être définie comme le rapport entre la masse m et la largeur Δm du pic de masse mesurée à une certaine fraction de sa hauteur ($R = m/\Delta m$). La résolution pour un pic isolé est le plus souvent calculée en prenant la largeur du pic Δm à mi hauteur, on parle alors de FWHM pour « *Full Width at Half Maximum* ». En pratique on parlera de « basse résolution » si $m/\Delta m < 5000$ et de « haute résolution » au-delà de cette valeur.

La précision sur la mesure de *m/z* est la capacité du spectromètre de masse à mesurer une masse la plus proche possible de la valeur théorique. Elle est le plus souvent exprimée en « partie par million » (ppm) et est définie par le rapport $(\Delta m_e / m) \times 10^6$ où Δm_e est l'erreur commise sur la mesure de la masse m (masse théorique).

Les analyseurs sont également caractérisés par leur sensibilité, c'est-à-dire la quantité minimale d'échantillon détectable et par leur vitesse de balayage correspondant au temps consacré pour l'établissement d'un spectre dans une gamme de *m/z* donnée. Le tableau I-2 compare les performances des analyseurs les plus courants.

Analyseur	Gamme de masse	Résolution	Précision sur la mesure de masse (ppm)
Quadripôle	10^3 à 10^4	10^2 à 10^3	100
Piège à ions	10^3 à 10^5	10^2 à 10^3	50 à 100
Temps de vol	$> 10^5$	10^3 à 10^4	5 à 20
Résonance cyclotronique	10^4	10^4 à 10^6	0,1 à 5
Orbitrap	10^5	10^6	1 à 2

Tableau I-2 : Principales performances des analyseurs, adapté de [65]

Les performances des analyseurs triple quadripôle et piège à ions sont relativement comparables en termes de résolution, gamme de masse et précision sur la masse. Cependant, même si le pouvoir de résolution du piège à ions peut atteindre des valeurs élevées, il n'est pas adapté aux mesures de masse de grande précision, en particulier pour l'identification d'une protéine inconnue. Pour cela, il existe des analyseurs à plus haute résolution comme l'analyseur à temps de vol. Ces analyseurs sont tous compatibles avec le mode d'ionisation électrospray. Cependant les appareils équipés de sources ESI couplées à des analyseurs quadripolaires et piège à ions et les sources MALDI couplés à des analyseurs à temps de vol dominent les applications en biologie. A cet effet, seuls les analyseurs quadripolaires, piège à ions et à temps de vol seront décrits dans ce chapitre.

(ii) L'analyseur à temps de vol

Le principe de base d'un analyseur à temps de vol (TOF) consiste à mesurer le temps de vol d'un ion, préalablement accéléré par un champ électrique, au travers d'une région libre de champ (le tube de vol) pour atteindre le détecteur. Sous l'action du champ électrique, tous les ions de même charge ont la même énergie cinétique et vont traverser le tube de vol durant un laps de temps dépendant de leur rapport *m/z* ; les ions de rapports *m/z* élevés arriveront plus tardivement au détecteur que ceux de faibles rapports *m/z.*

L'analyseur à temps de vol peut être couplé aux sources ESI et MALDI. Le couplage de l'électrospray, qui est un mode d'ionisation continue, peut être réalisé *via* une injection orthogonale pulsée des ions dans l'analyseur mais la source d'ionisation MALDI est la plus utilisée en couplage avec le TOF. En effet, l'ionisation pulsée de la source MALDI est particulièrement adaptée au TOF. Les paquets d'ions générés par les irradiations lasers sont accélérés et expulsés de la source. En théorie, le domaine de masse d'un analyseur TOF n'a pas de limite supérieure. L'analyse de molécules en mode linéaire est donc particulièrement bien adaptée pour l'étude des molécules de haute masse moléculaire comme les protéines. Cependant, la qualité des faisceaux d'ions pulsés est

insuffisante pour obtenir une haute résolution. Ceci s'explique en réalité par un élargissement des pics dont la cause principale est une distribution en énergie cinétique non homogène pour des ions de même rapport *m/z*. Pour corriger ces dispersions énergétiques, deux développements ont permis d'améliorer les performances instrumentales : l'extraction retardée et le réflectron permettant d'homogénéiser les énergies cinétiques des ions dans la source et les différences de vitesse des ions lors du trajet ionique. Il en résulte un gain en résolution. La figure I-17 est une représentation schématique du couplage MALDI-TOF.

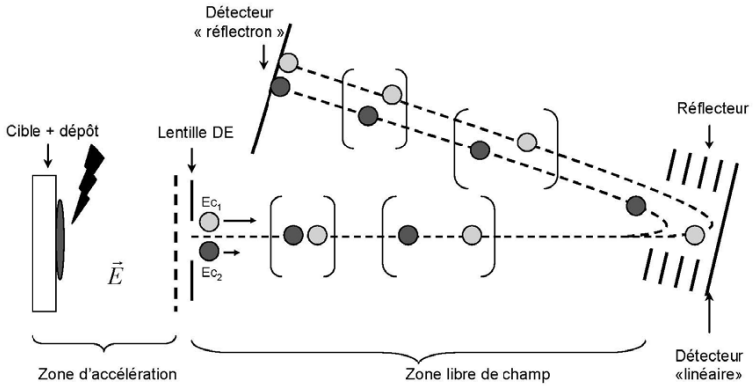


Figure I-17 : Représentation d'un couplage MALDI-TOF en mode réflecteur comportant un système d'extraction retardé (DE)[64] .

La technique MALDI-TOF est particulièrement utilisée en analyse protéomique pour l'établissement de cartes peptidiques massiques après électrophorèse en gel 2D et digestion enzymatique.

Pour l'analyse de protéines présentes en faible quantité dans des échantillons biologiques complexes, une nouvelle technologie s'apparentant au MALDI-TOF a été développée par Ciphergen, le SELDI-TOF (« *Surface Enhanced Laser Desorption Ionisation - Time Of Flight* »). Il s'agit d'une technologie fondée sur la rétention de protéines sur des puces (« ProteinChip^{TM} Array ») traitées pour adsorber sélectivement les protéines en fonction de leurs propriétés physico-chimiques. Après des lavages spécifiques, les protéines encore liées sont directement détectées par une analyse de type MALDI-TOF. Il existe plusieurs types de fonctionnalisation : hydrophiles, hydrophobes, échangeuses de cations, d'anions, les surfaces d'affinité métalliques (IMAC) ou d'affinité biologique (anticorps, récepteur, ligand, acide nucléique...). La technologie SELDI-TOF permet donc de simplifier le mélange protéique à analyser. Le principe est illustré en figure I-18.

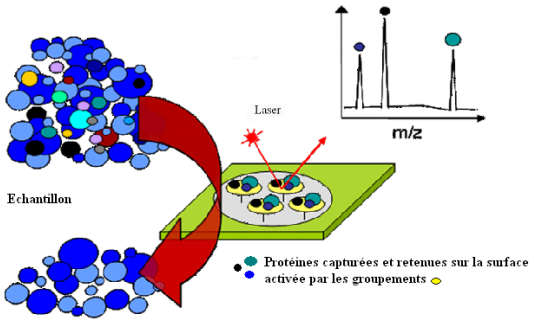


Figure I-18 : Schématisation de la technique SELDI-TOF.

Cette technique est utilisée pour l'établissement de profils protéiques simples en particulier dans le cadre de la protéomique différentielle. En effet, la comparaison des profils protéiques obtenus dans deux situations physiologiques différentes (sain / malade, sous traitement / sans traitement) permet de mettre en évidence les protéines dont l'expression est fortement modifiée et d'identifier ainsi des candidats biomarqueurs. Très rapidement, la technique SELDI-TOF a permis la découverte de nombreux marqueurs protéiques, en particulier dans le cas des pathologies cancéreuses [66]. Cependant, cette approche suscite encore un certain nombre de critiques et de controverses [67]. Cette technique ne permet pas l'identification des marqueurs détectés puisque seule une analyse en mode MS simple est effectuée. De plus, dans les quelques cas où les marqueurs ont été réellement identifiés, les concentrations sériques correspondent à des protéines majoritaires du sérum. On peut citer par exemple le biomarqueur établi du cancer de la prostate PSA (Antigène Prostatique Spécifique), présent à de très faibles concentrations plasmatiques ($ng.mL^{-1}$) et non détectable par SELDI-TOF [68]. Un autre principal défaut de la technique SELDI-TOF est son manque de reproductibilité. Des étapes de validation sont donc indispensables pour des applications cliniques.

L'identification des biomarqueurs détectés présente plusieurs intérêts, elle permet notamment d'envisager le développement d'anticorps spécifiques de ces marqueurs et donc le transfert vers le développement de tests cliniques. L'identification peut être effectuée par des techniques de spectrométrie de masse en tandem (MS/MS) et des analyseurs comme le triple quadripôle ou encore le piège à ions.

(iii) Les filtres quadripolaires

a) Le quadripôle

Un quadripôle est formé de quatre barres conductrices parallèles de section hyperbolique ou circulaire jouant le rôle d'électrode. Un quadripôle est présenté sur la figure I-19.

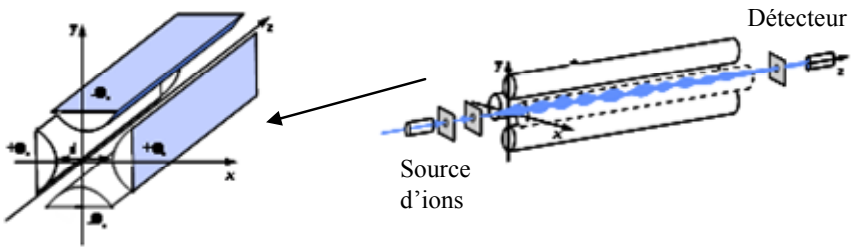


Figure I-19 : Schéma du quadripôle à section hyperbolique (en haut) ou cylindrique (en bas) [69].

Les barres opposées sont reliées électriquement 2 à 2 et soumises à une tension électrique constituée d'une composante alternative haute fréquence V et d'une tension continue U. Le même potentiel est soumis aux deux couples de barres mais de signe opposé de manière à créer un champ quadripolaire entre les quatre électrodes. Le mouvement d'une particule chargée pénétrant selon l'axe z du quadripôle est décrit par les équations de Mathieu. Celles-ci tiennent compte des caractéristiques physiques du quadripôle (en particulier de la distance d séparant deux barres opposées), des caractéristiques de l'ion (*m, z*) ainsi que des paramètres du champ. Selon les valeurs de U et V, la résolution de ces équations indique les conditions pour lesquelles un ion aura une trajectoire stable et oscillante pour franchir correctement le filtre et ainsi d'atteindre le détecteur. Les autres ions se déchargent par contact sur les barres du quadripôle et ne sont pas détectés.

Un spectre de masse sera obtenu en faisant varier U et V selon un balayage adéquat pour faire défiler les ions les uns après les autres dans le détecteur. Le mode balayage (*fullscan*) permet de détecter tous les ions produits dans la gamme de *m/z* de l'analyseur. Le quadripôle peut aussi fonctionner en mode SIM (*Single Ion Monitoring*), nommé également SIR (*Single Ion Recording*) qui a pour but de ne détecter que les rapports *m/z* sélectionnés, caractéristiques de la substance à analyser, ce qui assure une meilleure sensibilité.

b) Le triple quadripôle

Le triple quadripôle (TQ ou QqQ) permet de faire de la spectrométrie de masse en tandem ou MS/MS. Un triple quadripôle est présenté sur la figure I-20.

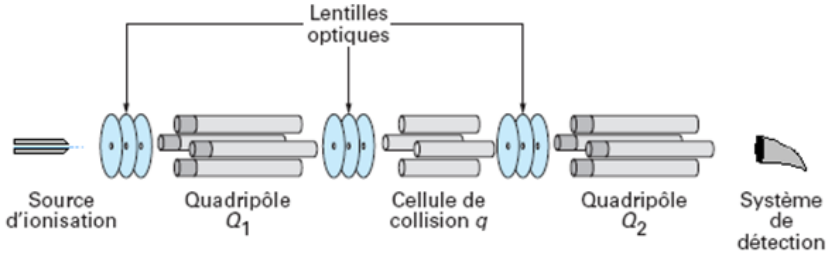


Figure I-20 : Représentation d'un triple quadripôle.

Il est formé de deux analyseurs (quadripôles) en série séparés par une cellule de collision dans laquelle un gaz de collision inerte (Argon) est introduit. Par excitation collisionnelle de ce gaz avec les ions, les ions sont dissociés. Ce phénomène est appelé CID (*Collision Induced Dissociation*). Classiquement, le premier quadripôle fonctionne comme un filtre et sélectionne un ion (*m/z*) d'intérêt appelé ion parent ou ion précurseur. Après dissociation par collision, les ions fils ou fragments sont analysés par balayage sur le second analyseur. Il existe aussi d'autres configurations permettant par exemple la recherche d'ions précurseurs à partir d'un ion fragment de *m/z* connu. Il est aussi possible de détecter des ions parents susceptibles de perdre (ou de gagner) par réaction dans la cellule de collision, un fragment neutre correspondant au décalage choisi. Enfin, le mode SRM (*Selected Reaction Monitoring*) permet de détecter un ion fragment provenant d'un ion précurseur donné. Ce dernier mode permet d'obtenir un gain en sensibilité en diminuant le bruit de fond et d'avoir un mode de détection très sélectif pour l'identification des protéines.

(iv) Piège à ions

Tout comme le filtre quadripolaire, le fonctionnement d'un piège à ions est également basé sur l'action d'un champ électrique radiofréquence. Un piège à ions couplé à une source électrospray a d'ailleurs été utilisé dans cette étude.

Le piège à ions est constituée de deux électrodes de forme hyperbolique, électrodes chapeaux, et d'une électrode annulaire soumises à différents potentiels en fonction de l'étape d'analyse, comme l'illustre la figure I-21.

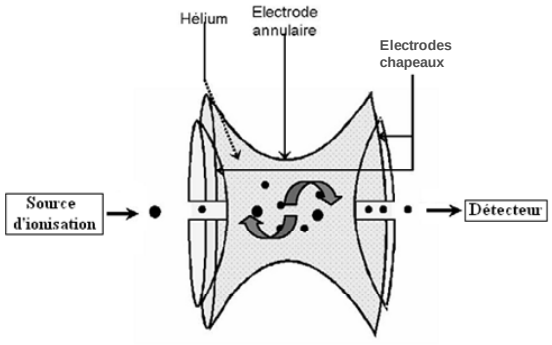


Figure I-21 : Schéma d'un piège à ions [64].

A la différence du quadripôle, les ions ne traversent pas le piège à ions mais restent confinés à l'intérieur de celui-ci. Les ions sont injectés et extraits du piège à ions par les orifices situés sur les électrodes chapeaux. Une radiofréquence fixe, appliquée à l'électrode annulaire génère un champ électrique quadripolaire permettant de piéger les ions et de les retenir dans le faible espace central. Lorsqu'une quantité trop importante d'ions est présente dans le piège, les répulsions coulombiennes entre les ions provoquent une dispersion qu'on appelle effet de charge. Pour éviter ce phénomène,

le nombre d'ions doit être contrôlé en ajustant le temps de remplissage du piège à ions. De plus, de l'hélium est introduit dans le piège et est maintenu à pression constante (environ 10^{-6} bar) pour stabiliser les ions et ainsi augmenter l'efficacité de piégeage (gaz tampon). Lors du piégeage, les ions décrivent une courbe de Lissajous en suivant une trajectoire correspondante au champ quadripolaire, due aux variations de polarité de l'électrode annulaire.

a) Analyse en mode MS

Après le piégeage des ions dans l'analyseur, l'éjection des ions se fait par balayage croissant de la radiofréquence appliquée sur l'électrode annulaire afin de déstabiliser leurs trajectoires en fonction de leur rapport *m/z* croissant. Une moitié des ions est alors éjectée vers l'électrode d'entrée pour être perdue, tandis que l'autre moitié atteint l'électrode de sortie et donc le détecteur. Cependant, cette technique d'éjection simple est limitée à des valeurs de *m/z* faibles, puisque l'amplitude de la tension alternative maximale applicable est limitée.

Pour obtenir une plus grande gamme de *m/z* éjectables, la méthode d'éjection la plus couramment utilisée est l'éjection résonante. Le principe est illustré sur la figure I-22.

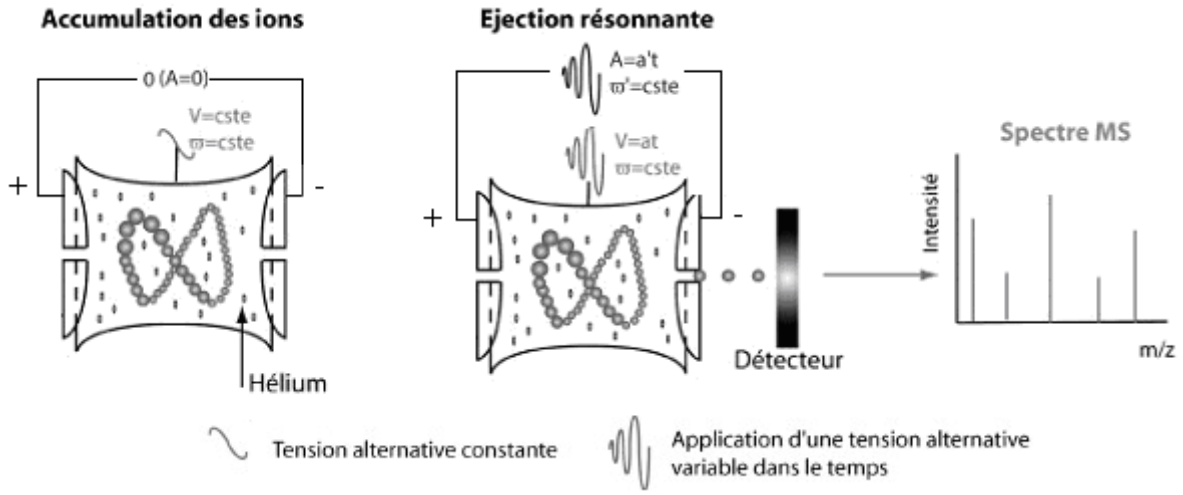


Figure I-22 : Schématisation d'une analyse MS simple dans le piège à ions constituée d'une étape d'accumulation des ions et d'une éjection résonante. Adapté de [70].

Elle est réalisée en appliquant une tension alternative supplémentaire sur les électrodes chapeaux. En effet, chaque rapport *m/z* possède une propre fréquence de mouvement fondamental. En appliquant sur les électrodes chapeaux un potentiel à une fréquence d'un ion particulier - sa fréquence de résonance - on augmente l'énergie cinétique de l'ion considéré, ainsi sa trajectoire est déstabilisée et il est éjecté. L'éjection successive des rapports *m/z* peut être obtenue en augmentant de manière progressive les tensions appliquées sur les électrodes chapeaux et sur l'électrode annulaire.

b) Analyse en mode MS/MS

L'analyse en mode MS/MS consiste tout d'abord, à piéger les ions dans le spectromètre de masse, comme en analyse MS. Ensuite, l'isolement de l'ion parent se fait en éliminant les ions de rapports *m/z* inférieurs au rapport *m/z* de l'ion précurseur par balayage croissant de l'amplitude de la tension alternative de l'électrode annulaire puis par éjection résonante de tous des ions de rapport *m/z* supérieurs au rapport *m/z* de l'ion précurseur. Par application d'une faible tension alternative sur les électrodes chapeaux à la fréquence de résonnance de l'ion précurseur, celui-ci accumule de l'énergie cinétique et se fragmente par collision avec les molécules de gaz tampon (hélium). Les ions fils générés n'ont pas la même fréquence de résonance que celle de l'ion parent. Ils n'entrent donc pas en résonance et sont immédiatement focalisés au centre du piège à ions. Les fragments sont ensuite éjectés et analysés comme décrit précédemment. Ce processus en deux étapes (isolement, excitation) est illustré sur la figure I-23.

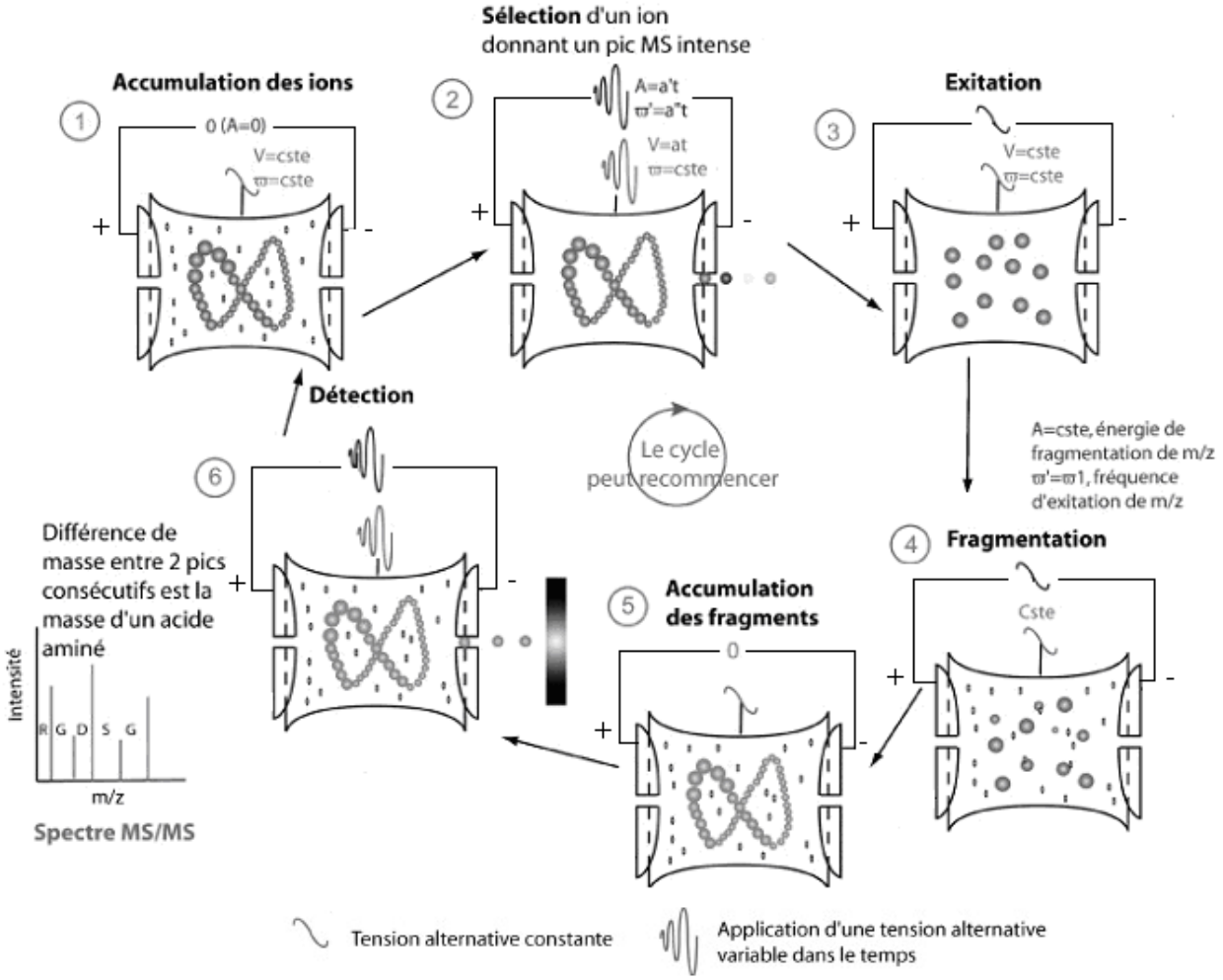


Figure I-23 : Schématisation d'une analyse MS^n dans un piège à ions. (1), (2) : accumulation et sélection des ions à fragmenter. (3), (4) : excitation et fragmentation des ions moléculaires. (5) et (6) : accumulation et éjection des fragments. Adapté de [70].

Il peut se répéter maintes fois (MS^2, MS^3..., MS^n) et s'avère utile lors de l'élucidation structurale de composés. Toutefois, le nombre n de cycles de fragmentation est limité par la quantité maximale d'ions qui peuvent être stockés dans le piège à ions avant la fragmentation. De ce fait, les analyses MS^n se font au détriment de la sensibilité.

1.2.4.4. Identification des protéines par spectrométrie de masse en tandem

La spectrométrie de masse en tandem (MS/MS) appliquée aux peptides peut permettre de déterminer la séquence en acides aminés et donc leur structure. Les ions parents sont sélectionnés ou isolés par l'analyseur puis fragmentés. Chaque fragment est ensuite analysé pour donner les spectres de collision de chaque ion parent. Lors des analyses MS/MS, les fragmentations peptidiques ont lieu principalement au niveau des fonctions amide du squelette peptidique mais aussi de part et d'autre de cette liaison au niveau de la chaîne latérale des acides aminées. Une première nomenclature des fragmentations peptidiques a été introduite en 1984 par Roepstorff et J. Fohlman [71] puis complétée et simplifiée par Biemann quelques années plus tard [72]. Elle est représentée sur la figure I-24.

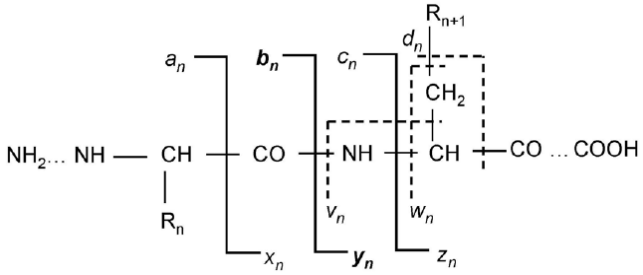


Figure I-24 : Nomenclature des fragmentations peptidiques.

La fragmentation à basse énergie de la liaison peptidique donne lieu à deux types d'ions : les ions a,b et c pour lesquels la charge positive est portée par l'extrémité N-terminale et les ions x, y et z pour lesquels la charge positive est portée par l'extrémité C-terminale. Les fragments d, w et z sont observés dans le cas des fragmentations à haute énergie. La majorité des fragments obtenus sont de type b et y.

L'interprétation de ces spectres est facilitée par des logiciels de bioinformatique associés à des banques de données. En effet, par comparaison des masses des ions fragments aux masses théoriques de fragmentation, le logiciel va identifier la ou les protéines présentes dans l'échantillon. Les banques de données protéiques telles que Swiss Prot deviennent de plus en plus importates. Les recherches de séquences dans ces banques de données se font par l'intermédiaire d'algorithmes commerciaux ou libres d'accès sur internet comme SEQUEST développé par thermo (*http://www.thermo.com*), Protein Prospector (*http://prospector.ucsf.edu*) ou MASCOT développé

par Matrix Science (*http://www.matrixscience.com*). Il en résulte un classement probabiliste des protéines candidates en fonction du nombre de peptides ou de fragments MS/MS qui sont attribués à la protéine et du nombre de protéines dans la banque de données. On obtient un score qui, dans le cas de MASCOT, prend en considération la probabilité que la séquence peptidique identifiée puisse être obtenue par hasard. On obtient aussi un recouvrement de séquence qui définit le pourcentage de couverture de la séquence complète de la protéine candidate par les peptides protéolytiques détectés.

Par ailleurs, il existe des logiciels accessibles par internet qui permettent de simuler la digestion enzymatique de toutes les protéines présentes dans les banques de données. Par exemple, sur le site internet *www.expasy.ch*, le logiciel *« PeptideCutter »* permet d'obtenir la liste des peptides susceptibles d'être obtenus après digestion enzymatique d'une protéine si celle-ci est présente dans les banques de données. Il suffit d'entrer la séquence correspondant à la protéine ou plus simplement son nom ou son code nomenclature et de choisir l'enzyme de digestion pour obtenir la liste des peptides possibles après digestion. Un autre site *http://prospector.ucsf.edu/* et son programme « MS-Digest » prend en compte les modifications des protéines et peptides. Ce sont ces listes théoriques qui sont ensuite comparées aux peptides obtenus expérimentalement après analyse par spectrométrie de masse. De plus, le logiciel de recherche par alignement de séquence BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*) recherche les régions similaires entre deux ou plusieurs séquences d'acides aminés (*http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi*). Le BLAST est un algorithme qui permet de trouver la similarité entre une séquence donnée (entrée par l'utilisateur) et des séquences répertoriées dans une base de données. Lorsqu'une séquence est entrée (la séquence d'un de nos peptides par exemple), ce programme présente toutes les protéines dont une région de la chaîne d'acides aminés présente une similarité significative avec la séquence entrée. Le degré de similitude est indiqué par un score.

1.2.4.5. Quantification des protéines

La quantification est un point majeur de l'analyse protéomique clinique mais encore un point critique qui a conduit au développement de nombreuses approches différentes que l'on peut classer en deux grandes catégories : les méthodes utilisant un marquage des protéines ou des peptides d'intérêt avant l'analyse par MS et celles sans marquage.

Les techniques de quantification par marquage sont utilisées pour la quantification relative, c'est-à-dire la comparaison des niveaux d'expression de peptides ou de protéines dans des conditions différentes. Elles consistent à dériver un échantillon de peptides ou de protéines par des

isotopes stables. Les échantillons marqués et non marqués sont alors mélangés et analysés par LC-MS. Ainsi, les composés marqués ont la même composition atomique que les composés non marqués et ont les mêmes caractéristiques en termes de temps de rétention chromatographique et efficacité d'ionisation en spectrométrie de masse. Il existe plusieurs stratégies de marquage d'acides aminés qui ciblent spécifiquement différents groupements des peptides en fonction de la technique utilisée. La technique la plus couramment utilisée est le marquage ICAT (« *Isotope Coded Affinity Tag* »). Son principe est illustré en figure I-25.

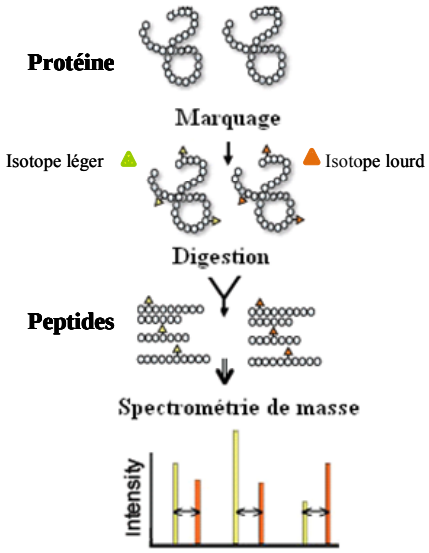


Figure I-25 : Représentation schématique de la quantification par spectrométrie de masse avec la technique ICAT. Adapté de [73].

La technique ICAT consiste à utiliser des isotopes lourds et légers fixés aux cystéines des protéines à étudier [74]. Le mélange des deux échantillons dérivés est ensuite digéré. Le marqueur contient aussi une biotine grâce à laquelle les peptides marqués pourront être enrichis sur une colonne d'affinité avidine. Les peptides sont séparés et analysés par LC-MS/MS. La quantification de ces peptides se fait par comparaison de l'intensité relative des pics de paires de peptides qui ont la même séquence mais marqués par des isotopes différents, ce qui entraîne une variation de leur masse de 8 Da. Avec cette technique, seuls les peptides qui contiennent un résidu cystéine sont isolés, ce qui rend les échantillons moins complexes, et la quantification plus accessible. Cependant, en chromatographie d'affinité, les temps de rétention des peptides varient en fonction de leur taille, cela induit des ionisations différentes causées par la variation du bruit de fond. De plus, la rareté du résidu cystéine rend impossible la détection et la quantification de nombreux peptides par cette méthode.

Une autre méthode de quantification par marquage est la technologie iTRAQ (« *isobaric tagging for relative and absolute protein quantification* »). Il s'agit d'une méthode de quantification par MS/MS [75]. Le principe repose sur le marquage des peptides d'intérêt par des marqueurs composés d'un groupement rapporteur et d'un groupement balance. Les marqueurs sont constitués d'une partie qui va se lier de façon covalente aux peptides, d'un groupe rapporteur de masse 114, 115, 116, ou 117 et d'un groupe balance qui va équilibrer la masse de tous les marqueurs. Ainsi, tous les peptides marqués avec ces différents isotopes sont isobariques et non différentiables par chromatographie. Lors de la fragmentation MS/MS, les groupements rapporteurs sont libérés et leur abondance relative est directement proportionnelle à celle des peptides marqués. Cette technique permet de travailler simultanément avec quatre échantillons différents en une seule expérience. De plus, les peptides marqués sont isobariques si bien qu'ils induisent une seule espèce d'ion en MS qui sera utilisée en MS/MS. Ceci augmente l'intensité du signal et donc la probabilité d'une identification correcte des peptides minoritaires. Finalement, en marquant un peptide de quantité connue, on peut établir une quantification absolue des autres peptides.

La stratégie AQUA (« *Absolute QUAntification* ») est une technique de quantification absolue des protéines [76]. Elle est basée sur l'utilisation d'une molécule marquée comme étalon interne. Une quantité connue d'un peptide marqué de même séquence qu'un peptide spécifique de la protéine à doser est ajoutée à l'échantillon. L'ensemble est digéré et analysé par LC-MS/MS. Le peptide marqué et le peptide natif ont les mêmes caractéristiques en termes de taille, charge, hydrophobie et ionisation mais présentent une différence de masse détectable en MS. La quantification du peptide natif s'effectue alors avec les ratios des pics observés. De cette façon, une quantification absolue et précise peut être obtenue. Cette technologie nécessite cependant la synthèse du peptide marqué spécifique de la protéine avec un acide aminé portant un isotope, elle requiert donc l'identité précise de l'espèce étudiée. De plus, l'étalon marqué dopé peut donner en masse un rapport *m/z* identique à d'autres composés présents dans l'échantillon et conduire alors à une quantification imprécise. Pour cela, des études combinent la quantification absolue par un standard interne avec une analyse MRM (« *Multipe Reaction Monitoring* ») par un triple quadripôle [77,78].

Ces techniques de marquage permettent une quantification fiable mais pour la plupart il ne s'agit que d'une quantification relative. D'autre part, les techniques de marquage isotopique sont coûteuses et exigeantes en main-d'œuvre. Finalement, peu d'étalons de peptides sont actuellement disponibles.

Pour ces raisons, des méthodes sans marquage se sont développées. Il existe actuellement deux stratégies principales. La première consiste à mesurer et à comparer les intensités des ions

peptidiques appartenant à une protéine d'intérêt. Les intensités des peptides obtenus après une expérience peuvent ainsi être comparées à celles obtenues après une ou plusieurs autres expériences, menant à une quantification relative. Après une analyse en LC-MS/MS d'un digestat, les rapports *m/z* correspondant aux peptides spécifiques de la protéine d'intérêt sont extraits du courant ionique total et les aires des pics du chromatogramme reconstitué sont intégrées [79-81]. La deuxième approche consiste à utiliser les données MS/MS et à compter le nombre de spectres des fragments peptidiques identifiés comme appartenant à une protéine d'intérêt [80,82,83]. Cette technique nécessite l'acquisition d'un grand nombre de spectres pour obtenir une quantification précise. Bien que très attrayante, cette technique est très controversée puisqu'elle ne permet pas de quantifier les protéines très minoritaires qui sont ne sont détectées que par 1 ou 2 peptides.

D'une façon générale, les techniques avec marquage sont bien plus précises que les techniques sans marquage, mais ces dernières se sont continuellement développées en raison de leur simplicité et du coût élevé des techniques de marquage.

I.2.5. Conclusion

Les outils utilisés pour l'analyse des protéines sont extrêmement résolutifs en ce qui concerne l'électrophorèse en gel bidimensionnel et la chromatographie liquide bidimensionnelle et très spécifiques grâce à l'apport de la spectrométrie de masse. Cependant ces techniques sont difficiles à mettre en œuvre et parfois insuffisamment performantes compte tenu de la complexité des échantillons biologiques, et en particulier de l'abondance des protéines majoritaires. De nombreux constituants des échantillons peuvent mener à des phénomènes de suppression d'ions lors de l'analyse par spectrométrie de masse. Il peut être suffisant d'ajouter des étalons internes adaptés tels que des molécules marquées par des isotopes stables afin de compenser cet effet. Mais dans la plupart des cas, l'analyse de protéines dans des matrices complexes nécessite l'introduction d'une étape de traitement d'échantillon avant l'analyse par spectrométrie de masse. Cette étape permet d'éliminer les composés interférents ou d'extraire les composés recherchés dans une matrice et de les re-concentrer afin de pouvoir détecter de très faibles quantités.

I.3. Traitement de l'échantillon

Le traitement de l'échantillon est l'étape la plus longue de l'analyse et celle qui induit le plus grand risque d'erreur. Aussi, il est important de développer des méthodes rapides et fiables pouvant facilement être automatisées afin de limiter les pertes d'analytes et la contamination de l'échantillon. Aujourd'hui, l'extraction sur phase solide ou SPE (*Solid phase extraction*) constitue un outil puissant pour le développement de méthodes d'analyse de composés à très faible concentration notamment en raison de la diversité des supports actuellement disponibles.

I.3.1 Principe de l'extraction sur phase solide

L'extraction sur phase solide (SPE) est fondée sur la distribution des composés entre une phase liquide (l'échantillon) et une phase solide (l'adsorbant) [84]. En première approximation, cette technique d'extraction repose sur un simple principe chromatographique où l'adsorbant joue le rôle de phase stationnaire et l'échantillon percolé constitue la phase mobile. Si les analytes d'intérêt présentent une forte affinité vis-à-vis de l'adsorbant, ils y sont retenus au cours de l'étape de percolation alors que le solvant constituant l'échantillon est éliminé. Les analytes sont ensuite élués avec un faible volume de solvant éluant. La SPE permet donc d'extraire les composés en éliminant les interférents présents dans les échantillons complexes. Le principe général de l'extraction sur phase solide comporte quatre étapes et est illustré sur la figure I-26.

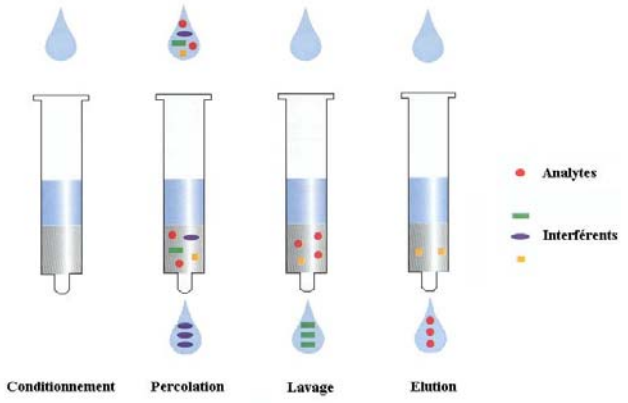


Figure I-26 : principe de l'extraction sur phase solide. D'après [85].

La première étape est le conditionnement de l'adsorbant qui consiste à percoler un solvant à travers le support afin de le mouiller en solvatant les groupements fonctionnels présents à sa surface. Cette étape peut mettre en œuvre une succession de solvants (typiquement des solvants organiques sur un support hydrophobe), toutefois, le dernier solvant percolé doit avoir une polarité

similaire à celle de l'échantillon. Lors de la deuxième étape, l'échantillon est percolé sur le support et les composés cibles qui ont une forte affinité pour le support solide y sont retenus tandis que les interférents n'ayant aucune affinité pour le support sont éliminés avec le reste de la matrice. Concernant les fluides biologiques, comme le plasma ou le sérum, quelques centaines de microlitres sont percolés compte-tenu des faibles volumes disponibles. A la différence des matrices environnementales, le but de la SPE pour les matrices biologiques n'est pas l'obtention d'un facteur d'enrichissement élevé, mais un fort degré de purification de l'échantillon. Si des interférents ont été faiblement retenus sur le support, il est possible de les éliminer en procédant à une troisième étape, le lavage. Un solvant de faible force éluante est généralement choisi de façon à éluer les interférents, tout en gardant fixés les composés d'intérêt. Les solutés d'intérêt sont ensuite élués par percolation d'un solvant spécifiquement choisi pour rompre les interactions mises en jeu entre l'analyte et l'adsorbant, tout en évitant d'entraîner d'autres interférents fortement retenus sur le support. L'évaluation de la procédure d'extraction s'effectue par la mesure du rendement d'extraction. Ce rendement est défini par le rapport entre la quantité de soluté présente dans l'extrait final et la quantité de soluté présente dans l'échantillon percolé. Les mécanismes de rétention classiquement mis en jeu peuvent être le partage, l'échange d'ions ou l'exclusion stérique selon la chimie de l'adsorbant, les solvants utilisés et les propriétés de l'analyte. Depuis une trentaine d'années, cette technique connaît un véritable essor et une grande variété d'adsorbants sont actuellement disponibles sous divers formats (cartouches, disques, plaque 96-puits, précolonne) [86].

I.3.2. Analogie avec la chromatographie liquide

L'extraction sur phase solide s'apparente fortement à un processus chromatographique, le support solide jouant le rôle de phase stationnaire et le solvant de l'échantillon puis le solvant éluant jouant successivement le rôle de phase mobile. Aussi, la connaissance des mécanismes de rétention en chromatographie facilite la mise au point de la méthode d'extraction.

Pour aboutir à un facteur d'enrichissement maximal, il est nécessaire d'obtenir des rendements d'extraction proche de 100 %. Or, la perte des composés à extraire lors de l'étape de préconcentration peut être observée si la capacité de rétention du support est dépassée ou si la rétention du composé cible est telle qu'il sera élué par le solvant qui constitue l'échantillon, comme l'eau pour les échantillons aqueux. Le volume percolé à partir duquel les solutés cibles sont élués par le solvant de l'échantillon est appelé volume de fin de fixation (Vf) et il est lié à l'affinité du soluté pour l'adsorbant. Il est donc indispensable de déterminer Vf avant de mettre au point le

protocole d'extraction. La méthode consisterait en une analyse frontale, c'est-à-dire la percolation en continu d'un échantillon dopé par un soluté S sur un adsorbant en sortie duquel un dispositif de détection d'absorption UV est installé. La figure I-27 a) présente front d'élution ainsi obtenu.

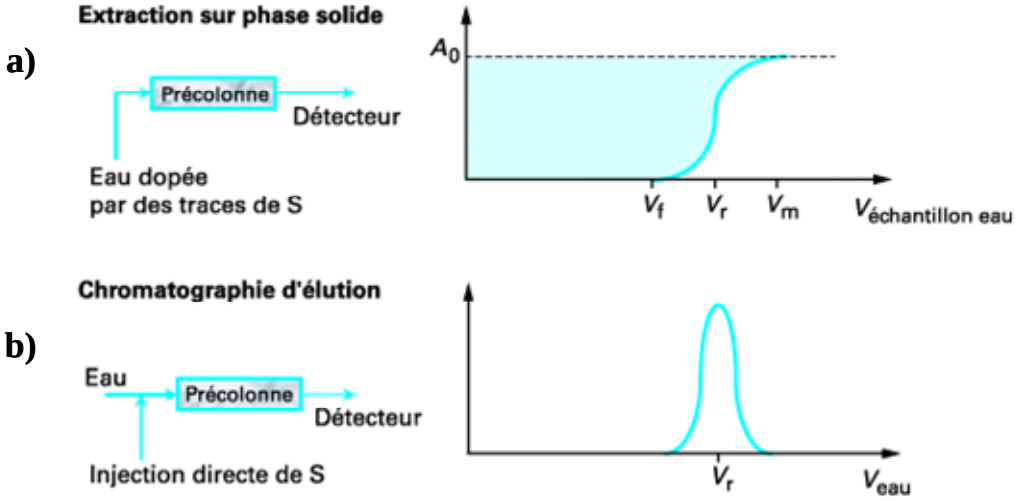


Figure I-27 : Détermination expérimentale du volume de rétention par chromatographie frontale (a) ou par chromatographie d'élution (b) [84].

Tant que le signal du détecteur est nul, le composé est retenu sur le support. En revanche, lorsque le composé commence à être élué sous l'effet du solvant de l'échantillon, c'est-à-dire lorsque le Vf est atteint, le signal augmente et atteint une valeur constante correspondant à la concentration de l'échantillon percolé. Le front d'élution a une allure de courbe bi-logarithmique dont le point d'inflexion correspond au volume de rétention obtenu si le soluté était injecté sur le même support en chromatographie d'élution (figure I-27 b). Le volume de fin de fixation est défini pour un volume correspondant à 1 % de A_0, ou A_0 est l'absorbance initiale de l'échantillon. La détermination par analyse frontale est en fait peu utilisée puisqu'elle est longue et difficile à mettre en œuvre. En revanche, l'analogie de la SPE avec la chromatographie en phase liquide va permettre une estimation rapide de ce Vf. En effet, en première approximation, Vf peut être assimilé au volume de rétention, $Vr = V_0(1+k)$. La détermination du volume de rétention Vr en chromatographie d'élution incluant une colonne remplie par le même adsorbant et une phase mobile identique à celle utilisée en extraction permet d'obtenir une estimation du volume de fin de fixation.

I.3.3. Modes de couplage

L'étape d'extraction peut être dissociée de l'analyse chromatographique (extraction dite « en différé ») ou être intégrée au système chromatographique (extraction dite « en ligne »).

I.3.3.1. Extraction en différé

Dans la méthode en différé, l'adsorbant est le plus souvent contenu entre deux frittés dans une cartouche en polypropylène et dans le cas des échantillons biologiques, la quantité de phase utilisée est de l'ordre de 10 à 50 mg. La méthode en différé consiste à appliquer le protocole d'extraction sur l'adsorbant. Le volume nécessaire à l'élution dépend de l'affinité des composés pour le support et de la force éluante du solvant. L'automatisation de toute la procédure de préconcentration sur cartouches est désormais possible grâce à des robots qui permettent de réaliser chaque étape en séquentiel. Elle favorise donc la réduction des risques de contamination et d'augmenter le nombre d'échantillons traités. Une étape d'évaporation est nécessaire afin de réduire le volume de l'extrait et de changer le solvant après élution. Cependant, au cours de cette étape, les risques de pertes demeurent. L'adsorbant peut aussi être conditionné dans les puits des plaques 96-puits très utilisés pour l'analyse du plasma. En effet, ce format est constitué de 96 réservoirs contenant l'adsorbant permettant de traiter un grand nombre d'échantillons de faible volume en un minimum de temps. L'extraction en plaque 96-puits peut d'ailleurs être totalement automatisée par un robot assurant toute l'étape d'extraction et le transfert des extraits dans le système chromatographique.

L'inconvénient principal de la méthode en différé réside dans le fait qu'en format conventionnel, une fraction seulement de l'éluat est injectée dans le système chromatographique, il en résulte donc une perte en facteur d'enrichissement. L'utilisation de méthodes d'extraction en ligne permet d'éviter ces inconvénients.

I.3.3.2. Couplage en ligne de l'extraction avec l'analyse

Le couplage en ligne de l'étape d'extraction à l'analyse par chromatographie en phase liquide s'est considérablement développé ces dernières années avec la commercialisation de systèmes automatisés. Le principe est illustré sur la figure I-28. Le support d'extraction est contenu dans une précolonne installée sur une vanne de commutation à 6 voies et à deux positions (chargement et élution) sur laquelle sont également connectées une pompe de préconcentration, une pompe analytique et la colonne analytique.

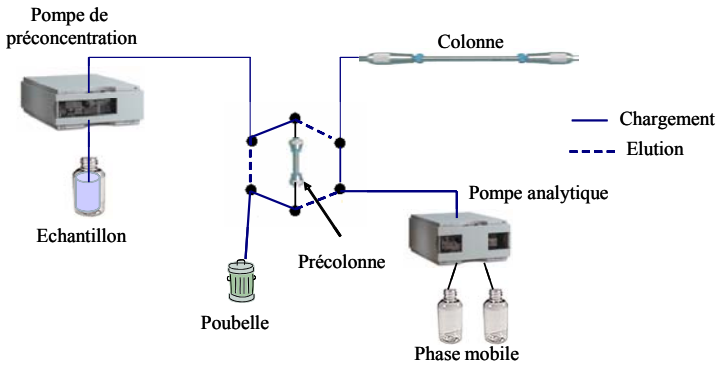


Figure I-28 : Couplage en ligne de l'extraction sur phase solide avec la chromatographie en phase liquide [84] .

Lorsque la vanne est en position « chargement », l'adsorbant est conditionné puis l'échantillon est percolé grâce à la pompe de préconcentration. Les analytes sont alors retenus et piégés sur l'adsorbant. Une étape de lavage peut être alors effectuée si nécessaire. L'élution des composés est réalisée par la phase mobile de la pompe analytique en basculant la vanne en position « élution ». Ainsi, les composés sont transférés en tête de colonne analytique où ils seront séparés. Le plus souvent, l'élution a lieu dans le sens inverse de la percolation, on parle d'élution en mode rétro-balayage (back-flush). Ce mode permet de focaliser la bande de solutés avant leur transfert sur la colonne analytique. Le couplage en ligne permet de réduire les risques de perte et de contamination. De plus, il présente un grand intérêt en termes de facteurs d'enrichissement. En effet, la totalité des composés extraits sur le support peut être analysée. Le gain en sensibilité induit ainsi la possibilité de réduire le volume percolé. Enfin, comme tout système automatisé, le temps d'analyse global s'en trouve fortement réduit.

Dans un montage en ligne, il est important de veiller à la compatibilité de solvants entre l'étape d'extraction et l'étape de séparation chromatographique. En effet, la phase mobile doit pouvoir désorber les analytes de la précolonne tout en assurant leur rétention sur la colonne analytique. De plus, elle doit permettre un transfert rapide des solutés du support d'extraction vers la colonne analytique afin d'éviter une perte d'efficacité lors de la séparation. A cet effet, il est recommandé d'utiliser des précolonnes de plus petits diamètres ou de diamètres équivalents au diamètre de la colonne analytique de façon à re-concentrer les analytes en tête de colonne au moment de l'élution. Il existe actuellement de nombreux robots qui assurent l'automatisation totale de l'analyse, de l'étape d'extraction à celle de la séparation.

I.3.4. Diversité des supports

Une très grande variété de phases est disponible ; elles sont généralement classées en fonction de la nature des interactions qu'elles développent avec l'analyte (polaires, hydrophobes, ioniques). Les supports les plus utilisés pour l'extraction de protéines sont décrits ci-après.

I.3.4.1. Les supports hydrophobes

Les supports à polarité de phase inversée génèrent des interactions hydrophobes avec l'analyte. En effet, le support utilisé est le plus souvent une silice greffée par des longues chaînes carbonées (C_{18}) ou un polymère organique hydrophobe. Ces phases sont particulièrement adaptées pour les échantillons aqueux, car l'eau présente une très faible force éluante sur ce type de support. La SPE de partage inverse a montré des résultats prometteurs pour l'analyse de protéines dans des échantillons biologiques par spectrométrie de masse car le protocole s'est révélé simple, robuste et reproductible. Ainsi, des profils des petites protéines après ultrafiltrations (30 kDa) de sérums de patients atteints de cancer du sein ont pu être établis [87]. L'analyse de petites protéines ciblées dans du plasma a également été réalisée après extraction sur des supports C_{18} en plaque 96 puits [88,89] ou des précolonnes C_{18} couplées en ligne à l'analyse par LC-MS [90,91].

Comme précédemment mentionné, ces supports sont aussi utilisés afin de dessaler les échantillons peptidiques obtenus après digestion à la trypsine en vue d'une analyse par spectrométrie de masse. Pour cela, les peptides sont percolés sur ce type de support où ils sont retenus et les sels du tampon de digestion sont alors éliminés par simple percolation d'eau. Nous verrons de nombreux exemples dans le deuxième chapitre de ce manuscrit.

I.3.4.2. Les supports échangeurs d'ions

En fonction des acides aminés présents dans la protéine et le pH du milieu, la charge globale de la protéine peut être nulle (au point isoélectrique de la protéine), positive ou négative. Si les protéines sont ionisées, le mécanisme de rétention sur un support solide peut être basé sur un mécanisme d'échange d'ions. Les supports d'extraction, comme les phases stationnaires utilisées en chromatographie d'échange d'ions, sont des silices ou des résines polymériques greffées par des groupements acides (acides carboxylique ou sulfonique) ou basiques (amine) qui jouent respectivement le rôle d'échangeur de cations (SCX, « *cation exchange sorbent* ») et d'anions

(SAX, « *anion exchange sorbent* »). En adaptant le pH de la solution, les composés ionisés sont retenus sur le support activé par des groupements de charge opposée. L'interaction est de type électrostatique et l'élution est réalisée en se plaçant à un pH pour lequel les analytes sont sous forme moléculaire. Pour des solutés ionisés quel que soit le pH, l'élution peut être réalisée par une solution de grande force ionique. L'échange d'ions a par exemple été utilisé comme méthode complémentaire à d'autres technique de traitement d'échantillon pour l'extraction de protéines et l'établissement de profils protéiques du sérum humain [92] ou pour l'extraction de peptides issus de la digestion trypsique de la β-caséine [93].

Un autre type de support a récemment été exploité pour l'analyse de protéines basiques dans des échantillons biologiques : les nanotubes de carbones multi-parois [94]. Après oxydation par de l'acide nitrique, ces nanotubes présentent des charges négatives. Ce support, une fois conditionné en micro-colonne, a servi de support d'extraction en ligne de protéines basiques comme le cytochrome *c* (pI = 10) et l'hémoglobine (pI = 7) qui présentent des charges positives au pH de travail, c'est-à-dire 5-6. L'élution séquentielle de ces deux protéines a été effectuée en variant la solution éluante. De plus, l'application de ces supports pour l'extraction de protéines dans des milieux biologiques a été montrée sur l'hémoglobine dans le sang humain. En particulier, l'albumine est négativement chargée à pH 6 et n'est donc pas retenue sur ce support d'extraction.

I.3.4.3. Les supports polaires

Les phases polaires (silice vierge ou greffée par des groupements polaires) sont donc généralement dédiées à l'extraction de molécules présentes dans des milieux peu polaires et l'élution est effectuée en augmentant la polarité de la phase mobile. Ces phases sont donc peu utilisées pour l'analyse de fluides biologiques. Une alternative à l'extraction de composés polaires est la chromatographie d'interactions hydrophiles (HILIC, « Hydrophilic Interaction Chromatography »). Il s'agit d'une technique de séparation où la phase stationnaire est hydrophile et la phase mobile est hydro-organique, c'est-à-dire constituée en majorité d'un solvant peu polaire comme l'acétonitrile et d'un faible pourcentage d'eau qui constitue alors le solvant de forte force éluante. Les composés à analyser se partagent entre la phase mobile et une fine couche enrichie en eau qui est partiellement immobilisée à la surface de la phase stationnaire. Cette technique a été utilisée en protéomique clinique pour l'extraction de protéines glycosylées [95] et de peptides glycosylées [95,96] dans le plasma. En effet, le glycoprotéome est largement étudié en protéomique clinique puisque des glycosylations anormales de protéines semblent être associées à des maladies

comme le cancer. Toutefois, cette approche se limite à des composés supportant de fortes teneurs en solvant.

I.3.4.4. Les phases à accès restreint

Les phases à accès restreint ou RAM (*Restricted Access Materials*) permettent d'éliminer les protéines de haute masse moléculaire pour l'analyse de peptides. En effet, de nos jours, un grand intérêt est porté à l'analyse du peptidome dans les fluides biologiques en raison de son grand potentiel pour le diagnostique clinique [97]. Les RAM combinent un mécanisme d'exclusion stérique permettant d'éliminer des protéines de masses moléculaires élevées et un mécanisme de partage permettant la rétention des petites molécules. Des RAM fonctionnalisées à la surface interne des pores avec des groupements échangeurs de cations ont été appliqués pour l'extraction de peptides ou de petites protéines [98-101] mais peu d'études portent sur ces supports pour ce domaine d'application.

I.3.4.5. Les supports d'affinité

D'une façon générale, les supports cités ci-dessus constituent un gain en sélectivité. Toutefois, la co-extraction de composés interférents de nature proche des analytes d'intérêt peut atténuer voire masquer le signal du soluté recherché à l'état de trace. C'est pourquoi des procédures d'extraction beaucoup plus spécifique sont nécessaires pour l'analyse de protéines ciblées. Ces techniques mettent en jeu des supports d'affinité utilisant des molécules biologiques.

La chromatographie d'affinité est une technique qui sépare les molécules sur la base de leur fonction biologique ou de leur structure chimique. Les ligands immobilisés sur les supports d'affinité ont une affinité spécifique pour la biomolécule d'intérêt [102]. Il existe plusieurs types de ligands disponibles : synthétiques (analogues de l'acide boronique), biologiques (fragments d'ADN), des nucléotides (ATP, GTP), des coenzymes, des vitamines, des lectines, des anticorps...

Citons en particulier les supports d'affinité sur métal chélaté (IMAC) où un atome métallique est immobilisé sur un support solide. L'adsorption des protéines est basée sur la coordination entre ce métal et un groupement à la surface de la protéine. Les IMAC sont beaucoup utilisés pour l'adsorption des protéines et des peptides phosphorylées par une interaction entre les groupements phosphates chargés négativement et l'ion chélaté immobilisé sur le support. Le support est constitué d'un complexe entre un ligand (acide nitrilotriacétique ou acide iminodiacétique) et un cation ou atome métallique comme les ions ferriques (Fe^{3+}) ou gallium

(Ga^{3+}) [103,104]. Des ions zirconium peuvent aussi être utilisés et permettent d'obtenir des phases plus sélectives pour les phosphopeptides [105]. Par ailleurs, les glycoprotéines sont bien retenues par affinité sur des supports de lectines immobilisées [95].

Des supports d'affinité à base d'anticorps sont aussi fréquemment utilisés pour l'analyse de protéines. Le mécanisme de rétention repose sur la reconnaissance moléculaire provenant de la complémentarité spatiale et fonctionnelle du site de reconnaissance de l'anticorps vis-à-vis de l'antigène. La forte interaction antigène-anticorps a souvent été appliquée pour l'enrichissement de protéines spécifiques ou pour la déplétion de protéines interférentes dans les échantillons biologiques complexes.

En effet, l'analyse de protéines faiblement abondantes dans un milieu tel que le plasma est gênée par l'abondance des protéines majoritaires. Afin de simplifier la complexité de l'échantillon plasmatique ou sérique, il est donc possible d'éliminer ces protéines majoritaires. Pour cela, il existe des colonnes commerciales remplies de phase stationnaire sur laquelle sont greffés des anticorps spécifiques des protéines majoritaires du plasma. Cette technique est appelée immunodéplétion [106]. Bio-Rad commercialise une colonne (Bio-Rad Aurum Serum Protein) éliminant l'albumine et les IgG qui sont les deux classes de protéines les plus abondantes du plasma et représentées respectivement à 45 $mg.mL^{-1}$ et 10 $mg.mL^{-1}$ de plasma. La colonne MARS *(« Multiple Affinity Removal System »)* commercialisée par Agilent Technologies, permet la déplétion des 6 protéines les plus abondantes du plasma : l'albumine, la transferrine, les IgG, les IgA, l'antitrypsine et les haptoglobulines ou celle de 14 protéines majoritaires (colonne MARS Human 14, Agilent). Sigma-Aldrich commercialise une colonne (ProteoPrep® 20 Plasma Immunodepletion) éliminant les vingt protéines les plus abondantes du plasma, ce qui correspond à 97 % de la totalité des protéines plasmatiques. Bien que cette stratégie soit efficace, ces colonnes sont extrêmement coûteuses, de l'ordre de 3 500 euros pour les colonnes MARS Human 14. De plus, des protéines minoritaires peuvent être retenues sur le support par des interactions non spécifiques [107]. Elles peuvent aussi être liées à des protéines abondantes du plasma comme l'albumine et sont alors éliminées lors de la déplétion [108,109]. Aucune étude n'a montré de façon quantitative la proportion de protéines non spécifiquement liées sur les protéines majoritaires ou sur le support des colonnes de déplétion.

Une autre technique appelée Equalizer™ [110,111] va permettre de réduire les différences d'abondance entre les protéines. Cette technique comprend des billes poreuses immobilisées par une vaste librairie de ligands différents. Ainsi, dans un mélange complexe, les protéines complémentaires de ces ligands vont se combiner à ces derniers. Si la diversité de la librairie est assez grande, il est théoriquement possible d'avoir un ligand pour chaque protéine d'un mélange complexe, ce qui permet que chaque protéine soit adsorbée. Quand un échantillon comme du sérum

est exposé à de tels ligands, les protéines abondantes saturent rapidement leurs ligands complémentaires et la majorité de ces protéines n'est pas retenue. Par contre, une protéine peu abondante ne saturera pas ses ligands et la majorité de cette protéine sera liée aux billes. Après lavage des protéines non retenues ou très faiblement retenues, les protéines retenues sur les billes sont éluées. Il en résulte un échantillon possédant toutes les protéines qui étaient présentes dans l'échantillon initial avec une gamme dynamique beaucoup plus restreinte.

L'inconvénient majeur de cette technologie est qu'après avoir « équalizé » les concentrations protéiques, il n'est plus possible de faire des comparaisons quantitatives de niveau d'expression des protéines entre deux états comme par exemple ceux d'un patient selon qu'il soit malade ou sain.

I.4. Conclusion

L'analyse d'une protéine ciblée fait appel aux techniques analytiques issues de la protéomique. En effet, que l'objectif soit une analyse quasi exhaustive des protéines d'un échantillon (analyse protéomique) ou l'analyse d'une seule protéine, la résolution apportée par les méthodes séparatives telles que la chromatographie en phase liquide et la spécificité apportée par la spectrométrie de masse permettent l'identification de la protéine. L'usage de la chromatographie en phase liquide pour l'analyse des protéines a considérablement évolué ces dernières années grâce aux sources d'ionisation à pression atmosphérique. De plus, la miniaturisation de la LC qui est actuellement en plein essor, permet un gain en sensibilité considérable. Ces techniques font aussi appel à une étape de digestion enzymatique afin de fragmenter la protéine d'intérêt en peptides qui seront séparés et analysés par spectrométrie de masse. L'intérêt de l'immobilisation des enzymes pour la mise au point d'une analyse automatisable a été abordé et fera l'objet du chapitre II.

Par ailleurs, on a vu que l'analyse de protéines dans des échantillons réels était un véritable challenge. En effet, les échantillons biologiques sont très complexes et les interférents peuvent gêner voire masquer la détection du composé cible. Des techniques de traitement d'échantillon en SPE ont été décrites, mais l'analyse d'une protéine ciblée nécessite des approches beaucoup ciblées d'extraction de protéines afin d'éliminer la plupart des composés interférents gênant l'identification du composé d'intérêt. Le développement de supports sélectifs pour l'analyse de protéines ciblées fera aussi l'objet du chapitre suivant.

I.5. Références

[1] C. Branden, J. Tooze, Introduction to protein structure, second edition, Garland Publishing, New-York, 1999.
[2] C. Yu, M. Xu, F. Svec, J.M.J. Fréchet, *J. Polym. Sci., Part A: Polym. Chem.* 40 (2002) 755.
[3] N.L. Anderson, N.G. Anderson, *Mol Cell Proteomics* 1 (2002) 845.
[4] *http://www4.od.nih.gov/biomarkers/*,
[5] H.J. Issaq, Z. Xiao, T.D. Veenstra, *Chem. Rev.* 107 (2007) 3601.
[6] T.D. Veenstra, T.P. Conrads, B.L. Hood, A.M. Avellino, R.G. Ellenbogen, R.S. Morrison, *Mol Cell Proteomics* 4 (2005) 409.
[7] E.F. Petricoin, C.P. Paweletz, L.A. Liotta, *J. Mammary Gland Biol. Neoplasia* 7 (2002) 433.
[8] N.L. Kelleher, H.Y. Lin, G.A. Valaskovic, D.J. Aaserud, E.K. Fridriksson, F.W. McLafferty, *J. Am. Chem. Soc.* 121 (1999) 806.
[9] P.H. O'Farrell, *J. Biol. Chem.* 250 (1975) 4007.
[10] S.P.G. Junmin Peng, *J. Mass Spectrom.* 36 (2001) 1083.
[11] B. Bjellqvist, K. Ek, P. Giorgio Righetti, E. Gianazza, A. Görg, R. Westermeier, W. Postel, *J. Biochem. Biophys. Methods* 6 (1982) 317.
[12] K.G. Kenrick, J. Margolis, *Anal. Biochem.* 33 (1970) 204.
[13] J. Peng, S.P. Gygi, *J. Mass Spectrom.* 36 (2001) 1083.
[14] H.A. Harper, R.K. Murray, Granner, Mayes, Rodwell, Biochimie de Harper, De Boeck Université, 2002.
[15] J. Garin, M. Ferro, N. Rolland, J. Joyard, Ecole thématique Biologie Végétale, Acte de congrès.
[16] B. Keil, *Springer-Verlag, Berlin/Heidelberg/NewYork* (1992) pp. 335.
[17] U.T. Rüegg, J. Rudinger, C.H.W.H.a.S.N. Timasheff, in Methods Enzymol., Academic Press, 1977, p. 111.
[18] W.W. Cleland, *Biochemistry* 3 (1964) 480.
[19] J. Rosenfeld, J. Capdevielle, J.C. Guillemot, P. Ferrara, *Anal. Biochem.* 203 (1992) 173.
[20] J.M. Walker, The Protein Protocols Handbook, 2nd ed., University of Hertfordshire, Hatfield, UK (Ed.).
[21] T. Sipos, J.R. Merkel, *Biochemistry* 9 (1970) 2766.
[22] N. Lundell, T. Schreitmuller, *Anal. Biochem.* 266 (1999) 31.
[23] P. Matsudaira, *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 26 (1994) 602.
[24] B.N. Pramanik, U.A. Mirza, Y.H. Ing, Y.-H. Liu, P.L. Bartner, P.C. Weber, A.K. Bose, *Protein Sci.* 11 (2002) 2676.
[25] D. Lopez-Ferrer, J.L. Capelo, J. Vazquez, *J. Proteome Res.* 4 (2005) 1569.
[26] B. Bruyneel, J.S. Hoos, M.T. Smoluch, H. Lingeman, W.M.A. Niessen, H. Irth, *Anal. Chem.* 79 (2007) 1591.
[27] J.S. Hoos, M.C. Damsten, J.S.B. de Vlieger, J.N.M. Commandeur, N.P.E. Vermeulen, W.M.A. Niessen, H. Lingeman, H. Irth, *J. Chromatogr., B* 859 (2007) 147.
[28] S. Feng, M. Ye, X. Jiang, W. Jin, H. Zou, *J. Proteome Res.* 5 (2006) 422.
[29] Y. Shi, R. Xiang, C. Horváth, J.A. Wilkins, *J. Chromatogr., A* 1053 (2004) 27.
[30] E.P. Romijn, J. Krijgsveld, A.J.R. Heck, *J. Chromatogr., A* 1000 (2003) 589.
[31] J.E. MacNair, K.D. Patel, J.W. Jorgenson, *Anal. Chem.* 71 (1999) 700.
[32] H. Zou, X. Huang, M. Ye, Q. Luo, *J. Chromatogr., A* 954 (2002) 5.
[33] F. Svec, C.G. Huber, *Anal. Chem.* 78 (2006) 2100.
[34] H. Minakuchi, K. Nakanishi, N. Soga, N. Ishizuka, N. Tanaka, *Anal. Chem.* 68 (1996) 3498.
[35] W. Walcher, H. Oberacher, S. Troiani, G. Hölzl, P. Oefner, L. Zolla, C.G. Huber, *J. Chromatogr., B* 782 (2002) 111.
[36] A.R. Ivanov, L. Zang, B.L. Karger, *Anal. Chem.* 75 (2003) 5306.
[37] L. Hu, M. Ye, X. Jiang, S. Feng, H. Zou, *Anal. Chim. Acta* 598 (2007) 193.
[38] Y. Shen, N. Tolic, C. Masselon, L. Pasa-Tolic, D.G. Camp, K.K. Hixson, R. Zhao, G.A. Anderson, R.D. Smith, *Anal. Chem.* 76 (2004) 144.
[39] H.J. Issaq, K.C. Chan, G.M. Janini, T.P. Conrads, T.D. Veenstra, *J. Chromatogr., B* 817 (2005) 35.
[40] G.J. Opiteck, K.C. Lewis, J.W. Jorgenson, R.J. Anderegg, *Anal. Chem.* 69 (1997) 1518.

[41] M.T. Davis, J. Beierle, E.T. Bures, M.D. McGinley, J. Mort, J.H. Robinson, C.S. Spahr, W. Yu, R. Luethy, S.D. Patterson, *J. Chromatogr., B* 752 (2001) 281.
[42] E. Nägele, M. Vollmer, P. Hörth, *J. Chromatogr., A* 1009 (2003) 197.
[43] D.A. Wolters, M.P. Washburn, J.R. Yates, *Anal. Chem.* 73 (2001) 5683.
[44] M.P. Washburn, D.A. Wolters, J.R. Yates, *Nat. Biotechnol.* 19 (2001) 242.
[45] W.H. McDonald, R. Ohi, D.T. Miyamoto, T.J. Mitchison, J.R. Yates, *Int. J. Mass Spectrom.* 219 (2002) 245.
[46] J. Wei, J. Sun, W. Yu, A. Jones, P. Oeller, M. Keller, G. Woodnutt, J.M. Short, *J. Proteome Res.* 4 (2005) 801.
[47] J.B. Fenn, M. Mann, C.K. Meng, S.F. Wong, C.M. Whitehouse, *Science* 246 (1989) 64.
[48] M. Karas, D. Bachmann, U. Bahr, F. Hillenkamp, *Int. J. Mass Spectrom.* 78 (1987) 53.
[49] C.G.E. Nadja B. Cech, *Mass Spectrom. Rev.* 20 (2001) 362.
[50] S.J. Gaskell, *J. Mass Spectrom.* 32 (1997) 677.
[51] M. Dole, L.L. Mack, R.L. Hines, R.C. Mobley, L.D. Ferguson, M.B. Alice, *The Journal of Chemical Physics* 49 (1968) 2240.
[52] J.V. Iribarne, B.A. Thomson, *J. Chem. Phys.* 64 (1976) 2287.
[53] P. Kebarle, *J. Mass Spectrom.* 35 (2000) 804.
[54] M. Mann, M. Wilm, *Trends Biochem. Sci.* 20 (1995) 219.
[55] User Guide for Reversed-Phase ZipTip(R) - PR02358a, Millipore.
[56] M.R. Emmett, R.M. Caprioli, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* 5 (1994) 605.
[57] M. Wilm, M. Mann, *Anal. Chem.* 68 (1996) 1.
[58] H. Yin, K. Killeen, R. Brennen, D. Sobek, M. Werlich, T. van de Goor, *Anal. Chem.* 77 (2005) 527.
[59] K. Richelsen, S. Schreiber, *G4240A HPLC-Chip Cube Interface Service & Support Training*, Agilent Technogies.
[60] M.-H. Fortier, E. Bonneil, P. Goodley, P. Thibault, *Anal. Chem.* 77 (2005) 1631.
[61] J. Hardouin, M. Duchateau, R. Joubert-Caron, M. Caron, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 20 (2006) 3236.
[62] R. Zenobi, R. Knochenmuss, *Mass Spectrom. Rev.* 17 (1998) 337.
[63] L. Miguet, Université Louis Pasteur. *Nouvelles méthodologies dans l'analyse protéomique par spectrométrie de masse. Application à la recherche de biomarqueurs dans le cadre des leucémies.*, septembre 2006.
[64] G. Bouchoux, M. Sablier, *Techniques de l'ingénieur* Ref. P2645 (2005).
[65] J. Solassol, P. Marin, T. Maudelonde, A. Mangé, *Bulletin du Cancer* 92 (2005) 763.
[66] V. Seibert, M.P.A. Ebert, T. Buschmann, *Brief Funct Genomic Proteomic* 4 (2005) 16.
[67] E.P. Diamandis, *Clin Chem* 49 (2003) 1272.
[68] M. De Saint Simon, Spectrométrie de masse, *http://amdc.in2p3.fr/experimental/SM-stsimon.doc.*
[69] E. Ballot, F. Le Naour, S. Huguet, F. Tahiri, D. Samuel, C. Johanet, J.C. Duclos-Vallee, *Immuno-analyse & Biologie Spécialisée* 23 (2008) 289.
[70] P. Roepstorff, J. Fohlman, *Biomed. Mass. Spectrom.* 11 (1984).
[71] K. Biemann, *Methods Enzymology* 193 (1990) 886.
[72] R. Aebersold, M. Mann, *Nature* 422 (2003) 198.
[73] S.P. Gygi, B. Rist, S.A. Gerber, F. Turecek, M.H. Gelb, R. Aebersold, *Nat. Biotechnol.* 17 (1999) 994.
[74] P.L. Ross, Y.N. Huang, J.N. Marchese, B. Williamson, K. Parker, S. Hattan, N. Khainovski, S. Pillai, S. Dey, S. Daniels, S. Purkayastha, P. Juhasz, S. Martin, M. Bartlet-Jones, F. He, A. Jacobson, D.J. Pappin, *Mol Cell Proteomics* 3 (2004) 1154.
[75] S.A. Gerber, J. Rush, O. Stemman, M.W. Kirschner, S.P. Gygi, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 100 (2003) 6940.
[76] D.R. Barnidge, M.K. Goodmanson, G.G. Klee, D.C. Muddiman, *J. Proteome Res.* 3 (2004) 644.
[77] L. Anderson, C.L. Hunter, *Mol Cell Proteomics* 5 (2006) 573.
[78] P.V. Bondarenko, D. Chelius, T.A. Shaler, *Anal. Chem.* 74 (2002) 4741.
[79] W.M. Old, K. Meyer-Arendt, L. Aveline-Wolf, K.G. Pierce, A. Mendoza, J.R. Sevinsky, K.A. Resing, N.G. Ahn, *Mol Cell Proteomics* 4 (2005) 1487.
[80] M.C. Wiener, J.R. Sachs, E.G. Deyanova, N.A. Yates, *Anal. Chem.* 76 (2004) 6085.
[81] H. Liu, R.G. Sadygov, J.R. Yates, *Anal. Chem.* 76 (2004) 4193.

[82] B. Zybailov, M.K. Coleman, L. Florens, M.P. Washburn, *Anal. Chem.* 77 (2005) 6218.
[83] V. Pichon, *Techniques de l'ingénieur* Analyse et caractérisation, P-1420 (2006) 1.
[84] Gilson, Guide for SPE automation.
[85] M.-C. Hennion, *J. Chromatogr., A* 856 (1999) 3.
[86] A. Aresta, C.D. Calvano, F. Palmisano, C.G. Zambonin, A. Monaco, S. Tommasi, B. Pilato, A. Paradiso, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 46 (2008) 157.
[87] Q.C. Ji, E.M. Gage, R. Rodila, M.S. Chang, T.A. El-Shourbagy, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 17 (2003) 794.
[88] Q.C. Ji, R. Rodila, T.A. El-Shourbagy, *J. Chromatogr., B* 847 (2007) 133.
[89] M. Rauh, M. Groschl, W. Rascher, *Clin Chem* 53 (2007) 902.
[90] S. Dai, H. Song, G. Dou, X. Qian, Y. Zhang, Y. Cai, X. Liu, Z. Tang, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 19 (2005) 1273.
[91] P. Nanni, D. Parisi, G. Roda, M. Casale, A. Belluzzi, E. Roda, L. Mayer, A. Roda, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 21 (2007) 4142.
[92] A. Navare, M. Zhou, J. McDonald, F.G. Noriega, M.C. Sullards, F.M. Fernandez, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 22 (2008) 997.
[93] Z. Du, Y.-L. Yu, X.-W. Chen, J.-H. Wang, *Chemistry - A European Journal* 13 (2007) 9679.
[94] C.D. Calvano, C.G. Zambonin, O.N. Jensen, *Journal of Proteomics* 71 (2008) 304.
[95] P. Hägglund, J. Bunkenborg, F. Elortza, O.N. Jensen, P. Roepstorff, *J. Proteome Res.* 3 (2004) 556.
[96] E.F. Petricoin, C. Belluco, R.P. Araujo, L.A. Liotta, *Nat. Rev. Cancer* 6 (2006) 961.
[97] K. Racaityte, E.S.M. Lutz, K.K. Unger, D. Lubda, K.S. Boos, *J. Chromatogr., A* 890 (2000) 135.
[98] C. Grimm, K. Boos, C. Apel, K. Unger, P. Önnerfjord, L. Heintz, L. Edholm, G. Marko-Varga, *Chromatographia* 52 (2000) 703.
[99] K. Wagner, T. Miliotis, G. Marko-Varga, R. Bischoff, K.K. Unger, *Anal. Chem.* 74 (2002) 809.
[100] E. Machtejevas, H. John, K. Wagner, L. Ständker, G. Marko-Varga, W.-G. Forssmann, R. Bischoff, K.K. Unger, *J. Chromatogr., B* 803 (2004) 121.
[101] W.-C. Lee, K.H. Lee, *Anal. Biochem.* 324 (2004) 1.
[102] W. Zhou, B.A. Merrick, M.G. Khaledi, K.B. Tomer, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* 11 (2000) 273.
[103] M.C. Posewitz, P. Tempst, *Anal. Chem.* 71 (1999) 2883.
[104] S. Feng, M. Ye, H. Zhou, X. Jiang, X. Jiang, H. Zou, B. Gong, *Mol Cell Proteomics* 6 (2007) 1656.
[105] R. Pieper, Q. Su, C.L. Gatlin, S.-T. Huang, N.L. Anderson, S. Steiner, *Proteomics* 3 (2003) 422.
[106] J. Brand, T. Haslberger, W. Zolg, G. Pestlin, S. Palme, *Proteomics* 6 (2006) 3236.
[107] R.S. Tirumalai, K.C. Chan, D.A. Prieto, H.J. Issaq, T.P. Conrads, T.D. Veenstra, *Mol Cell Proteomics* 2 (2003) 1096.
[108] A.K. Yocum, K. Yu, T. Oe, I.A. Blair, *J. Proteome Res.* 4 (2005) 1722.
[109] P.G. Righetti, E. Boschetti, L. Lomas, A. Citterio, *Proteomics* 6 (2006) 3980.
[110] V. Thulasiraman, S. Lin, L. Gheorghiu, J. Lathrop, L. Lomas, D. Hammond, E. Boschetti, *Electrophoresis* 26 (2005) 3561.

CHAPITRE II : UTILISATION D'OUTILS BIOANALYTIQUES POUR L'ANALYSE D'UNE PROTEINE CIBLEE

L'analyse d'une protéine ciblée dans un échantillon biologique tel que le plasma fait appel à des techniques d'analyse sensibles et sélectives. En effet, la plupart des biomarqueurs potentiels sont sécrétés dans le plasma à de très faibles concentrations [1-3]. De plus, la très grande complexité de ce milieu nécessite des étapes de traitement de l'échantillon sélectives. Cette étape de traitement d'échantillon est le plus souvent réalisée par extraction sur phase solide et est basée sur la reconnaissance moléculaire entre la protéine d'intérêt et le support sélectif.

La première partie de ce chapitre est donc consacrée aux supports d'extraction sélectifs et plus particulièrement sur la reconnaissance antigène-anticorps qui a largement été exploitée pour l'extraction des protéines.

Par ailleurs, l'analyse des protéines par spectrométrie de masse nécessite une étape de digestion enzymatique. Afin de développer une méthode automatisable, les enzymes peuvent être immobilisées sur un support solide. La synthèse de réacteurs enzymatiques et la digestion en ligne seront donc développées dans la deuxième partie de ce chapitre.

D'une façon plus générale, ce chapitre aborde l'immobilisation de biomolécules sur des supports solides et leurs applications pour l'analyse de protéines ciblées.

II.1. Extraction sélective d'une protéine ciblée

II.1.1. Présentation des supports sélectifs

Il existe plusieurs approches mettant en jeu un mécanisme de rétention sélectif et basées sur le principe de la reconnaissance moléculaire.

La première voie développée consiste à utiliser des anticorps immobilisés sur un support solide appelé alors immunoadsorbant (IS). La forte affinité et la grande spécificité de l'interaction antigène-anticorps sont alors exploitées pour l'extraction sélective d'une protéine ciblée jouant le rôle d'antigène. Les immunoadsorbants ont largement été développés pour l'extraction sélective des protéines et leurs applications seront décrites dans la suite du chapitre.

La deuxième voie consiste à utiliser un polymère possédant des cavités spécifiques pour la protéine recherchée en mimant un site de reconnaissance antigène-anticorps. Ces supports sont appelés polymères à empreintes moléculaires (MIPs) et sont obtenus en introduisant une molécule modèle (empreinte ou *template*) dans un solvant en présence de monomères choisis pour leur grande affinité avec la molécule empreinte, d'un agent réticulant et d'un initiateur de polymérisation. Les monomères polymérisent autour de la molécule empreinte. Celle-ci est éliminée de la matrice une fois la polymérisation achevée, formant ainsi un polymère macroporeux renfermant des cavités complémentaires de la molécule modèle. La reconnaissance moléculaire a lieu au sein des cavités et permet une reconnaissance à la fois stérique et fonctionnelle. De nombreuses études portent sur la synthèse des MIPs pour l'extraction de composés de faible masse moléculaire et ont montré le grand potentiel de ces supports dans différents domaines d'application tels que l'environnement, l'agroalimentaire, et la pharmaceutique. Il s'agit d'ailleurs d'un des axes majeurs de recherche du laboratoire [4-8]. La synthèse des MIPs pour l'extraction de molécules de haute masse moléculaire telles que les protéines présente quant à elle quelques limitations [9,10]. En effet, la synthèse des MIPs a lieu majoritairement en solvant organique, milieu non compatible avec les protéines solubles dans l'eau. De plus, les protéines ont une structure flexible qui peut facilement être affectée par des changements de température ou d'environnement de la biomolécule. Enfin, les protéines possèdent un grand nombre de groupements fonctionnels pouvant développer des interactions avec les monomères fonctionnels. L'ajout de la protéine empreinte peut ainsi conduire à son inclusion irréversible dans la matrice polymérique [9]. Pour ces raisons, différentes approches sont actuellement développées au sein de nombreuses équipes, mais encore peu de résultats probants ont été obtenus pour l'extraction sélective de la protéine [9].

Enfin, très récemment, des supports sélectifs à base d'aptamères ont été développés pour le traitement sélectif des échantillons. Les aptamères sont des oligonucléotides de longueur comprise entre 15 et 60 bases qui possèdent une forte affinité et spécificité envers un ligand tel que des petites molécules organiques, des protéines et des cellules intactes [11]. Ils sont sélectionnés à partir d'une banque aléatoire contenant jusqu'à 10^{15} séquences différentes par une méthode combinatoire de sélection *in vitro* appelée *Systematic Evolution of Ligands by EXponential enrichment (SELEX)* selon leur aptitude à reconnaître une cible [11]. Les aptamères font déjà l'objet de nombreuses applications analytiques : bioessais, capteurs, phases stationnaires pour les techniques séparatives.... Leur utilisation à des fins d'extraction est très récente. Les premiers travaux ont été publiés fin 2008. Les oligoadsorbants ont été développés pour l'extraction de molécules de faibles masses moléculaire telles que l'ochratoxine dans des graines de blé [12], mais aucune méthode démontrant la sélectivité n'a été développée. La préparation d'un oligosorbant dans une puce a permis

l'extraction de l'adénosine monophosphate [13], mais même si la sélectivité a été démontrée sur 3 autres composés de structures proches de celle de l'analyte cible, cette étude ne présente pas d'application en échantillon réel. Cependant les aptamères semblent d'ores et déjà conduire à des résultats très prometteurs. En particulier, un oligoadsorbant a récemment été préparé au laboratoire et a permis l'extraction sélective de la cocaïne du plasma [14].

Les aptamères présentent de nombreux avantages par rapport aux anticorps. Leur petite taille comparée à celle des anticorps permettrait une meilleure densité de greffage pour l'obtention de supports de plus grande capacité. De plus, tandis que les anticorps nécessitent un ou deux jours pour retrouver leur conformation native après leur utilisation en immunoextraction, les aptamères peuvent être régénérés en quelques minutes et sont réputés pour être plus stables. Cependant, très peu d'aptamères sont actuellement disponibles et leur sélection était inenvisageable dans cette étude en raison du coût élevé et du temps nécessaire pour leur développement.

Au contraire, de nombreux anticorps sont disponibles commercialement. Un immunoadsorbant a donc été utilisé dans cette étude pour l'extraction sélective de la protéine cible.

II.1.2. Principe de l'immunoextraction

II.1.2.1. Les immunoglobulines ou anticorps

Les immunoglobulines (Ig) ou anticorps sont impliqués dans les mécanismes de défense de notre organisme. Ils sont produits en réponse à des antigènes tels que des agents infectieux et certaines substances étrangères.

Les anticorps sont des glycoprotéines exprimées à la surface des lymphocytes B. Il existe cinq classes d'immunoglobulines : IgA, IgD, IgE, IgG et IgM qui sont produites à des périodes différentes lors de la réponse immunitaire. La plupart des anticorps présents dans le sang appartiennent à la classe des IgG et représentent 70 à 75 % des Ig présentes.

Les IgG, dont la forme la plus simple est représentée par un Y, ont une masse moléculaire de l'ordre de 150 000 Da et sont constituées de deux chaînes lourdes (H) de 50 kDa, liées entre elles par des ponts disulfure et de deux chaînes légères (L) de 25 kDa, chacune étant liée à une chaîne lourde par des ponts disulfure comme le montre la figure II-1. Les chaînes lourdes et légères possèdent une partie constante (C_L et C_H) à leurs extrémités carboxy-terminales et une partie variable (V_L et V_H) en position amino-terminale.

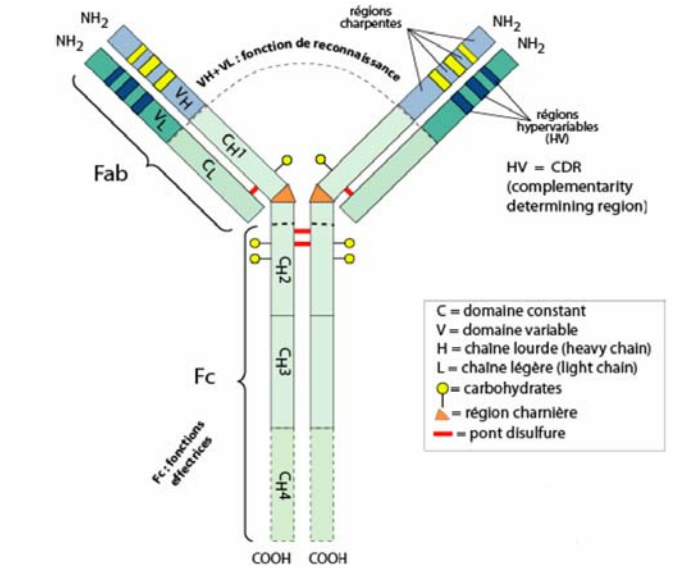


Figure II-1 : Représentation schématique d'une molécule d'IgG [15].

Une partie de la région constante des chaînes lourdes qui constitue la base du Y forme la région Fc qui détermine les propriétés biologiques des anticorps. Ainsi, Fc est la fonction effectrice de l'anticorps grâce à laquelle se fixent d'autres protéines (récepteurs) en présence d'antigènes pour induire la réponse immunitaire. La partie variable de l'anticorps est pour la plupart réduite à des petites régions hypervariables dans chaque chaîne qui constituent les sites de fixation de l'antigène ou épitope, on les appelle aussi régions déterminant la complémentarité (CDR, « *Complementarity determining region* »). L'interaction entre l'antigène et les acides aminés des CDR des anticorps se fait pas des liaisons non covalentes de type liaisons hydrogène, forces de Van der Waals, interactions électrostatiques et hydrophobes. Pour que les forces d'interactions soient efficaces, l'antigène et l'anticorps doivent non seulement pouvoir développer des interactions attractives entre eux, mais la forme du site de reconnaissance de l'anticorps doit aussi être adaptée à celle de l'antigène. Aussi, toute modification de la structure tridimensionnelle des molécules impliquées entraîne une baisse globale de l'énergie d'interaction. L'interaction antigène-anticorps est réversible et est régie par la loi d'action de masse. La constante d'affinité a une valeur souvent élevée, de 10^8 à 10^{11} mol.L^{-1}. Cette grande affinité entre un anticorps et son antigène est très exploitée pour l'extraction sélective de composés dans des milieux complexes et sera étudiée au cours de ce travail.

II.1.2.2. Mode d'obtention des anticorps

La figure II-2 est une représentation schématique de la production des anticorps. L'obtention des anticorps spécifiques d'antigènes de haute masse moléculaire est aisée car ces molécules sont intrinsèquement immunogènes. Il suffit donc d'injecter le composé cible immunogène à un mammifère (souris, lapin, cheval, mouton...) pour déclencher une réponse immunitaire et donc induire la production d'anticorps. En pratique, le composé cible est injecté à intervalles de temps réguliers à l'animal et ceci jusqu'à ce que son organisme sécrète des anticorps. Une étape de purification du sérum va permettre d'isoler les immunoglobulines de type G (IgG). Cependant, le sérum de l'animal renferme des anticorps d'affinités variées puisqu'ils sont produits par différentes cellules de l'animal. De plus, la production d'anticorps varie d'un animal à l'autre après immunisation par le même antigène, il est d'ailleurs admis que seulement 10 à 15 % des IgG obtenues sont spécifiques de la molécule cible, les autres IgG constituant le patrimoine immunitaire de l'animal. Les IgG ainsi obtenues sont appelées anticorps polyclonaux. Il s'agit d'un mélange d'anticorps reconnaissant différents épitopes.

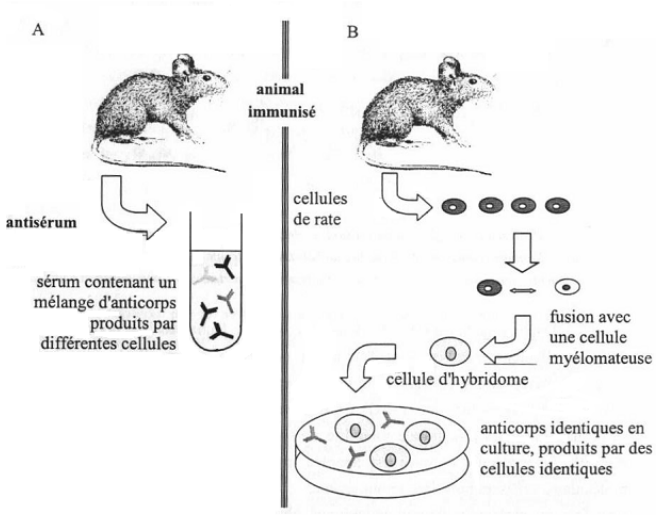


Figure II-2 : Principe de la production d'anticorps polyclonaux (A) et monoclonaux (B) [16].

En 1975, Kohler et Milstein ont mis au point une technique dite « hybridomes » permettant d'obtenir, à partir d'un même clone, une très grande quantité d'anticorps homogènes et d'une spécificité désirée. Le principe consiste à immuniser une souris qui va alors synthétiser les lymphocytes B produisant des anticorps dirigés contre l'antigène injecté. Des lymphocytes et des plasmocytes provenant de la rate de l'animal sont alors récupérés et fusionnés avec une cellule myélomateuse, cellule tumorale dite « immortelle » pour former une cellule hybride ou hybridome. Les hybridomes ainsi créés produisent alors indéfiniment de grandes quantités homogènes d'un

anticorps déterminé par la cellule mère provenant de la rate. Les hybridomes sont alors mis en culture puis ceux produisant des anticorps dirigés contre l'antigène sont sélectionnés, les autres sont éliminés. Ces anticorps sont dits monoclonaux, ils ne reconnaissent qu'un seul type d'épitope sur un antigène donné, d'où une plus grande spécificité. Ces anticorps sont coûteux à développer et à produire mais, une fois que l'hybridome est sélectionné, la production d'anticorps est très rapide et cette technique permet d'obtenir des anticorps en quantité non limitée, rigoureusement identiques, ayant tous la même affinité et la même spécificité pour un antigène donné.

II.1.2.3. L'immunoextraction

Les supports d'immunoaffinité, ou immunoadsorbants, sont des supports solides sur lesquels sont fixés les anticorps spécifiques des protéines d'intérêt. L'immunoextraction est une technique d'extraction sélective basée sur le principe de la SPE. Elle repose sur le partage des solutés entre une phase stationnaire, l'immunoadsorbant, et une phase aqueuse constituée dans un premier temps de l'échantillon puis de la phase éluante. L'utilisation d'anticorps va permettre d'isoler de façon très sélective la protéine d'intérêt sur le support et d'éliminer les nombreux interférents des matrices complexes et donc de limiter les effets de matrice lors de l'ionisation dans la source du spectromètre de masse.

Les macromolécules étant intrinsèquement immunogènes, les premiers immunoadsorbants ont été développés pour l'extraction des molécules de haute masse moléculaire. Aujourd'hui, de très nombreuses études portent sur l'utilisation d'immunoadsorbants pour le développement de méthodes analytiques spécifiques de protéines, de peptides, de virus, d'enzymes et d'hormones [17]. Le tableau II-1 présente des applications d'immunoextractions suivies d'analyses en ligne ou en différé le plus souvent par LC-MS ou LC-UV pour des protéines comme l'hémoglobine, la transferrine, le lysozyme, la ricine, la troponine, la résistine, l'érythropoïétine (EPO)... dans des matrices comme le sérum, le plasma, l'urine ou le liquide cérébrospinale (CSF).

Protéines cibles pour l'anticorps	Ac	Matrice	Support	Elution	Analyse	Re%	Capacité	Contrôle des interactions non spécifiques	Réf.
BSA, Hémoglobine, Lysozyme	P	Sérum	Particules PS(DVB) activées CDI ou pas Colonne 5 x 0.46 cm d.i.	Glycine 0,1 mol.L^{-1} pH 2,2	IS-LC–UV en ligne	n.c	635 µg/mL de colonne (adsorption) 1 µg/mL (greffage covalent)	Saturation des sites d'int. non spé. Avec du Tween 20	[18]
Transferrine	P	Sérum	Protéine G / Colonne 10 x 0.41cm d.i.	Glycine 0,1 mol.L^{-1} 2 % Ac ac.	IS-LC–UV en ligne	n.c	n.c	n.c	[19]
Lysozyme	M	Solution aqueuse	Gel activé NHS / Colonne 5 x 0.41cm d.i.	0.05 M Glycine-HCl pH 3	IS-LC–UV en ligne	n.c	287 µg/mL de colonne	Obs. du pic de BSA après 3 injections.	[20]
Toxine Mojave myotoxine α	n.c	Sang humain	Agarose modifiée protéine A	acide α-cyano-4-hydroxycinnamique, MeCN, TFA	MALDI-TOF	n.c	n.c	Lavage 0,1 % Triton X-100	[21]
Hémoglobine	P	Solution aqueuse	Activé protéine G colonne 30 x 2.1mm d.i.	HCl 12 mmol.L^{-1}	IS-SCX-IMER-TC-LC–MS (TQ)- en ligne	n.c	n.c	Lavage NH_4OAc	[22]
AβP, β_2M	M	Sérum, CSF)	Poros® aldéhyde Colonne 20 x 1mm d.i.	Glycine-HCl pH 2.6	IS-LC-MS (TOF) en ligne	n.c	n.c	Lavage NaCl 1 mol.L^{-1}	[23]
hCG	P	Urine	Sépharose activée CNBr en cartouche	Acide citrique 1 mol.L^{-1} ajusté pH 2.2	LC-MS (IT) (*)	99%	5231,6 mIU/colonne	Lavage 0,1 % Tween 20	[24]
Synacthen	n.c	Plasma	Gel commercial	Glycine + Tris pH 2.5 + NaCl.	LC-MS (QTrap)	97%	n.c	Lavage Glycine	[25]
Résistine	P	Plasma	Silice activée CDI / Cône de pipette	acide α-cyano-4-hydroxycinnamique, MeCN, TFA	MALDI-TOF	n.c	n.c	Lavage 25 % MeCN	[26]
TIINE	M	Urine (rat)	Poros® activé époxyde	Acide Acétique 5%	IS-TC-LC-MS (TQ) en ligne	n.c	n.c	n.c	[27]
BSA	P	Urine	Agarose CNBr, colonne 15 x 3 mm d.i.	Glycine-HCl pH 2,7 + 0.15mol.L^{-1} NaCl	IS-IMER-TC-LC-MS (IT) en ligne	90 %	81 µg / colonne	Lavage NaCl 0,15 mmol.L^{-1}	[28]
Insuline	M	Sérum	Sépharose CNBr	TFA 1mmol.L^{-1}	LC -MS (TQ)	103%	n.c	Lavage TFA	[29]
TIINE	M	Urine	Support poreux activée époxyde	0.5 % acide formique	IS-TC-LC-MS (TQ) en ligne	101%	n.c	Lavage NH_4OAc	[30]
EPO	M et P	Plasma équin	Billes magnétiques activées tosyl	PBS+ PEG 6000 + HCl pH 2	LC-MS (IT) différé (*)	77%	n.c	Lavage 1 % Igepal CA-630	[31]
Ricine chaine β	M	Lait et graines	Billes magnétiques activées protéine G	TFA 0.1 %	MALDI-TOF (*)	50%	n.c	Lavage HEPES pH 2,3	[32]

Ac : anticorps, P : Polyclonaux, M : monoclonaux. Re % : Rendement d'extraction. LC : chromatographie liquide, GE : électrophorèse en gel, MS : spectrométrie de masse, TOF : temps de vol, TQ : triple quadripôle, IT : piège à ions, Q-TRAP : hybride triple quadripôle, trappe d'ions linéaire. TC : colonne de piégeage, IS : immunoadsorbant, IMER : réacteur d'enzymes immobilisées, SCX : Echangeur de cations. PS(DVB) : poly(styrène divinylbenzène), CDI : carbonyldiimidazole, NHS : N-hydroxysuccinimide, CNBr : bromure de cyanogène, Ac. ac. : Acide acétique, HCl : acide chlorhydrique, MeCN : acétonitrile, NaCl : chlorure de sodium, PBS : tampon phosphate salin, TFA : acide trifluoroacétique, PEG : Polyéthylène Glycol, HEPES : Acide 4-(2-hydroxyéthyl)-1- pipérazine éthane sulfonique, NH4OAc : acétate d'ammonium. BSA : albumine de sérum bovin. AβP : β-amyloïde peptide, β_2M : β_2-microglobuline, hCG : Hormone Gonadotrophine chorionique humaine, TIINE : Néoépitopes des fragments de collagène II. EPO : Protéine recombinante humaine érythropoïétine. R : Rendement d'extraction. n.c : non communiqué. (*) Digestion en solution

Tableau II- 1 : Exemples d'immunoextractions développées pour l'analyse des protéines dans des matrices biologiques.

Le protocole d'immunoextraction est similaire à celui mis en œuvre sur les supports classiques d'extraction utilisés en SPE. Il se déroule en trois étapes qui sont schématisées sur la figure II-3 : la percolation, le lavage et l'élution. Compte tenu du milieu de synthèse et de la réactivité naturelle des anticorps et des protéines analysées, la percolation a toujours lieu eu milieu aqueux, dans des conditions proches du milieu physiologique qui vont permettre d'assurer une rétention spécifique. Le tampon le plus utilisé est le tampon phosphate salin (PBS, *Phosphate Buffer Saline*) mimant le milieu physiologique. Lors de la percolation, de faibles volumes dans le cas des échantillons biologiques, les composés sont retenus spécifiquement par les anticorps. Une étape de lavage est la plupart du temps nécessaire afin d'éliminer des composés interférents faiblement retenus sur le support ou sur les anticorps. Enfin la dernière étape consiste à désorber les composés cibles par un faible volume d'éluant.

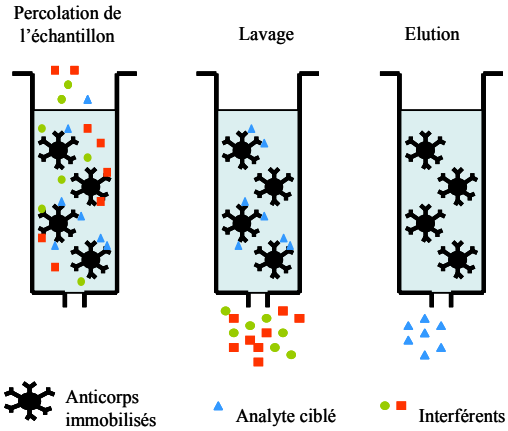


Figure II-3 : Protocole d'immunoextraction.

L'élution consiste donc à rompre les différentes interactions existant entre l'anticorps et l'antigène. Pour cela, une modification des conditions du milieu comme le pH, la permittivité ou la force ionique permet l'affaiblissement de l'interaction globale antigène-anticorps par modification de la conformation de l'anticorps et de la protéine d'intérêt [16]. La géométrie du site de reconnaissance n'est alors plus complémentaire à celle de l'antigène. Pour les petites molécules, le solvant d'élution généralement utilisé est un mélange hydro-organique constitué d'eau et d'acétonitrile ou méthanol [33]. En revanche, pour les macromolécules, un abaissement du pH et une modification de la force ionique suffisent à éluer les composés. En effet, la présence d'ions augmente la constante diélectrique apparente de l'eau et diminue donc l'énergie d'interaction entre l'antigène et l'anticorps. De plus, la modification du pH modifie l'état d'ionisation des deux entités et contribue donc à perturber les interactions du complexe [34]. D'autre part, des ions peuvent induire une modification de la conformation tridimensionnelle de la protéine anticorps, ils sont dits

chaotropes. Plus exactement, les ions chaotropes sont des composés dont la seule présence perturbe localement l'arrangement des molécules d'eau. Les protéines adoptent leur structure tridimensionnelle en fonction de leur enchaînement d'acides aminés et aussi de leur environnement. Les ions chaotropes vont donc réduire les effets hydrophobes au voisinage des protéines et ainsi modifier leur structure, jusqu'à les dénaturer totalement. La géométrie du site de reconnaissance est alors modifiée ce qui entraîne la rupture du complexe antigène-anticorps. La série d'Hofmeister est un classement d'ions selon leur propriété de stabilisation et de précipitation des protéines en solution :

$$F^- < PO_4^{3-} < HPO_4^{2-} < SO_4^{2-} < H_2PO_4^- < CH_3COO^- < Cl^- < Br^- < I^- < NO_3^- < ClO_4^- < SCN^-$$

Les ions sont classés selon leur chaotropie croissante. Ainsi, les ions phosphate sont peu chaotropes, alors que les ions chlorure, iodure, thiocyanate et perchlorate sont très chaotropes à une concentration de 1,5 à 8 $mol.L^{-1}$. Une série similaire existe pour les cations mais les anions ont un effet prépondérant. Deux autres agents chaotropes sont l'urée et l'ion guanidinium.

Comme le montre le tableau II-1, dans la plupart des études, les macromolécules sont désorbées des supports d'immunoextraction par percolation d'une solution tampon acide dont le pH est compris entre 2 et 3. Le tampon glycine est très utilisé en association avec un acide comme l'acide chlorhydrique ou acétique. Des acides comme l'acide trifluoroacétique (TFA) [29,32,35], l'acide chlorhydrique [22], l'acide formique [30], l'acide citrique [24] et l'acide acétique [27] peuvent aussi être utilisés seuls. Du chlorure de sodium peut également être ajouté pour augmenter la force ionique de la solution et diminuer la force de l'interaction entre l'anticorps et l'antigène [25,28,35]. Dans le cadre de l'immunoextraction de l'hormone gonadotrophine chorionique humaine (hCG), une comparaison de 10 solutions éluantes comprenant différentes solutions acides à des pH très faibles (citrique, acétique, trifluoroacétique), un tampon glycine acidifié et différentes molécules chaotropes a été effectuée et a montré un faible taux de récupération de l'hormone étudiée pour la plupart des chaotropes utilisés [24]. Le meilleur taux a été obtenu pour l'acide citrique. Enfin, lorsque l'immunoextraction est suivie d'une ionisation par MALDI, l'élution peut être effectuée avec la matrice MALDI, c'est-à-dire une solution saturée d'acide α-cyano-4-hydroxycinnamique dans un mélange contenant de l'acétonitrile et du TFA [21,26].

Le solvant d'élution utilisé ne doit pas induire la dénaturation irréversible de l'anticorps ou encore la précipitation des protéines analysées. En effet, même si les immunoadsorbants commercialisés actuellement sont dits à usage unique, il est intéressant de pouvoir les réutiliser afin de diminuer les coûts, notamment en phase de développement. Il a été montré que l'IS était parfaitement réutilisable après la percolation de la solution éluante à condition de procéder à une

étape de régénération des anticorps dans une solution de tampon salin telle que du PBS durant 48 h à 4 °C [16]. Pour une conservation à long terme de l'IS, il est également nécessaire d'ajouter un agent antimicrobien tel que l'azoture de sodium à la solution de régénération. Malgré les précautions prises pour ne pas dénaturer de manière irréversible les anticorps et pour régénérer l'IS, leur durée de vie n'est pas illimitée. Quelques études indiquent la durée de vie des IS préparés. Pour illustration, 55 analyses ont pu être effectuées avant d'observer une diminution de la capacité qui peut être liée à des interactions irréversibles de la protéine sur le support [24]. Une autre étude a montré que 50 à 100 analyses pouvaient être effectuées avant que l'IS ne perde complètement sa capacité à retenir l'antigène [23]. D'autres n'ont pas observé de perte significative du signal au bout de 4 000 analyses [28] !

II.1.3. Développement d'un immunoadsorbant

II.1.3.1. Techniques et supports d'immobilisation

Comme décrit dans le tableau II-1, différents supports d'immobilisation ont été utilisés. Le choix du support solide est un paramètre essentiel qui conditionne les propriétés chimiques et mécaniques de l'immunoadsorbant. Il existe de nombreuses phases solides de nature chimique ou physique variées avec des caractéristiques particulières à chacune. Un support idéal doit tout d'abord être stable, inerte et d'une forte résistance mécanique. Il doit aussi être aisément fonctionnalisable et ne pas développer d'interactions non spécifiques avec les molécules présentes dans l'échantillon à analyser. Les anticorps peuvent être liés de plusieurs façons au support solide : par des méthodes non covalentes comme l'adsorption ou l'inclusion dans les pores d'un gel ou par un greffage covalent. Ces trois types d'immobilisation et les supports adaptés sont décrits ci-dessous.

(i) Immobilisation par adsorption

L'adsorption consiste à immobiliser les anticorps sur un support solide par des interactions non covalentes telles que des interactions hydrophobes [18]. De nombreuses études portent sur l'immobilisation non covalente des anticorps par adsorption sur la protéine A [21] ou sur la protéine G [19,22,32] préalablement greffées sur un support solide tel qu'un gel d'agarose ou des billes magnétiques. Les protéines A et G sont des protéines bactériennes qui se lient aux

immunoglobulines. Les supports à base de protéine G présentent l'avantage de pouvoir être liés à une large gamme d'IgG comparés aux supports à base de protéine A qui se lie à la région Fc des anticorps [36]. Cette méthode est très simple de mise en œuvre car seul un conditionnement du support par la solution d'anticorps suffit à les immobiliser. Cependant, la désorption de l'antigène implique également la rupture de la liaison anticorps-protéine A/G qui conduit à une diminution de la capacité de l'IS. De plus la perte des anticorps induit leur transfert dans le système chromatographique, ce qui est une source d'interférence.

(ii) Immobilisation par inclusion

L'inclusion consiste à piéger les anticorps dans les pores d'un gel de silice, on parle de procédé sol-gel.

a) Le procédé sol-gel

Le procédé sol-gel s'effectue dans des conditions dites de chimie douce, à des températures nettement plus basses que celles des voies classiques de synthèse. Il repose sur l'utilisation d'une succession de réactions d'hydrolyse-condensation pour former des réseaux d'oxydes à partir de précurseurs en solution. Dans le cas des gels de silice, ces précurseurs sont des alcoxysilane $Si(OR)_4$. Les précurseurs commerciaux les plus répandus sont le tétraméthoxysilane (TMOS) et le tétraéthoxysilanes (TEOS). Le procédé est illustré sur la figure II-4.

(a) Hydrolyse

$$Si(OR)_4 + H_2O \rightarrow Si(OH)(OR)_3 + ROH$$

ou $$Si(OR)_4 + 4\ H_2O \rightarrow Si(OH)_4 + 4\ ROH$$

(b) Condensation

aqueuse $$2\ Si(OH)(OR)_3 \rightarrow (RO)_3Si\text{-}O\text{-}Si(OR)_3 + H_2O$$

alcoolique $$Si(OR)_4 + Si(OH)(OR)_3 \rightarrow (RO)_3Si\text{-}O\text{-}Si(OR)_3 + ROH$$

(c) Polycondensation

$$x\ Si\text{-}O\text{-}Si \rightarrow (Si\text{-}O\text{-}Si)x$$

Figure II-4 : Réactions de polymérisation pour la synthèse d'un matériau par le procédé sol-gel.

La réaction d'hydrolyse a pour but d'engendrer des fonctions réactives silanols Si-OH. Cependant, les alcoxydes de silicium réagissent très lentement avec l'eau, aussi cette étape nécessite l'ajout d'un catalyseur qui peut être acide ou basique. De plus, cette réaction est réalisée en présence de l'alcool R-OH afin de solubiliser l'alcoxyde. La solution ainsi obtenue est appelée sol.

Ces réactions d'hydrolyse suivies des réactions de condensation conduisent à la formation d'oligomères. Ces oligomères croissent jusqu'à se lier ensemble pour former un gel constitué de ponts siloxane Si-O-Si et dont la viscosité augmente au cours du temps. A ce stade, le gel contient encore des solvants puisque les réactions sont réalisées à température ambiante. Le gel est alors constitué d'un réseau d'oxyde gonflé par le solvant, avec des liaisons chimiques assurant la cohésion mécanique du matériau en lui donnant un caractère rigide, non déformable. L'appellation sol-gel est en fait une contraction des termes « solution-gélification ».

L'obtention finale du matériau à partir du gel passe par une étape de séchage qui consiste à éliminer le solvant du réseau polymérique. Selon le mode de séchage, le procédé sol-gel peut donner différents types de matériaux plus ou moins denses. Par exemple, l'évacuation du solvant dans des conditions supercritiques (autoclave sous pression élevée) conduit à la formation d'un matériau très poreux appelé aérogel n'ayant subi aucune densification. Pour un séchage traditionnel des gels à une température proche de la température ambiante (en étuve ou à l'air libre); l'élimination des solvants est beaucoup plus délicate. En effet, un séchage trop rapide peut entraîner la fissuration du matériau en raison des contraintes induites par les forces capillaires à l'intérieur des pores du gel. L'évaporation du solvant se traduit au fur et à mesure par une densification du matériau et va former un xérogel. Une évaporation normale mène à une réduction du volume de l'ordre de 5 à 10 %.

Les propriétés structurales d'un matériau sol-gel peuvent être modifiées par un grand nombre de facteurs : la température, le pH, la durée de réaction, la nature du solvant, la nature et la concentration des précurseurs. Cependant, les paramètres les plus significatifs sont le pH et le rapport de la quantité d'eau par rapport à la quantité de silane ($R=H_2O/Si$). La catalyse acide accélère la réaction d'hydrolyse de l'alcoxyde tandis que la vitesse de condensation reste modérée. Un fort taux d'hydrolyse (pH acide) favorise donc la formation de longues chaînes qui, peu à peu, sont réticulées jusqu'à former un gel polymérique. La catalyse en milieu basique, quant à elle, accélère surtout la condensation conduisant à la formation de particules interconnectées. Le gel formé est appelé gel colloïdal. De la même façon, plus il y a d'eau, c'est-à-dire plus le rapport R est élevé, plus l'hydrolyse sera complète avant la condensation ; les réactions chimiques sont accélérées et le temps de gélation diminue. Le ratio R doit au moins être de 2:1 pour approcher l'hydrolyse complète de l'alcoxyde [37,38].

En contrôlant l'ensemble de ces paramètres, il est possible d'adapter les propriétés du support sol-gel, notamment la taille des pores, les propriétés mécaniques et le temps de gélation.

b) Encapsulation des biomolécules

Le procédé sol-gel impliquant de faibles températures est parfaitement adapté à l'inclusion de molécules biologiques au sein de la structure du matériau. Ainsi, l'encapsulation de biomolécules consiste à former une matrice sol-gel poreuse autour de la molécule comme l'illustre la figure II-5.

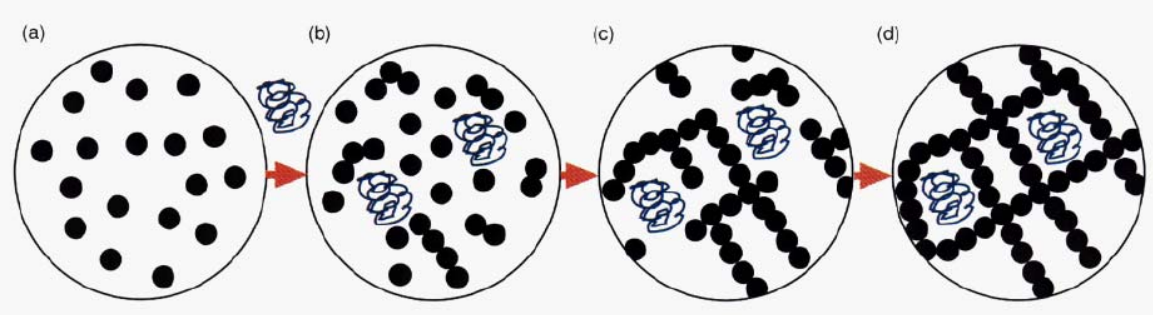


Figure II-5 : Encapsulation de protéines dans un réseau de silice (a) Formation des particules de sol. (b) Introduction de la solution de protéines. (c) Le réseau de silice grandit et commence à encapsuler les protéines. (d) Les protéines sont immobilisées dans le gel [39].

Comme mentionné précédemment, les procédures de synthèse sol-gel utilisent généralement des pH extrêmes du fait de la catalyse acide ou basique et des grandes quantités d'alcool. Dans le cas d'encapsulation de biomolécules, le procédé doit être adapté pour se placer dans des conditions moins dénaturantes [40]. A cet effet, le TMOS est souvent utilisé puisque le produit des réactions est du méthanol présentant une polarité plus proche de celle de l'eau par rapport aux autres alcools [39]. Pour ces raisons, Ellerby *et al.* ont développé une procédure sans addition d'alcool à la solution de précurseurs (TMOS) et augmenté le pH après l'étape d'hydrolyse acide. Pour cela, la biomolécule à encapsuler est incorporée avec un tampon salin à pH physiologique dans la matrice avant la condensation [41]. Le pH est ainsi à une valeur compatible pour éviter toute dénaturation et la précipitation des biomolécules immobilisées. Cependant, il a été observé que l'utilisation du tampon contenant les biomolécules pouvait accélérer la réaction de gélation. Le temps de gélation étant inversement proportionnel à la vitesse de condensation, une gélation plus rapide peut donc affecter la formation du sol-gel. D'autre part, ce procédé modifié n'a pas permis de s'affranchir de la production d'alcool pendant les réactions d'hydrolyse-condensation. A cet effet, d'autres procédés sol-gel visant à diminuer la production d'alcool et limiter les effets dénaturants de l'alcool sur les biomolécules ont été développés.

Il existe un procédé sol-gel dit aqueux qui consiste à éliminer l'alcool durant la synthèse avec un évaporateur rotatif [42]. Lorsque tout l'alcool est évaporé, la biomolécule est ajoutée et la

réaction de condensation a lieu. Les enzymes immobilisées par cette méthode ont ainsi complètement préservé leur activité comparée à la méthode sol-gel classique.

Par ailleurs, de nouveaux précurseurs dont les produits de réactions ne sont pas des alcools ont été développés. Par exemple, des précurseurs dérivés des sucres alcools libèrent un sous produit comme par exemple le glycérol qui ne dénature pas la biomolécule et au contraire a tendance à la stabiliser. Gill et Balsteros ont préparé le poly(glycéryl silicate) (PGS), précurseur stable et soluble dans l'eau et préparé à partir de TMOS et de glycérol. Le PGS ainsi formé est hydrolysé et se gélifie rapidement dans un tampon contenant la biomolécule sans avoir besoin d'un catalyseur [43]. Ce support possède une bonne porosité, un grand pourcentage d'encapsulation et la trypsine encapsulée conserve son activité à 98 %. L'équipe de Brennan a proposé le diglycéryl silane (DGS) comme précurseur biocompatible permettant le maintien de l'activité des biomolécules [44-46]. D'autres précurseurs dérivés des sucres ont été proposés pour la synthèse de matériau sol-gel comme par exemple le gluconamidysilane (GLS) [47]. Le spectre d'émission de la protéine HSA a été observé dans le cas de la protéine en solution et dans les cas où elle est encapsulée dans un matériau sol-gel préparé à partir de TEOS seul, TEOS/GLS, DGS/GLS et DGS en blocs de dimensions 1,5 cm x 1 cm x 1 cm [45]. La figure II-6 présente les spectres obtenus. La protéine encapsulée dans les matrices à base de TEOS et de TEOS/GLS montre un décalage du maximum dans le spectre d'émission par rapport à la protéine en solution dans sa conformation native. Ceci est expliqué par la production d'éthanol non compatible avec la protéine. Les spectres d'émission de la protéine dans les matrices à base de DGS et de DGS / GLS sont identiques à celui de la protéine en solution suggérant que la protéine est dans sa conformation native dans ces phases.

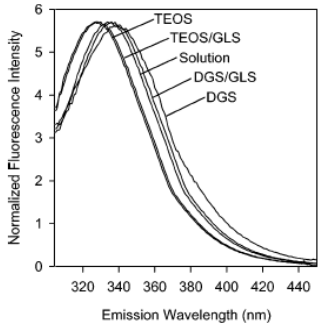


Figure II-6 : Spectres d'émission de la HSA en solution et dans différents matrices de silice sol-gel [45].

D'autres part, des additifs tels que la gélatine, le chitosan, le glycérol, le sorbitol et autres appelés osmolytes peuvent être ajoutés pour stabiliser la biomolécules encapsulée [48-50]. Ainsi, en variant le type et la quantité de ces additifs, les propriétés du matériau sol-gel dopé seront optimisées, en particulier la stabilité et l'activité de la biomolécule immobilisée.

Un autre procédé sans alcool consiste à utiliser le silicate de sodium (NaSi) comme précurseur biocompatible [51]. Cependant, la synthèse relargue des grandes concentrations d'ions sodium, et nécessite donc une étape de purification sur une résine échangeuse de cations afin que les ions sodium s'échangent avec les protons et que la synthèse relargue de l'eau.

Ainsi, même si de nombreux travaux ont été réalisés sur l'encapsulation de biomolécules au sein de réseau purement inorganiques, il a été montré que la conformation des biomolécules encapsulées était altérée notamment dans la cas d'utilisation du précurseur TEOS [52]. En effet, lorsque ces phases vieillissent, les larges pores sèchent tandis que les plus petits sont encore mouillés créant des gradients de pression interne importants et provoquant la fissuration du matériau. Des matrices inorganiques modifiées par des composés organiques ont donc été développées pour former des matériaux hybrides de façon à préserver l'activité des biomolécules.

Ces matériaux peuvent être obtenus à partir de précurseurs mixtes tels que les organo-alcoxysilanes $R'_{(4-x)}Si(OR)_x$ qui comportent simultanément des fonctions hydrolysables (Si-OR) donnant naissance à un réseau de silice et des fonctions organiques (Si-R') qui restent fixées sur le squelette de silice. Ces phases sont alors appelées ORMOSILS (*Organically MOdified SILicates*) [38,53]. Selon sa nature, le groupement organique confèrera à la silice des propriétés particulières. Les modificateurs organiques peuvent être introduits pour modifier la taille des pores, moduler l'hydrophobicité ou la flexibilité du matériau. De cette façon, il est possible d'introduire des groupements fonctionnels dans le polymère. Ces matériaux présentent une forte résistance chimique et thermique ainsi que de bonnes propriétés mécaniques. Les organosilanes utilisés sont par exemple, le méthyltriméthoxysilane (MTMS) ou le propyltriméthoxysilane (PTMS). Des surfactants ou polymères solubles peuvent aussi être incorporés dans la solution sol afin de contrôler le volume et la taille des pores. Ces additifs vont induire la séparation de phase et la formation de macropores [54,55]. Il s'agit du polyéthylène glycol (PEG) ou du polyéthylène oxyde (PEO).

Finalement, lorsque le tampon contenant la biomolécule est ajouté avec les additifs, la réaction de gélation est initiée. En fonction de paramètres comme le pH, la force ionique, la présence de catalyseur de polymérisation, la gélation peut s'effectuer en quelques secondes jusqu'à plusieurs heures. Le plus souvent, le temps de gélation est inférieur à 60 minutes. Pendant ce temps, le futur gel peut être moulé en plusieurs formats. En particulier, des colonnes monolithiques peuvent être préparées en introduisant le mélange réactif dans un capillaire en silice fondue et en laissant réagir. Ce point sera plus longuement décrit lors de la description des phases monolithiques en format miniaturisé.

c) Encapsulation d'anticorps

Il existe de nombreuses études concernant la préparation d'immunoadsorbants à base d'anticorps encapsulés dans réseau de silice. Cependant, ces études sont exclusivement dédiées à l'extraction de petites molécules. Dans la plupart des cas, après encapsulation des anticorps dans la matrice sol-gel, le matériau ainsi obtenu est broyé et conditionné en colonne [56]. Une revue répertorie quelques applications et les caractéristiques des immunoadsorbants développés [57]. L'inconvénient principal de l'encapsulation des anticorps est le relargage des biomolécules, limitant l'utilisation à long terme de l'immunoadsorbant.

(iii) Immobilisation par liaison covalente

L'immobilisation par liaison covalente est la plus utilisée pour le greffage d'anticorps sur un support solide car elle apporte une grande stabilité à la liaison entre l'anticorps et le support. Elle consiste à faire réagir les groupements amine ou carboxylique libres des anticorps avec le support préalablement fonctionnalisé par des groupements réactifs. Divers supports peuvent être utilisés comme la silice activée [26], les gels d'agarose [20,24,25,28,29,58], les polymères organiques [18,23,27] et des billes magnétiques [31]. Ces support peuvent être activés par du bromure de cyanogène (CNBr) [24,28,29,58], un aldéhyde [23], une fonction époxyde [27,30], du carbonyldiimidazole (CDI) [18,26] ou encore du N-hydroxylsuccinimide (NHS) [20]. La figure II-7 présente les réactions les plus rencontrées entre un anticorps et un support.

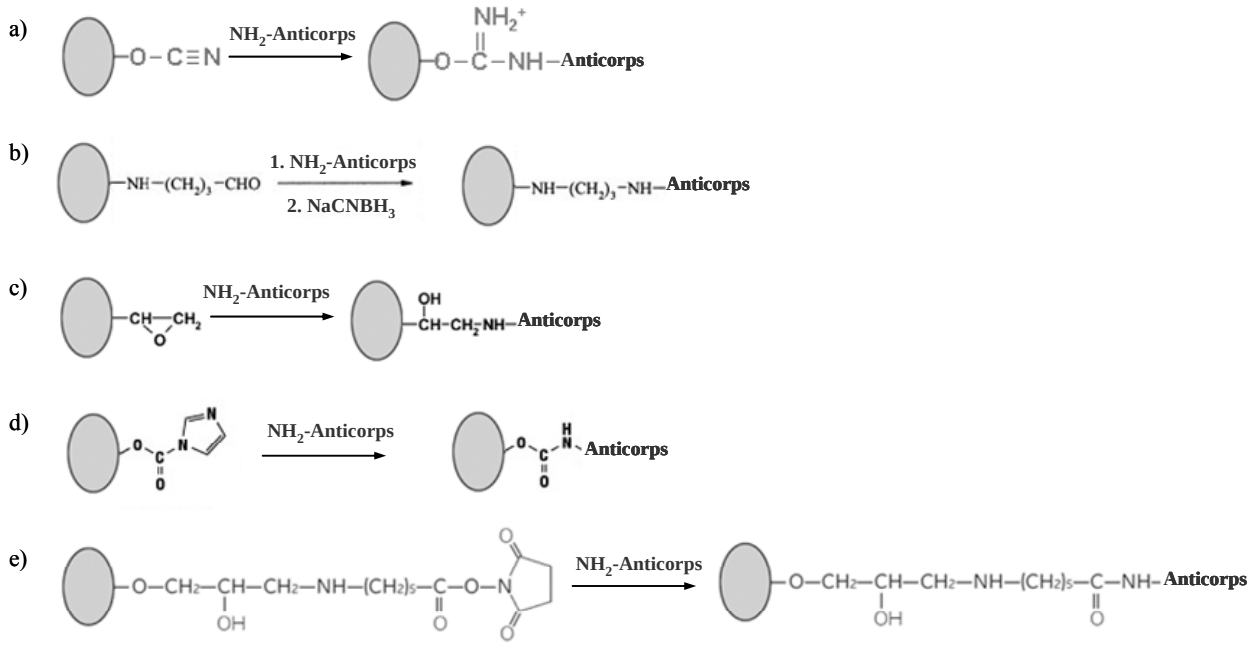


Figure II-7 : Représentation de la réaction entre une enzyme et un support activé par du CNBr (a), un aldéhyde (b), un époxyde (c), du carbonyldiimidazole (d) et du NHS (e).

Parmi tous les supports disponibles, la silice activée et les gels d'agarose sont les plus utilisés pour l'immobilisation covalente. Les gels d'agarose sont des polysaccharides naturels qui renferment un grand nombre de fonctions hydroxyles. Ces supports sont stables sur une gamme limitée de pH allant de 4 à 9. La Sépharose est un gel d'agarose hautement ramifié. Ce support est privilégié car il offre une meilleure stabilité et permet de travailler sur une plus large gamme de pH allant de 3 à 14. L'inconvénient majeur des supports à base d'agarose est leur faible résistance mécanique, limitée à 4 bars. Ces supports ne peuvent donc pas être utilisés pour un couplage direct à un système chromatographique. Toutefois, le couplage est réalisable en intégrant une précolonne intermédiaire de piégeage des composés qui induit une faible perte de charge. Les composés piégés sélectivement par l'IS sont alors transférés vers ce support puis vers la colonne analytique. Le principe sera détaillé par la suite.

Les silices fonctionnalisées sont des supports très résistants à la pression et favorisent donc le couplage direct en ligne avec la LC. Ces supports sont disponibles dans une large gamme de taille de particules (5 à 200 μm), de pores (5 à 400 nm) et dans une grande variété de groupements fonctionnels. En revanche, la silice ne tolère qu'une gamme limitée de pH, allant de 2 à 8.

Ce type d'immobilisation conduit à un greffage aléatoire des anticorps en raison de la présence de plusieurs fonctions amine libres à la surface des anticorps. L'inconvénient étant que certains sites de reconnaissance des anticorps peuvent être alors difficilement accessibles à l'analyte. Pour cette raison, des études ont proposé un greffage orienté des anticorps, c'est-à-dire l'immobilisation d'anticorps par leur partie localisée et éloignée des sites de reconnaissance, la région Fc. Le principe consiste tout d'abord à oxyder les résidus carbohydrates de la région Fc des anticorps. Les fonctions aldéhyde ainsi formées vont alors réagir avec un support polymérique, dit hydrophile, car fonctionnalisé par des groupements amine ou hydrazine, laissant alors les deux sites de reconnaissances de l'anticorps bien accessibles à l'antigène. Toutefois, ces supports polymériques induisent de nombreuses interactions non spécifiques, limitant la sélectivité de l'immunoadsorbant [59].

Dans cette étude, l'immobilisation covalente sur Sépharose activée a été choisie afin de limiter les interactions non spécifiques et la perte des anticorps. De plus, les anticorps choisis dans cette étude sont des anticorps monoclonaux. En effet, comme précédemment mentionné, dans le cas des anticorps polyclonaux, seuls 10 à 15 % sont spécifiques de la molécule cible alors que pour les monoclonaux, la pureté est de 100 %. Ce paramètre est important en particulier pour la miniaturisation des immunoadsorbants ou une très faible quantité d'anticorps est immobilisée.

II.1.3.2. Apport en sélectivité

L'objectif étant le développement d'une méthode sélective, il est important de s'assurer de la spécificité des interactions mises en jeu. Aussi, la plupart des études citées étant appliquées à des échantillons biologiques complexes (sérum, plasma...), une étape de lavage est indispensable.

Pour illustration, une étude a démontré la sélectivité d'un immunoadsorbant dédié à l'immunoextraction de l'hémoglobine en injectant un mélange de 5 protéines non spécifiques de l'IS dans du PBS [18]. Grâce à la grande affinité entre l'anticorps et l'antigène, les 5 protéines interférentes n'ont pas été retenues sur le support dès l'étape de percolation. Des interactions non spécifiques peuvent également avoir lieu entre la protéine ciblée et l'immunoadsorbant ; soit avec une partie non spécifique des anticorps soit avec le support d'immobilisation. A cet effet, trois protéines d'intérêt ont été percolés sur un support polymérique adsorbé par des anticorps non spécifiques de la molécule cible et aucune interaction non spécifique des trois protéines d'intérêt de l'étude n'ont été observées sur ces anticorps ou sur le support [18]. Cependant, en percolant un digestat de lysozyme sur ce même support, une quantité non négligeable de peptides reste liée à l'IS, ce qui peut être évité si les sites des liaisons non spécifiques de l'IS sont saturés par un détergent comme le Tween 20 après l'immobilisation des IgG.

Pour une utilisation optimale d'un support à reconnaissance moléculaire comme les ISs, il est essentiel de s'assurer de la sélectivité du protocole d'extraction. A cet effet, il peut être suffisant d'observer si des pics interférents sont présents au niveau des temps de rétention des composés d'intérêt [25,26,31,60] ou si le signal des ions des peptides d'intérêt n'est pas modifié par l'analyse d'une matrice complexe [24]. Dans une autre étude, la superposition quasi parfaite des chromatogrammes représentant le TIC (*Total Ion Current*) obtenus après les immunoextractions et analyses d'un échantillon pur dopé et d'un échantillon d'urine dopée a montré la grande sélectivité de l'IS et du protocole d'extraction développé [28]. La figure II-8 présente les courants ioniques totaux obtenus après l'analyse totale d'un échantillon de PBS dopé par 2,0 $\mu mol.L^{-1}$ de BSA et d'un échantillon d'urine bovine dopée par 2,2 $\mu mol.L^{-1}$ de BSA après digestion à la trypsine. Cet exemple témoigne de la sélectivité apportée par le support d'immunoextraction.

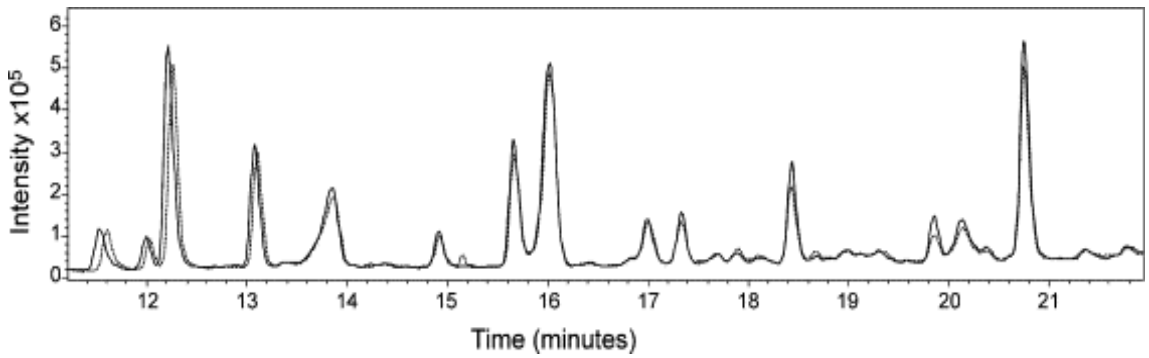


Figure II-8 : Chromatogrammes LC-MS représentant les courants ioniques totaux obtenus après immunoextraction, digestion et analyse en ligne d'un échantillon de PBS dopé par de la BSA à 2 µmol/L (en trait plein) et d'un échantillon d'urine dopé par 2,2 µmol / L de BSA (en pointillés) [28].

Les échantillons biologiques sont d'une telle complexité qu'une étape de lavage de l'immunoadsorbant est généralement indispensable. Elle est le plus souvent effectuée par une solution saline afin de réduire l'intensité des liaisons non spécifiques tout en assurant la rétention des composés cibles. Pour illustration, les ions interférents non spécifiquement liés à l'IS peuvent être suivis en spectrométrie de masse [23]. Dans cette étude, un IS anti-β_2 microglobuline (β_2M) a été préparé et appliqué à l'extraction de la β_2M dans 200 µL de plasma. La figure II-9 présente les chromatogrammes obtenu par extraction des ions d'intérêt du courant ionique total correspondant à la protéine d'intérêt d'une part (B et D) et à deux composés interférents non spécifiquement liés à l'IS d'autre part (A et C).

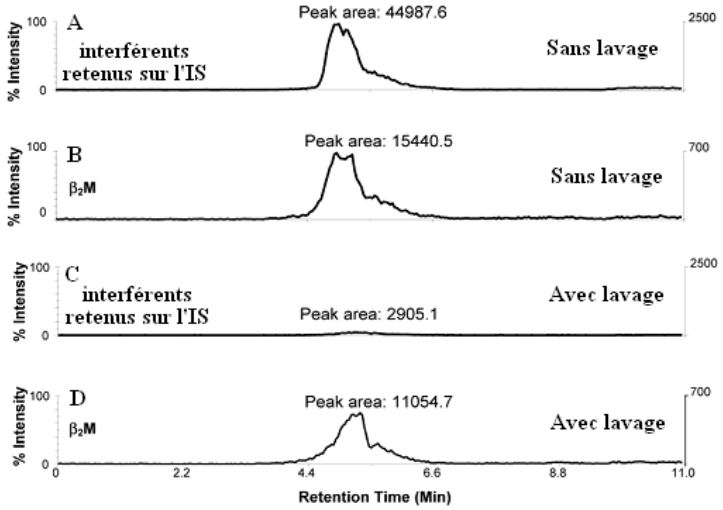


Figure II-9 : Effet de l'introduction d'une étape de lavage dans une procédure d'immunoextraction sur un échantillon de sérum dopé par la protéine β_2M. Le chromatogramme ionique des deux principaux ions non spécifiquement liés à l'immunoadsorbant avant lavage (A) est comparé à celui après lavage (C). Il en est de même pour les chromatogrammes ioniques correspondant à l'analyte β_2M avant (B) et après lavage (D). Adapté de [23].

Les signaux obtenus après un protocole d'extraction incluant une étape de lavage avec 300 µL de NaCl à 1 $mol.L^{-1}$ ont été comparés à ceux obtenus sans étape de lavage. Les résultats montrent une nette diminution des signaux correspondant aux composés interférents avec l'étape de lavage. Cependant, ce lavage entraîne aussi une légère élution du composé cible puisque l'intensité du signal diminue.

En conclusion, l'ensemble de ces résultats montrent qu'il faut être très vigilant par rapport aux interactions non spécifiques avec le support. L'analyse d'échantillons complexes nécessite l'introduction d'une étape de lavage afin d'éliminer les interférents non spécifiquement retenus sur l'immunoadsorbant tout en évitant l'élution de l'analyte. Toutefois, même si une étape de lavage est la plupart du temps réalisée, la sélectivité n'est pas systématiquement démontrée.

II.1.3.3. Capacité et rendements d'extraction

Un autre paramètre caractérisant un immunoadsorbant est sa capacité. Celle-ci est définie comme le nombre total de sites de reconnaissance disponibles sur l'IS. Ce paramètre dépend de la quantité et du type d'anticorps utilisé mais aussi de l'accessibilité des sites de reconnaissance, ce qui rend difficile son calcul théorique, notamment dans le cas d'un greffage covalent aléatoire. On ne peut donc l'estimer que de façon expérimentale. Elle peut être mesurée par percolation de quantités croissantes d'analyte sur l'IS en appliquant le protocole d'immunoextraction. Un exemple est donné en figure II-10 pour un immunoadsorbant constitué d'un gel d'agarose anti-albumine de sérum bovin (BSA) commercial [28].

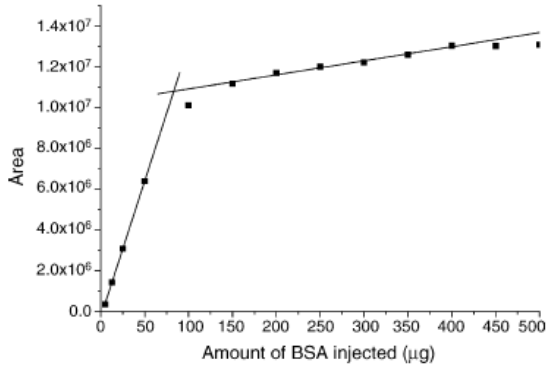


Figure II-10 : Courbe de capacité d'un immunoadsorbant anti-BSA obtenue par injection de quantités croissantes de BSA. Aire du pic de BSA en fonction de la quantité injectée. Détection à UV 280 nm. [28]

La courbe est caractérisée par une première partie linéaire définissant la gamme de concentrations conduisant à un rendement d'extraction constant de la BSA sur l'IS, c'est-à-dire la

gamme pour laquelle l'extraction de l'analyte est quantitative. Pour des quantités supérieures à 81 µg de BSA percolés sur cet IS, la courbe atteint un plateau correspondant à la quantité maximale de BSA pouvant être fixée sur l'IS sans diminution du rendement d'extraction. Cette valeur correspond donc à la capacité de l'IS. La faible pente obtenue au-dessus de la capacité indique la contribution de faibles interactions non spécifiques qui induit une faible rétention sur l'IS.

Le rendement est défini par le rapport entre la quantité de composé cible extraite et la quantité de composé cible percolée. Lorsque la capacité est dépassée, le rendement d'extraction diminue. Parmi les études citées dans le tableau II-1, toute ne mentionne pas ce rendement d'extraction alors qu'il est essentiel pour une analyse quantitative. De plus, très peu d'études concernant l'immunoextraction d'une protéine ciblée mentionne la capacité de l'IS développé. La connaissance de la valeur de la capacité permet de prévenir d'un dépassement de capacité induisant un faible rendement d'extraction. Concernant les biomarqueurs protéiques, ils sont, dans la plupart des cas, présents à de très faibles concentrations dans les milieux biologiques. Ainsi, la capacité de l'immunoadsorbant n'est pas un facteur limitant pour l'analyse de ces composés. Néanmoins, dans le cas d'immunoadsorbant miniaturisé, la capacité est un paramètre à contrôler.

II.1.3.4. Analyse en ligne

Afin de coupler en ligne l'étape d'immunoextraction et d'analyse, les immunoadsorbants sont introduits dans des précolonnes et intégrés au montage analytique par des vannes de commutation. Comme déjà mentionné, si les supports d'immobilisation des anticorps sont résistants à la pression, il est possible de les coupler directement à la colonne analytique [35]. Les analytes sont donc directement élués vers la colonne analytique où ils seront séparés. Cependant, si le support n'est pas résistant à la pression, comme la Sépharose, il est possible d'utiliser une précolonne générant peu de pression à la place de la colonne analytique, mais celle-ci n'a pas que peu de pouvoir séparatif [20]. Le plus souvent, une précolonne est intercalée entre l'IS et la colonne analytique pour permettre le piégeage des composés après leur élution de l'IS puis le transfert et la séparation des composés sur la colonne analytique [24,30]. La précolonne de piégeage ou TC (*Trap column*) est généralement remplie par un support conventionnel hydrophobe comme de la silice greffée ou un copolymère organique et génère une faible perte de charge sur l'IS. Ainsi, après la percolation et le lavage de l'échantillon sur l'IS, les analytes sont élués et retenus par interactions hydrophobes sur la colonne de piégeage. Par commutation de la vanne, les composés sont élués par la phase mobile pour être séparés et détectés par le système chromatographique.

En conclusion, les systèmes en ligne couplant l'immunoextraction à l'analyse présentent de nombreux avantages comme la réduction des étapes manuelles, l'automatisation possible et le gain en sensibilité.

II.1.4. Conclusion

L'analyse d'une protéine ciblée dans des échantillons biologiques nécessite une étape d'extraction sélective de la protéine. La très forte affinité des anticorps pour leur antigène permet de diminuer les limites de détection car cette sélectivité offre un gain indéniable en sensibilité. Cependant, compte tenu de la complexité des échantillons comme le plasma et notamment des nombreuses autres protéines présentes, un grand soin doit être porté à l'optimisation du protocole d'immunoextraction et en particulier à l'étape de lavage. Pour cette étude, le choix des anticorps monoclonaux est justifié en raison des objectifs de miniaturisation et donc pour assurer une capacité suffisante à l'immunoadsorbant. L'immobilisation des anticorps sur support solide se fait par liaison covalente bien plus résistante que l'adsorption par exemple et prévenant du relargage des anticorps de l'immunoadsorbant. Compte tenu du grand nombre d'études effectuées au laboratoire pour la synthèse d'immunoadsorbant, le choix du support solide s'est porté sur la Sépharose activée CNBr qui présente une bonne hydrophilie limitant les interactions non spécifiques. L'inconvénient principal de ce support est sa faible résistance mécanique.

L'analyse d'une protéine par spectrométrie de masse incluant une étape de digestion enzymatique, cette dernière sera effectuée après l'extraction sélective et avant la séparation par chromatographie en phase liquide. La digestion peut être effectuée en solution après l'étape d'immunoextraction [24,31,32] mais l'automatisation est dans ce cas impossible. Les supports d'enzymes immobilisées permettent la mise au point d'une digestion en ligne couplée à l'analyse par LC-MS. La suite de ce chapitre porte donc sur l'immobilisation d'enzymes sur support solide pour la digestion en ligne de protéines.

Le choix d'un support d'immobilisation des enzymes générant peu de pression permettra le couplage entre l'étape d'immunoextraction, la digestion en ligne et l'analyse par LC-MS sans altérer le support de Sépharose de l'immunoadsorbant. Cependant, la mise au point de ce système nécessite une bonne compatibilité entre chaque étape, ce point sera aussi développée dans la suite de ce chapitre.

II.2. Digestion sur réacteur enzymatique

II.2.1. Introduction

L'utilisation d'enzymes immobilisées sur support solide est très répandue dans les secteurs de l'agroalimentaire, textile et pharmaceutique, notamment pour l'isomérisation du glucose, l'hydrolyse du lactose ou encore la production d'acrylamide... [61]. Récemment, cette technique a été utilisée pour la réalisation de l'étape de digestion des protéines avant leur analyse chromatographique. En effet, comme mentionné précédemment, l'immobilisation d'enzymes sur un support solide va non seulement permettre d'automatiser l'étape de digestion mais aussi de réduire le temps de digestion par rapport à la digestion en solution. En immobilisant les enzymes, l'autodigestion est limitée et leur stabilité augmentée ce qui permet de les réutiliser.

D'un point de vue pratique, la digestion en ligne consiste à coupler le réacteur enzymatique à l'analyse, le plus souvent par LC-MS. Quelques travaux témoignent d'un couplage direct de l'IMER à l'analyse par spectrométrie de masse [62-65]. Ce montage est simple mais nécessite des conditions de digestion compatibles avec la spectrométrie de masse, à savoir l'utilisation de tampons volatils tels que l'acétate d'ammonium [63,64] ou le bicarbonate d'ammonium [65]. Un certain pourcentage de solvant organique dans le tampon de digestion peut également aider à l'ionisation dans la source électrospray à condition de ne pas dénaturer l'enzyme [62]. Enfin, l'inconvénient principal de cette méthode sans séparation chromatographique au préalable est le manque de résolution lié au mélange complexe de peptides issus de la digestion de la protéine, d'autant plus s'il s'agit d'un mélange de protéines et/ou d'un échantillon réel. Pour ces raisons, le réacteur enzymatique est généralement couplé à une séparation par chromatographie liquide avant la détection par spectrométrie de masse.

La colonne de chromatographie liquide peut être placée avant le réacteur enzymatique dans le cas d'une séparation de protéines intactes [66]. Mais généralement, la colonne est couplée en sortie de l'IMER pour une séparation des peptides avant leur analyse par MS [67-73]. Dans le cas de la trypsine, pour laquelle le tampon de digestion est une solution saline, une étape de dessalage doit avoir lieu si une détection par MS est utilisée. Les sels peuvent être éliminés en tête de colonne analytique, sortant alors dans le volume mort, ils sont dirigés vers la poubelle avant l'analyse des peptides retenus par spectrométrie de masse [70,72,73]. Dans cette configuration, le support d'immobilisation de l'IMER doit être résistant mécaniquement pour supporter les fortes pressions générées par la colonne analytique.

Afin d'améliorer le système, le couplage entre l'IMER et l'analyse par LC-MS est le plus souvent assuré par une précolonne intermédiaire remplie d'une phase stationnaire hydrophobe qu'on appelle colonne de piégeage (TC, *Trap Column*) [22,28,74-82]. Comme illustré sur la figure II-11, le dispositif nécessite l'ajout d'une vanne de commutation de manière à ce que les sels éliminés ne soient pas injectés sur la colonne chromatographique. Les peptides issus de la digestion sur l'IMER sont alors transférés par le tampon de digestion et retenus sur la colonne de piégeage. L'élution vers la colonne analytique et le spectromètre de masse est ensuite assurée par une phase mobile hydro-organique acide. Comme tout couplage en ligne, la colonne de piégeage est généralement de faible dimension et d'un diamètre inférieur ou égal à la colonne analytique pour la qualité du couplage. Elle génère donc peu de contre-pression ce qui permet de coupler des supports peu résistants mécaniquement ayant servi pour l'immobilisation de l'enzyme avec une colonne analytique. L'étape de dessalage, est réalisée en percolant tout simplement de l'eau pure sur la précolonne de piégeage. De plus, elle permet de reconcentrer les peptides limitant ainsi les phénomènes d'élargissement de bande.

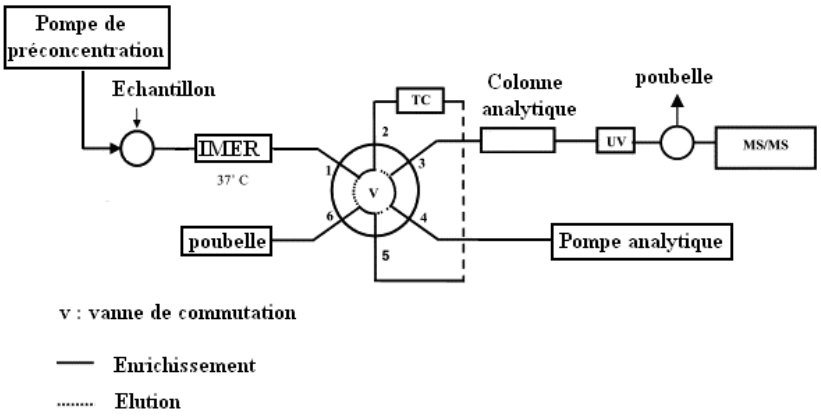


Figure II-11 : Représentation schématique du système analytique couplant un réacteur enzymatique (IMER) à une colonne analytique par l'intermédiaire d'une colonne de piégeage (TC). Adapté de [77].

De nombreuses revues répertorient les réacteurs enzymatiques (IMERs) et leurs applications pour l'analyse de protéines [83-86].

. Comme pour les immunoadsorbants, l'immobilisation des enzymes peut être effectuée de façon covalente ou non (adsorption et inclusion). Les IMERs peuvent être ensuite conditionnés en différents formats comme des cartouches, des embouts de pipette, des disques ou des colonnes.

II.2.2. Les techniques d'immobilisation non covalentes

II.2.2.1. L'adsorption

Dans le cas de l'adsorption, les enzymes sont retenues à la surface d'un support insoluble et inerte par l'établissement d'interactions secondaires entre les groupes fonctionnels de l'enzyme et du support. Ce sont en particulier des interactions hydrophobes ou électrostatiques. Cette immobilisation semble assurer une certaine mobilité conformationnelle à l'enzyme, ce qui permet de conserver les propriétés catalytiques des enzymes immobilisées. Cependant, les enzymes peuvent se désorber facilement selon les variations de leur environnement (pH, force ionique, température) [87]. Cette technique est donc peu appliquée pour l'immobilisation d'enzymes dédiées à la digestion de protéines.

II.2.2.2. Encapsulation dans un gel

L'inclusion dans un gel consiste à emprisonner l'enzyme dans les mailles du réseau d'une matrice polymérique comme un polymère inorganique de type sol-gel. Il n'y a aucun lien entre les enzymes et le polymère et donc peu de risque de dénaturation de l'enzyme. Cependant, les risques de relargage de l'enzyme ne sont pas négligeables si les mailles du réseau sont larges. D'autre part, si la réticulation est très importante, la cinétique de l'enzyme est ralentie par la diffusion du substrat et du produit. Cette méthode n'est donc pas adaptée à la digestion de protéines et est majoritairement appliquée pour des substrats et produits de faible masse moléculaire.

II.2.3. Les supports d'immobilisation covalente en formats conventionnels

II.2.3.1. Introduction

La méthode la plus utilisée pour l'immobilisation d'enzymes reste le greffage de l'enzyme par liaison covalente sur un support activé. Même si la liaison covalente peut limiter la mobilité conformationelle de l'enzyme, la très grande stabilité de la liaison entre l'enzyme et le support limite le relargage des enzymes, ce qui présente un grand avantage par rapport à l'adsorption ou l'encapsulation. Les réacteurs enzymatiques ont tout d'abord été développés en format conventionnel (colonnes de diamètre supérieur à 1 mm) en raison de leur facilité de remplissage par

le support immobilisé. Pour cette raison, les supports d'immobilisation utilisés en format conventionnel seront tout d'abord décrits.

Il existe une grande diversité de supports d'immobilisation dédiés au greffage d'enzymes par liaisons covalentes. Le choix du support va dépendre de la nature et du mécanisme de réaction pour immobiliser l'enzyme, de ses propriétés mécaniques et chimiques et des conditions d'utilisation du réacteur. La nature du support détermine également l'accessibilité des sites actifs ce qui influence l'activité enzymatique. Ainsi, la porosité, la taille des pores, le gonflement et les charges portées par le support sont des paramètres importants pour l'obtention d'un réacteur enzymatique performant. Les premiers supports d'immobilisation utilisés ont été les supports particulaires mais la difficulté pour miniaturiser ce type de support a conduit à la synthèse de réacteurs enzymatiques en tube ouvert et plus récemment à la synthèse de monolithes *in situ* dans les capillaires.

II.2.3.2. Digestion sur supports particulaires d'enzymes immobilisées

Le tableau II-2 présente les réacteurs d'enzymes immobilisées sur des supports particulaires dédiés à la digestion de protéines. Comme pour la digestion en solution, la trypsine reste l'enzyme de digestion la plus utilisée.

Support	E.	Format	Q_E (Ri)	Couplage analytique	Protéines	Matrice	Mode d'évaluation de l'efficacité de digestion	Paramètres optimisés	LDD	Ref.
-Sépharose NHS -Agarose (Pierce) -Poroszyme®	T.	Cartouche 10 x 1 ou 2mm d.i.	0,7 mmol.L^{-1} / /	LC (C_8, 0,25 x 1mm d.i.)-MS (IT) en différé	Cyt *c*, Myo.	Tampon	Observation du TIC et de la protéine non digérée	Influence de l'acétylation de la trypsine	/	[88]
Sépharose NHS	T.	Tube Eppendorf®, Pipette Tip	/	LC (C_8, 1 mm d.i.)-MS (Q et IT) en différé	Cyt *c* et BSA	Urine	Intensité de peptides spécifiques, Seq. Cov., nombre de peptide	Durée de digestion, format des IMERs	/	[89]
Sépharose NHS	T.	Colonne 10 x 2mm d.i.	0,7 mmol.L^{-1}	Affinité-IMER-TC (1ou 0,3mm d.i.)-LC (1mm ou 50µm d.i.)–MS (IT) en ligne	MMP	Urine	Seq. Cov. Aires de 3 peptides spécifiques.	Influence surfactant	2,5 nM (S/N)	[82]
Supports commerciaux d'enzymes immobilisées										
Agarose (Pierce) greffé	T.	Colonne 30cm x 1mm d.i.	/	LC (250µm d.i.) ou CE–UV en différé	β -caséine	Tampon	Obs.des pics en UV	/		[90]
Poroszyme®	T.	Colonne 30 x 2,1mm d.i.	/	IS–SCX–IMER-TC (Poros 508 µm d.i.) - LC (C18, 1mm d.i.)-MS(TQ) en ligne	Hémoglobine	Tampon	Obs. du TIC et protéine non digérée	Temps de digestion	/	[22]
Poroszyme®	T.	Colonne 30 x 2,1 mm d.i.	/	Affinité (10mm d.i.)–IMER-LC (2,1mm d.i .)-MS (TOF)–en ligne	Anticorps recombinant	Tampon	Seq. Cov.,	/	/	[72]
Poroszyme®	T.	Colonne 30 x 2,1 mm d.i.	/	SEC (4,6mm d.i.)-IMER-TC (2,1mm d.i)–LC (2,1mm d.i.)–MS (TQ, QTOF) en ligne	Myo, Toxine cholérique, SEB	Tampon	Suivi protéine non digérée, Seq. Cov.	Durée de digestion	LDD 12 µM	[76]
Poroszyme®	T.	Pipette Tip	/	MALDI-MS (TOF) en différé	BSA	Tampon	Seq. Cov.	/	/	[91]
StyrosZyme™	T.	Colonne 50 x 2,1mm d.i.	/	IS–IMER–TC (C18, 2mm d.i)–LC (C18, 2mm d.i.)–MS (IT) en ligne	BSA	Urine Plasma	Aire d'un peptide spécifique	Comparaison système total en différé en solution et en ligne sur IMER	LDD:170 nM, LDQ 280nm	[28]
Poroszyme®	P.	Colonne 30 x 2,1 mm d.i.	/	IMER–LC (C18, 1mm d.i.)–MS (QTOF) en ligne	HuBuChE	Tampon	Intensité d'un peptide spécifique	Durée de digestion	LDD 1,06 nL (S/N = 3)	[71]
Supports monolithiques d'enzymes immobilisées										
Chromolith-époxyde	T.	Colonne 25 x 4,6mm d.i.	66 mg (26 %)	IMER-TC (4,6mm d.i.)-LC (2,1mm d.i.)–MS (IT) en ligne	Myo.	Tampon	Seq. Cov. Taux hydrolyse, activité (BA*p*NA)	Débit, tampon, T°C de digestion…	6 µmol.L^{-1} (seq cov)	[77]
Chromolith-époxyde	T.	Colonne 25 x 4,6mm d.i.	"	IMER-TC (4,6mm d.i.)-LC (2,1mm d.i.)–MS (IT) en ligne	HSA, transthyrétine	Sérum	Seq. Cov.	Débit de digestion	0,45 mg.mL^{-1} (LDD seq. cov.)	[74]

-Chromolith–époxyde - Particules silice	T.	-25 x 4,6mm d.i. -150 x 4,6mm d.i.	Mono.:7mg (25,5%) Part. 33mg (25,5%)	IMER-TC (4,6mm)-LC (2,1mm)-MS (IT) en ligne	HSA, Somatropine	Tampon	Activité enzymatique (BAEE), Seq. Cov.	Comparaison Part. Mono. Qté de T. sur monolithe	/	[78]
Mono. et Part. poly(GMA-EDMA) glutarald.	T.	Colonne 50 x 8mm d.i.	Part. : 9mg Mono. : 6mg	IMER–LC (3,9mm d.i.)-UV en ligne	Cyt *c*	Tampon	Obs. des peptides sur chromatogramme (UV) Activité (BAEE),	Débit de digestion Comparaison Part. Mono.		[67]
CIM® activés époxyde, EDA ou CDI	T.	Disques : 12 mm diamètre, 3mm épaisseur	- 0,9 ; 1,1 ; 1,5 mg (36 ; 44 ; 60 %)	IMER–TC (C18, 4mm d.i.)–LC (2,1mm d.i.)–MS (IT) en ligne	BSA, Myo, Ova, AGP, Cytc	Tampon	Seq. Cov. Activité (BAEE),	Débit de digestion	/	[80]
CIM® activés EDA Poroszyme®	T.	-3 x 12mm disque -2 x 6mm mini -30 x 2,1mm i.d.	-1,1mg 44% -0,67mg 79% - /	IMER–TC (C18, 2,1mm d.i.)–LC (2,1mm d.i.)–MS (IT) en ligne	BSA, Myo, Ova, AGP, Cytc	Tampon	Seq. Cov.	/	0,1 µmol.L^{-1} (seq cov)	[79]

E. : Enzyme, T : trypsine, P : pepsine. Q_E : quantité d'enzymes réellement immobilisées, Ri : rendement d'immobilisation. LC : chromatographie liquide, MS : spectrométrie de masse. CE : électrophorèse capillaire, Q : Quadripôle, TQ : Triple quadripôle, TOF : Temps de vol, Q-TOF : Quadripôle à temps de vol, IT : Piège à ions, Q-TRAP : hybride triple quadripôle, trappe d'ions linéaire. TC : colonne de piégeage, IMER : réacteur d'enzymes immobilisées, IMAC : chromatographie d'affinité sur ions métalliques immobilisés, SEC : chromatographie d'exclusion stérique, SCX : supports échangeur de cations forts, IS : Immunoadsorbant. CPG : « Controlled Pore Glass », NHS : N-hydroxysuccinimide, CDI : carbonyldiimidazole, EDTA : Ethylène diamine tétraacétique, $CaCl_2$: chlorure de calcium, NaCl : chlorure de sodium, MeOH : méthanol, MeCN : acétonitrile, iPr : isopropanol. Cyt c : cytochrome *c*, IGF-1 : facteur de croissance, HSA, BSA : albumine de sérum humain, bovin, Ova : Ovalbumine, MMP : métalloprotéases matricielles, Myo : myoglobine, SEB :Entérotoxine staphylococcique, HuBuChE : butyryl-cholinestérase humaine. Seq. Cov. : Recouvrement de séquence, LDD : limite de détection, LDQ : limite de quantification. BApNA : Benzoyl arginine p-nitroanilide, BAEE : benzoyl arginine ethyl ester.

Tableau II-2 : Liste des supports particulaires en formats conventionnels immobilisés par des enzymes.

(i) Supports d'immobilisation

Comme pour les anticorps, de nombreux supports d'immobilisation d'enzymes sont à base de silice [78], d'agarose, notamment de Sépharose. Les différentes activations des supports décrites précédemment pour les anticorps (figure II-7) sont aussi utilisées pour le greffage d'enzymes. En effet, comme pour les anticorps, la liaison covalente entre le support et l'enzyme a lieu majoritairement avec les fonctions amine primaires de l'enzyme à immobiliser.

De nombreuses études portent sur l'immobilisation d'enzymes sur des supports tels que l'agarose [92,93], la Sépharose activée N-hydroxysuccinimide (NHS) [82,88,89] ou la Sépharose activée par du bromure de cyanogène (CNBr) [93,94]. Certains ont permis la digestion de protéines comme le cytochrome *c* [88,89], la myoglobine [88], la BSA [89], les métalloprotéases matricielles [82]. Des billes d'agarose greffées par de la trypsine [88,90] ou de la pepsine [81,95] destinées à la digestion de protéines sont également disponibles commercialement.

Les supports à base de polymère organique ont également été utilisés. Ils ont l'avantage d'être compatibles avec des solutions basiques tout en présentant une bien meilleure stabilité mécanique que les gels. Le support commercial Poros® (PerSeptive Biosystems Inc.) a d'ailleurs été largement utilisé. Il consiste en des particules de polymère organique de polystyrène-divinylbenzène (PS-DVB) avec une distribution de pores bimodale. Ce support existe commercialement greffé par de la trypsine, Poroszyme® tel quel ou directement conditionné en précolonne (30 x 2.1 mm d.i.). Comme le montre le tableau II-2, de nombreuses études portent sur la mise au point d'une méthode de digestion sur ce support et dans la plupart des cas sur le développement d'une digestion en ligne couplée à l'analyse par chromatographie liquide et spectrométrie de masse. En général, 5 % de méthanol ou d'acétonitrile est recommandé pour réduire les interactions des peptides hydrophobes sur le support Poroszyme® [70,75,91] mais aucun travaux n'a porté sur la réelle évaluation des interactions non spécifiques sur ce support. Un autre support commercial similaire est disponible chez Orachrom, la colonne StyrosZyme™ [28].

D'autres polymères ont été utilisés pour l'immobilisation d'enzymes. Par exemple, de la trypsine a été immobilisée sur des particules poreuses à base de méthacrylate de glycidyle (GMA-EDMA) non modifiées et sur des particules modifiées par différents polymères hydrophiles [96]. Dans cette étude, bien que la quantité d'enzymes immobilisées soit bien plus grande sur les particules non modifiées, ces dernières montrent une perte d'activité enzymatique significative par rapport au support modifié hydrophile. Cette perte d'activité peut s'expliquer par un changement conformationnel de l'enzyme lié à son immobilisation. De plus, 50 % de la quantité d'enzymes

immobilisées sur le support non modifié est en fait retenu physiquement sur le support par des interactions non covalentes hydrophobes.

Quelques études, peu nombreuses, portent sur l'utilisation de supports de pepsine immobilisée pour l'analyse des protéines [71]. La plupart des études concernent en fait les techniques d'échanges deutérium/hydrogène pour l'étude de la dynamique de protéines [81,97,98].

Le choix du support d'immobilisation est donc primordial pour la réalisation d'un réacteur performant notamment en limitant le développement d'interactions non spécifiques par l'utilisation d'un support relativement hydrophile.

(ii) Taux de greffage

Parmi les IMERs utilisés pour la digestion des protéines, la majorité sont préparés avec des supports immobilisés commerciaux et dont la quantité d'enzyme n'est pas connue. Seule une étude mentionne la concentration de trypsine réellement immobilisée sur un support de Sépharose activé NHS [88]. La mesure du surnageant avant et après immobilisation indique que 0,7 $mmol.L^{-1}$ de trypsine sont réellement immobilisées sur le support par rapport à 20 $mg.mL^{-1}$ de trypsine incubée, ce qui équivaut à un taux de greffage de 83 %. Cependant, cette quantité n'a pas été optimisée et aucune comparaison avec d'autres supports d'immobilisation n'a été effectuée.

(iii) Conditions de digestion

L'immobilisation des enzymes affecte les propriétés cinétiques. En effet, à la vitesse de réaction proprement dite, il faut ajouter l'effet du microenvironnement qui conditionne l'activité catalytique. Il est donc important de vérifier si les conditions optimales de digestion en solution sont identiques pour les enzymes immobilisées.

a) Température de digestion

Comme pour la digestion en solution, l'augmentation de la température de digestion améliore l'efficacité de digestion [22,89]. La température de digestion sur trypsine immobilisée la plus utilisée est 37 °C [22,28,72,89].

b) Tampon de digestion

La plupart des applications de digestion de protéines se faisant avec la trypsine, la digestion se fait en milieu tamponné à pH neutre voire légèrement basique. Les conditions de digestion utilisées sont très similaires à celles utilisées pour la digestion en solution. Dans toutes les études citées ci-dessus, il est admis qu'un pH de l'ordre de 7-8 est optimal pour la digestion à la trypsine.

Parmi les tampons utilisés, on peut citer le bicarbonate d'ammonium pH 8 [70,72,89-91], le tampon Tris pH 8–8,5 [67,73,76,82,88,99], l'acétate d'ammonium pH 6,7 – 8,75 [22] et le tampon phosphate pH 7 [78]. De plus, comme dans le cas de la digestion en solution, du calcium est généralement ajouté au milieu de digestion [73,76,99] pour améliorer l'efficacité de digestion en stabilisant l'enzyme et donc en inhibant le phénomène d'autolyse [100]. Comme précédemment mentionné, quelques études utilisent des tampons de digestion contenant 5 % de solvant organique pour prévenir des interactions non spécifiques avec la Poroszyme®.

En ce qui concerne la digestion par la pepsine, les conditions de digestion sont acides puisque le pH optimum de digestion de la pepsine est de l'ordre de pH 1-3. Dans le cas des réacteurs de pepsine immobilisée, on trouve des tampons acétate d'ammonium acidifié (pH de l'ordre de 2) [81] ou l'acide formique seul à pH 2 [71]. En effet, la pepsine est plus sensible à la présence de solvant organique que la trypsine, leur ajout dans le tampon de digestion dénaturerait irréversiblement la pepsine [68].

c) Débit et durée de digestion

Comme pour la digestion en solution, l'efficacité de digestion dépend de la quantité d'enzyme utilisée (E) et du temps de contact entre l'enzyme protéolytique et le substrat (S). Plus le temps de contact est long et dans certains cas, plus le rapport E/S est élevé, plus la protéine est digérée. En effet, la vitesse de la réaction enzymatique est proportionnelle à la quantité d'enzyme. La quantité d'enzyme pouvant être utilisée sans risquer l'autolyse importante de la trypsine dans le cas des IMERs étant beaucoup plus grande que pour la digestion en solution, la cinétique de digestion est bien plus rapide et peut durer quelques minutes contre quelques heures en solution. D'une façon générale, quelques minutes suffisent pour la digestion sur des IMERs alors que plusieurs heures sont nécessaires en solution.

Afin d'améliorer l'efficacité de digestion sur les IMERs, la durée de digestion peut être augmentée en diminuant le débit ou en arrêtant le débit (« stop-flow ») de manière à laisser la protéine en contact avec l'enzyme pendant un temps donné. Les débits utilisés ainsi que les temps de contact dépendent de nombreux paramètres tels que la protéine elle-même, la quantité de protéine, la quantité d'enzymes immobilisées et l'accessibilité de ces enzymes pour laquelle le support d'immobilisation joue un rôle primordial. Différents débits peuvent donc être utilisés selon les applications. Une étude préliminaire est souvent effectuée afin d'optimiser la durée de digestion. A titre d'exemples, deux études ont porté sur l'observation de l'influence du temps de contact des protéines au niveau de la colonne de trypsine commercial Poroszyme® (30 x 2, mm d.i.). Dans la première, différents débits de 3 $mL.min^{-1}$ à 3 $\mu L.min^{-1}$ correspondant à des durées de digestion entre

0,6 secondes et 10 minutes ont été appliqués à la digestion de l'hémoglobine [22]. La digestion quasi complète de l'hémoglobine est observée sur le courant ionique total avec un temps de digestion de 10 minutes entre l'enzyme et la protéine. Dans la seconde étude, la digestion de la myoglobine est effectuée en « stop-flow » sur une même colonne de trypsine Poroszyme® [76]. Ainsi, la protéine a été digérée durant 5 à 60 minutes et, en observant l'intensité du pic de la protéine non digérée, une durée de digestion optimale de 20 minutes a été choisie. Ces différents résultats obtenus confirment bien que la durée de digestion appliquée est dépendante de la protéine à digérer, ce qui rend difficile l'application de l'IMER à un mélange de protéines.

(iv) Mode d'évaluation de l'efficacité de digestion

Afin d'évaluer l'efficacité de digestion, la plupart des études se base sur le recouvrement de séquence et/ou le nombre de peptides détectés appartenant à la protéine d'intérêt. Ainsi, après comparaison des recouvrements de séquence obtenus par digestion en solution et par un support de Sépharose NHS, des résultats similaires ont été obtenus [89]. Les peptides observés et le nombre de site de coupure manqués sont eux aussi similaires dans les deux cas mais les variations d'intensité des peptides observées entre les deux modes de digestion indiquent des différences non révélées par le recouvrement de séquence.

En effet, le recouvrement de séquence indique effectivement s'il y a eu digestion ou pas mais ne permet cependant pas d'estimer quantitativement la proportion de protéine réellement digérée. Un moyen de l'évaluer consiste à observer la présence ou non de la protéine intacte, c'est-à-dire non digérée [76,89]. Ainsi, après la digestion de cytochrome *c* durant 5 minutes sur l'IMER de trypsine à base de Sépharose NHS cité ci-dessus, aucun pic correspondant à la protéine non digérée n'est observé contrairement à ce qui est observé après 4 heures de digestion en solution [89]. De plus, rares sont les études où la répétabilité du recouvrement de séquence est indiquée et on peut noter qu'un coefficient de variation de 48 % a été obtenu pour les recouvrements de séquence obtenus après digestion en ligne sur un IMER de trypsine immobilisée sur des particules de silice activées époxyde [78].

Afin d'étudier l'efficacité de digestion, une autre méthode consiste à observer les intensités d'un ou plusieurs pics correspondant à des peptides spécifiques de la protéine étudiée. Cet outil a par exemple été utilisé pour l'optimisation d'une procédure de digestion [82,89]. L'intensité d'un peptide spécifique de la protéine butyrylcholinérase humaine (HuBuChE) a été observé pour comparer la digestion en solution par rapport à la digestion sur IMER et l'intensité du pic obtenu pour la digestion en solution correspond à 70 % de celui obtenu après la digestion sur la

Poroszyme® de pepsine confirmant les performances de l'IMER et du protocole de digestion [71]. Dans cette étude, l'aire du peptide a montré une bonne répétabilité avec un coefficient de variation 10 %. Dans une autre étude, 5 peptides spécifiques de la BSA ont été choisis pour estimer la répétabilité du système d'analyse total par chromatographie d'exclusion stérique (SEC) couplée à une IMER et une analyse par LC/MS mis au point et des coefficients de variation entre 13 et 21 % ont été obtenus pour les aires de ces peptides [76]. Malgré cette répétabilité moyenne, probablement liée à la complexité du système mis au point, il peut être intéressant de développer une méthode de quantification à partir des réponses de peptides spécifiques. Pour cela, des quantités croissantes de protéines peuvent être digérées sur l'IMER et les réponses observées. Ainsi, seule une étude a montré la possibilité de quantifier la BSA à partir d'un peptide spécifique dont l'aire obtenue croît de façon linéaire avec la quantité de protéine injectée entre 170 nmol.L^{-1} et 15 µmol.L^{-1} [28].

(v) Application à un échantillon biologique

Comme indiqué sur le tableau II-2, la majorité des IMERs (75 %) ont été appliqués à la digestion de protéines dans des échantillons purs. Toutefois, une étude a porté sur la digestion d'un échantillon d'urine humaine dopé par de la BSA [89]. Les intensités de 12 peptides spécifiques ont été comparées à celles obtenues après digestion d'un tampon dopé par la même quantité de BSA. Les peptides montrent des comportements différents, certains peptides ont des intensités plus faibles alors que d'autres ont des intensités plus élevées après digestion dans l'urine. La répétabilité ayant été vérifiée, ce résultat peut être expliqué par une différence de cinétique de digestion dans l'urine comparée à un tampon liée à la différence de composition des matrices. Cependant, la cause de ces variations est sûrement liée à des co-élutions d'interférents présents dans l'urine induisant une suppression du signal de certains peptides.

(vi) Conclusion

En conclusion, l'utilisation d'IMERs a permis de réduire le temps de digestion de quelques minutes contre plusieurs heures avec la digestion en solution. D'une façon générale, l'ensemble des travaux répertoriés dans le tableau II-2 pour des IMERs en format conventionnel sont plus des études qualitatives que quantitatives. De plus, peu d'applications en milieu réel ont été réalisées. Il a été démontré que la durée de digestion dépendait de la protéine mais également des phénomènes de diffusion qui limitent l'accès du substrat au niveau du site enzymatique et donc du support. Afin d'améliorer la diffusion des protéines et des peptides au sein support et donc de réduire le temps de digestion, des supports monolithiques ont été développés.

II.2.3.3. Les supports monolithiques en format conventionnel

Comme décrite au chapitre I, un monolithe a une structure poreuse bimodale assurant une grande perméabilité et un transfert de masse rapide. Le transfert du substrat vers les sites catalytiques est donc facilité, ce qui réduit le temps de digestion. Les supports monolithiques peuvent être classés en deux catégories, les supports inorganiques à base de silice et les monolithes à base de polymères organiques. Les réacteurs enzymatiques monolithiques décrits ci-dessous et leurs applications sont aussi répertoriés dans le tableau II-2.

(i) Les monolithes inorganiques

L'équipe de Massolini a mis au point une immobilisation covalente de la trypsine sur un support monolithique commercial à base de silice activée par des groupements époxyde, la colonne Chromolith ® Flash (25 x 4.6 mm d.i.) (Merck) [74,77].

Dans une première étude, une colonne a été immobilisée par une solution de greffage contenant 250 mg de trypsine. La quantité de trypsine réellement immobilisée a été calculée par mesure de la solution de greffage avant et après immobilisation et 66 mg de trypsine ont été immobilisés, ce qui équivaut à un taux de greffage de 26,4 %. Cet IMER de trypsine a été caractérisé à l'aide d'un substrat chromophore le N-α-benzoyl-arginine-*p*-nitroanilide (BA*p*NA) qui donne, après hydrolyse à la trypsine, le produit détectable par absorption UV, le *p*-nitroaniline (*p*-NA) [77]. Ainsi cette étude a permis de calculer le taux d'hydrolyse (H %) correspondant à l'aire du pic du produit *p*-NA après hydrolyse ($A_{p\text{-NApr}}$) sur l'aire du pic d'une solution standard de *p*-NA à la même concentration avant hydrolyse ($A_{p\text{-NAst}}$).

$$H(\%) = \frac{A_{p-NApr}}{A_{p-NAst}} x100$$

Dans cette étude, les conditions de digestion comme la concentration en tampon de digestion ont été optimisées pour l'estimation de ce taux d'hydrolyse. Ainsi, comme pour la digestion en solution ou sur supports particulaires, il est observé qu'une température de 37°C permet un taux de digestion plus élevée par rapport à une digestion à 25°C et que les plus grandes concentrations en sels dans le tampon de digestion améliorent l'affinité du substrat pour le site catalytique et donc le taux de digestion. L'influence du débit de la digestion sur le taux d'hydrolyse H % a aussi été étudiée sur la colonne Chromolith® Flash (25 x 4.6 mm d.i.) greffée. En variant le débit de 0,5 à 3 $mL.min^{-1}$, c'est-à-dire en diminuant le temps de contact de 8 à 1,8 minutes, le rendement

d'hydrolyse chute de 20 % à 3 %, démontrant à nouveau l'importance de la durée de digestion. La digestion de la myoglobine en 5 minutes sur ce support a montré des résultats très similaires à la digestion en solution en termes de recouvrement de séquence et du nombre de peptide détectés. Cependant, un plus grand nombre de ruptures manquées sont présentes dans le cas de la digestion sur l'IMER. Dans cette étude, la sensibilité de l'analyse a été déterminée comme étant la limite de concentration en-dessous de laquelle aucune reconnaissance de la protéine n'a pu être donnée par les banques de données, estimée ici à 0,1 $mg.mL^{-1}$ c'est-à-dire 6 $\mu mol.L^{-1}$ de myoglobine.

Dans une autre étude, le même support Chromolith® Flash (25 x 4.6 mm d.i.) immobilisé par la trypsine a été utilisé pour la digestion de l'albumine de sérum humaine (HSA) et un débit optimum de 0,5 $mL.min^{-1}$ correspondant à un temps de digestion de 10 minutes a été choisi en comparant les recouvrements de séquence pour différents débits [74]. De nouveau, ce résultat confirme que la durée de digestion est bien dépendante de la protéine à digérer puisque seules 5 minutes suffisaient pour obtenir un recouvrement de séquence maximal de la myoglobine sur ce même IMER pour des concentrations protéiques similaires. L'intérêt de cette étude est son application à l'analyse de la tranthyrétine dans du sérum humain après élimination de l'albumine par déplétion. La protéine a bien été reconnue par les banques de données mais l'étude n'a pas permis d'évaluer les effets de matrice ou encore de quantifier la protéine.

La même équipe a ensuite optimisé la quantité de trypsine immobilisée sur ce support monolithique [78]. Ainsi, différentes quantités de trypsine variant entre 5 et 250 mg dans la solution de couplage ont été immobilisées sur la colonne Chromolith ® Flash (25 x 4.6 mm d.i.). Après mesure de la quantité de trypsine réellement immobilisée (entre 0,1 et 66 mg), les IMERs ont été caractérisés en mesurant l'activité de l'enzyme à l'aide du substrat N-α-benzoyl-arginine-éthyl ester (BAEE) et en comparant les recouvrements de séquence obtenus pour la digestion de l'HSA. Comme attendu, une augmentation de l'activité enzymatique a été observée en augmentant la quantité d'enzymes immobilisées (E) (entre 0,1 et 7 mg de trypsine) pour une quantité de substrat constante. En effet, l'augmentation de la quantité d'enzyme dans la gamme 0,1 à 7 mg et donc du rapport E/S augmente la cinétique de réaction. Cependant, à partir de 7 mg de trypsine immobilisée, l'activité enzymatique diminue et il en est de même pour le recouvrement de séquence. Ce phénomène peut être interprété par une densité trop importante gênant l'accès au site actif ou par une agrégation et/ou une dénaturation des enzymes avant ou après l'immobilisation. Un compromis doit donc être trouvé pour la quantité d'enzyme à immobiliser afin d'obtenir une efficacité de digestion optimale. Ce support optimisé a ensuite été comparé avec un support particulaire de silice activée époxyde greffé par de la trypsine et conditionné dans une colonne plus longue de dimension 150 x 4,6 mm d.i. Comme attendu, une perte de charge beaucoup plus élevée a été observée pour les

supports particulaires limitant le débit maximal de digestion. En première approximation, les deux IMERs ont des densités de greffage similaires (33 mg de trypsine pour l'IMER de 150 x 4,6 mm d.i . dans le cas du support particulaire et 7 mg de trypsine pour l'IMER de 15 x 4,6 mm d.i. dans le cas du support monolithique). Toutefois, l'activité enzymatique obtenue dans le cas du support particulaire s'est révélée bien inférieure à celle obtenue avec le support monolithique. De plus, le recouvrement de séquence obtenu pour la digestion de HSA pendant 20 minutes est de 20 % sur le support particulaire contre 70 % pour le monolithe. Ce résultat peut être expliqué par un transfert de masse plus lent sur le support particulaire mais également par une meilleure accessibilité au site catalytique de l'enzyme pour le support monolithique. Ce dernier semble donc être plus performant que le support particulaire. A cet effet, il a ensuite été appliqué à la digestion d'une hormone de croissance, la somatropine dans un échantillon pur. Les auteurs précisent également qu'une baisse d'activité de seulement 14 % a été observée après 9 mois d'utilisation, conférant à l'IMER une grande robustesse.

Finalement, cette équipe a mis au point un réacteur de trypsine immobilisée sur un monolithe de silice ayant montré de bonnes performances pour différentes protéines. Les mesures d'activité enzymatique ont permis d'optimiser l'IMER et de comparer les performances avec un support particulaire. Cependant, l'application en échantillon réel développée ne donne pas d'information sur les effets de matrice possible. De plus, ces supports commerciaux sont disponibles en une seule dimension, de taille assez importante, ce qui limite le couplage à des systèmes miniaturisés.

(ii) Les monolithes organiques

Comme décrit précédemment, les monolithes à base de polymères organiques sont très stables chimiquement et présentent une bonne compatibilité avec les biomolécules. De plus leur préparation est simple et directe. Elle fait intervenir différents monomères, un agent initiateur, un agent réticulant, un solvant porogène et une exposition à la lumière UV ou à la chaleur pour initier la polymérisation. Le plus souvent, l'immobilisation de l'enzyme se fait par liaison covalente par un groupement fonctionnel présent dans la structure du monolithe. La méthode la plus décrite est l'utilisation du monomère glycidylméthacrylate (GMA) comportant une fonction époxyde en combinaison avec le monomère éthylène diméthacrylate (EDMA) qui assure la réticulation du polymère. Les monolithes ainsi synthétisés sont dits à base de poly(glycidyl méthacrylate-co-ethylène diméthacrylate) ou poly(GMA-EDMA).

Petro *et al.* ont comparé deux supports immobilisés par la trypsine à base de poly(GMA-EDMA), conditionnés dans deux précolonnes de même dimension (50 x 8 mm d.i.) : l'un sous forme de monolithe synthétisé *in situ* et l'autre sous forme de particules de 10 µm [67]. L'immobilisation de l'enzyme a été réalisée par greffage covalent en activant la fonction époxyde du support par du glutaralédéhyde.

Dans cette étude, les quantités de trypsine réellement immobilisées sur chacun des deux supports ont été estimées. Concernant le support particulaire, 9 mg de trypsine ont été immobilisés pour 6 mg sur le support monolithique. Ces réacteurs ont été appliqués, dans un premier temps, à la digestion d'un petit substrat détectable en UV, le BAEE. Les activités enzymatiques de ces deux supports sont similaires et ce malgré la différence de quantité de trypsine immobilisée, inférieure dans le cas du monolithe. Malheureusement, aucune étude n'a été effectuée afin d'optimiser la quantité de trypsine et de vérifier si des performances analogues étaient obtenues avec des quantités de trypsine immobilisée identiques pour les deux supports. De nouveau, la grande perméabilité du support monolithique a permis de générer une perte de charge bien inférieure au support particulaire, mais également une réelle augmentation de l'activité enzymatique aux débits plus élevés. La comparaison est cependant restée qualitative lorsque ces IMERs ont été appliqués à la digestion en ligne du cytochrome *c* couplée à l'analyse LC-UV. En effet, le chromatogramme UV a montré une multitude de pics correspondant à plusieurs peptides indiquant que la protéine a bien été digérée. Toutefois, la détection par UV n'a pas permis l'identification des peptides et de la protéine et seule une observation visuelle du chromatogramme a permis de constater que le nombre de pics obtenu était supérieur dans le cas d'une digestion sur l'IMER monolithique par rapport à la digestion sur le support particulaire greffé ou même par rapport à la digestion en solution.

Un support monolithique commercial CIM® (*Convective Interaction Media*) (Bia Separations) à base de poly(GMA-EDMA) conditionné sous forme de disques (12 mm de diamètre et 3 mm d'épaisseur) est actuellement disponible commercialement. Ce support a été étudié comme support d'immobilisation de la trypsine [80]. Trois types d'immobilisation ont été évalués. La première a consisté à faire réagir directement la fonction époxyde avec une fonction amine de l'enzyme. Pour les deux autres, une activation de la fonction époxyde par du carbonylediimidazole (CDI) et du glutaraldhéyde (*via* une activation à l'éthylènediamine (EDA)) a été réalisée avant l'immobilisation de la trypsine[80]. Tout d'abord, la quantité de trypsine réellement immobilisée sur chaque support a été mesurée et les activités enzymatiques ont été étudiées à l'aide du substrat BAEE. Malgré la plus grande quantité d'enzymes immobilisées sur le support activé CDI, son activité enzymatique obtenue s'est révélée bien inférieure à celle obtenue pour les deux autres supports. Ce résultat est expliqué par les auteurs par le protocole d'immobilisation réalisé à pH 8,

menant à un plus fort degré d'autolyse de la trypsine que le protocole réalisé à pH 3 dans le cas du support EDA (glutaraldéhyde). Dans le cas du support activé époxyde, même si l'immobilisation a été réalisée à pH 8, 50 mmol.L^{-1} de benzamidine ont été ajoutés pour prévenir de cette autodigestion. Les trois réacteurs ont ensuite été appliqués à la digestion séparée de la BSA, la myoglobine, l'ovalbumine, une glycoprotéine et le cytochrome *c* (5 minutes, 0,4 mL.min^{-1}) et couplée en ligne à la LC-MS. Par comparaison des 3 IMERs, les meilleurs recouvrements de séquence ont été obtenus pour le support activé glutaraldéhyde avec des résultats très similaires à ceux obtenus après des digestions en solution. L'activation par du glutaraldéhyde précédée par une activation à l'EDA a créé en fait un bras espaceur entre le support et les enzymes immobilisées qui a probablement contribué à de meilleures performances. En termes de répétabilité, elle a été estimée à partir des recouvrements de séquence et, pour ce support ainsi que pour le support activé époxyde, des coefficients de variation de l'ordre de 7 % ont été observés, révélant une bonne répétabilité de digestion. En revanche, le support activé CDI a montré un coefficient de variation de recouvrement de séquence de 36 %. Par ailleurs, la stabilité de l'IMER activé glutaraldéhyde a été estimée sur 6 mois d'utilisation continue et les recouvrements de séquence obtenus sur cette période ne varient que de 10 %, ce qui indique une très bonne stabilité de l'IMER.

Le support à base de glutaraldéhyde a ensuite été utilisé en format minidisque (6 mm de diamètre et 2 mm d'épaisseur) pour l'immobilisation de la trypsine et appliqué à la digestion des mêmes protéines [79]. Le minidisque développé présente des meilleures performances en termes de recouvrement de séquence que le même support de plus grand format (disque). En effet, le taux de greffage étant de 79 % sur le minidisque contre 44 % sur le disque, le rapport enzyme / support est bien supérieur pour le minidisque. De nouveau, l'étude est restée qualitative car le recouvrement de séquence ne permet pas de quantifier les protéines. De plus, compte tenu de la relative hydrophobie du support d'immobilisation de poly(GMA-co-EDMA), l'évaluation des interactions non spécifiques éventuelles mériterait d'être réalisée.

(iii) Conclusion

Les monolithes en format conventionnel ont fait l'objet d'études approfondies en termes de rendement de greffage, d'optimisation de la quantité d'enzymes et d'évaluation des performances par rapport aux supports particulaires. De plus, ces études mentionnent la stabilité des réacteurs enzymatiques développés. Toutefois, les protéines analysées ont été caractérisées par le recouvrement de séquence qui reste un outil qualitatif. De plus, une application à un échantillon réel a été effectuée, mais les effets de matrice possibles n'ont pas été évalués. Enfin, dans le cas des

support commerciaux, seuls des colonnes d'assez grand diamètre (4,6 mm) pour le monolithe à base de silice ou les formats disques et minidisques pour le monolithe à base de poly(GMA-EDMA) sont disponibles, ce qui ne permet pas leur utilisation en systèmes miniaturisés.

II.2.4. Les IMERs en formats miniaturisés

Ces dernières années, de nombreux travaux ont porté sur la miniaturisation du dispositif analytique avec pour objectif non seulement la miniaturisation de la séparation et de la détection mais aussi la miniaturisation de l'étape de traitement d'échantillon. La miniaturisation des réacteurs enzymatiques a donc connu un véritable essor.

II.2.4.1. Supports particulaires

Les IMERs miniaturisés peuvent être préparés par remplissage du support particulaire immobilisé dans des capillaires. Cependant, les dimensions des systèmes de remplissage existants limitent le diamètre minimum du capillaire à 150 µm. En effet, cette technique nécessite des frittés pour maintenir le lit de particules dans le capillaire et le faible diamètre interne des capillaires rend difficile l'utilisation de la même configuration de frittés que pour les formats conventionnels. Quelques IMERs dans des capillaires de diamètre entre 150 et 500 µm ont été développés et sont résumés dans le tableau II-3.

Support	E.	Format	Couplage analytique	Protéines	Mode d'évaluation de l'efficacité de digestion	Paramètres optimisés	Réf.
silice activée CDI	T	Capillaire 20 cm x 320µm d.i.	LC (250µm d.i.)-MS (Q) en différé	Cyt c, Hémoglobine	Nombre de peptides	débit, T°C	[101]
CPG greffé	T	Capillaire 30 cm x 530µm d.i.	CE-UV en différé	β-caséine, insuline chaîne β	Carte peptidique (chromatogramme)	Débit, stabilité	[102]
CPG activé glutaraldéhyde	T	Capillaire 5 cm x 500 µm d.i.	SEC-IMER-LC (4,6 mm d.i.)-UV en ligne	Myo, BSA	Carte peptidique (chromatogramme)	Débit, Stabilité	[103]
Poroszyme®	T	Capillaire 200µm d.i. x 25 ou 190mm	LC (C_4 150µm d.i.)–IMER–QTRAP en ligne	Cyt c, Myo., Ova, Anhydrase carbonique	1 peptide spécifique	pH, force ionique	[66]
Poroszyme®	T	Capillaire en PEEK 50 x 0,5 mm d.i.	IMER–TC (0,2 mm d.i.)–LC (0,3mm d.i.)-MS (Q) en ligne	Lactate déshydrogénase	Séq. Cov.	/	[75]
Poroszyme®	T	Capillaire 25 x 150µm d.i.	MALDI-MS (TOF) en différé	Myo., Transferrine	Seq. Cov. protéine non digérée	Débit	[104]

E. : Enzyme, T : trypsine, P : pepsine. LC : chromatographie liquide, MS : spectrométrie de masse. CE : électrophorèse capillaire, Q : Quadripôle, TOF : Temps de vol, Q-TRAP : hybride triple quadripôle, trappe d'ions linéaire. TC : colonne de piégeage, IMER : réacteur d'enzymes immobilisées, SEC : chromatographie d'exclusion stérique, CPG : « Controlled Pore Glass », CDI : carbonyldiimidazole, Cyt c : cytochrome *c*, BSA : albumine de sérum bovin, Ova : Ovalbumine, Myo : myoglobine, Seq. Cov. : Recouvrement de séquence.

Tableau II-3 : Liste des supports particulaires en formats miniaturisés immobilisés par des enzymes.

A titre d'exemple, des capillaires de 150 µm à 500 µm ont été remplis par la phase Poroszyme® précédemment décrite [66,75,104]. Des supports à base de silice activée glutaraldéhyde [105] ou à base de silice carbonyldiimidazole (CDI) [101] ont également été développés dans une puce et une colonne capillaire respectivement. Cependant, Davis *et al.* ont montré qu'après digestion du cytochrome *c* par de la trypsine immobilisée sur un support de silice activée CDI, seulement 50 à 60 % de la quantité initiale de protéine injectée était retrouvée en raison de l'adsorption non spécifique de la protéine sur le support [101]. Cette estimation a été faite par détection UV en comparaison d'un digestat standard et d'une digestion sur le réacteur enzymatique. D'autres supports solides à base de silice ont été utilisés comme le verre à porosité contrôlée (« *Controlled Pore Glass* », CPG) activé diisothiocyanate [102,106] ou glutaraldéhyde [103] et ont été intégrés dans des capillaires. De nouveau, tous ces IMERs développés ont été appliqués à des échantillons purs sans aucune méthode de quantification utilisée.

Dans la plupart des études citées ci-dessus, des frittés commerciaux sont utilisés, le format du réacteur enzymatique est donc tributaire de ces frittés. Ceux-ci peuvent être synthétisés *in situ,* ce qui permet de minimiser les effets dispersifs extra-colonne, mais quelle que soit la technique utilisée, la fabrication de frittés est laborieuse et peu reproductible. Pour ces raisons, peu d'études ont fabriqué leur fritté *in situ* [105]. A cet effet, les phases à tube ouvert ou colonnes non remplies représentent une alternative aux phases particulaires en s'affranchissant de l'utilisation de frittés.

II.2.4.2. Les phases à tube ouvert

Les phases à tube ouvert se présentent sous la forme d'un capillaire de faible diamètre (50-75 µm) dont la paroi interne est greffée par les enzymes ou recouverte par une fine couche de phase stationnaire sur laquelle sont immobilisées les enzymes. Ces phases ont été développées comme alternative aux phases particulaires. Toutefois, il n'y a que très peu d'applications utilisant ces phases pour la digestion de protéines. Différents supports et différents types d'immobilisation ont été testés et sont décrits ci-dessous.

(i) Approche non covalente

L'immobilisation de l'enzyme sur la paroi du capillaire peut s'effectuer par immobilisation non covalente. L'équipe de Kuhr a ainsi développé un réacteur enzymatique de trypsine dans un capillaire de silice de 50 µm de diamètre *via* l'interaction biotine-avidine [107,108]. Pour ce faire, après traitement du capillaire par du (3-aminopropyl)triéthoxysilane, la biotine fonctionnalisée par

du NHS se lie chimiquement aux fonctions amine de la paroi du capillaire activé. Puis, l'avidine est ajouté pour se lier par affinité avec la biotine du capillaire. Enfin, la trypsine fonctionnalisée par de la biotine est immobilisée par affinité avec l'avidine. Ce réacteur couplé en ligne à l'analyse par CE/MS a montré une bonne efficacité pour la digestion de protéines telles que la β-caséine, l'insuline chaine β, l'hémoglobine, la myoglobine et le cytochrome *c* puisqu'un grand nombre de peptides a été observé [107,108].

Un autre exemple d'immobilisation non covalente est l'immobilisation de la pepsine par simple adsorption sur un capillaire en PEEK directement connecté à la source électrospray d'un spectromètre de masse [62]. Ce réacteur a été utilisé pour la digestion de diverses protéines de masse moléculaire comprise entre 14 kDa et 66 kDa comme la myoglobine, l'hémoglobine, le lysozyme et la BSA. Dans ces conditions, aucun pic provenant de la pepsine n'a été observé mettant, à priori, en évidence aucun relargage de la pepsine immobilisée. Même si la préparation du réacteur a été extrêmement simple et rapide, il est à noter que plusieurs heures de digestion ont été nécessaires pour des protéines telles que l'hémoglobine. De plus, même s'il est mentionné qu'un tel réacteur peut être réutilisé plusieurs fois [62], aucune information n'est donnée sur sa stabilité.

(ii) Greffage covalent

Des immobilisations par liaison covalente ont également été développées. Pour illustration, après traitement d'un capillaire de 50 µm de diamètre interne par de l'APTES, la paroi du capillaire a été activée par du glutaraldéhyde pour immobiliser la trypsine. Zhao *et al.* ont ainsi intégré un tel réacteur au niveau de l'aiguille de l'électrospray pour la digestion en ligne de protéines [65]. Ainsi, des recouvrements de séquence de 90 % ont été obtenus pour la digestion des solutions pures de cytochrome *c* et d'hémoglobine à 1 pmol.L^{-1} et de 32 % pour une solution de β-caséine à 1pmol.L^{-1}.

Un capillaire de 10 µm de diamètre a été utilisé par l'équipe de Foret afin d'augmenter l'efficacité de digestion [109]. La trypsine a été immobilisée *via* une fonction carboxylique sur le support activé par une amine. Ce réacteur de trypsine, couplé directement à une détection par spectrométrie de masse, a ainsi permis la digestion en seulement 46 secondes (30 nL.min^{-1}) du cytochrome *c* dans un échantillon pur avec un recouvrement de séquence de 90 %. Cependant la digestion de la β-caséine n'a permis qu'un recouvrement de séquence de 20 %. Ce faible recouvrement peut être expliqué par la présence de ponts disulfure nécessitant une étape préliminaire de réduction-alkylation pour dénaturer la protéine. Dans cette même étude, un autre réacteur enzymatique a été synthétisé par immobilisation de la pepsine sur les parois du capillaire. Bien que la comparaison des courants ioniques totaux obtenus sans digestion et après digestion par

le réacteur de pepsine permette de conclure à une digestion efficace des protéines testées (mélittine, cytochrome *c* et myoglobine), aucune identification des peptides n'a pu être effectuée par les banques de données bioinformatiques. Enfin, ces réacteurs enzymatiques (pepsine et trypsine) ont été intégrés en ligne juste après une séparation par électrophorèse capillaire suivie d'une détection par spectrométrie de masse, l'IMER étant intégré dans l'aiguille de l'électrospray. Cependant, le système en ligne contenant le réacteur de trypsine s'est révélé inefficace en raison de l'incompatibilité entre les conditions acides de la séparation par électrophorèse capillaire et la digestion trypsique réalisée idéalement en milieu légèrement basique. L'utilisation du réacteur de pepsine était en revanche plus adaptée car fonctionnant à pH acide, il a ainsi permis la séparation et l'analyse du cytochrome *c*, de la myoglobine et de la mélittine dans des quantités de l'ordre du fmol en milieu pur. Pour chaque protéine, les spectres montrent un grand nombre de pics mais malheureusement, aucune information n'a été donnée sur le recouvrement de séquence et l'efficacité de digestion.

Enfin, la paroi interne du capillaire de silice peut aussi être dérivée par un hydrogel fonctionnalisé à base de dextrane, un polysaccharide de glucose composé de chaînes de longueurs variant entre 10 et 150 kDa [110]. Une telle surface permet l'immobilisation d'une plus grande quantité d'enzymes et limite l'adsorption non spécifique des protéines sur le support [111]. Après plusieurs étapes de modification de la surface, la pepsine a été immobilisée par liaison covalente *via* les groupements carbonylediimidazole (CDI) de la surface de dextrane modifié. Ce réacteur enzymatique a ainsi permis la digestion rapide en 3 minutes (1 $\mu L.min^{-1}$) de différentes protéines en milieu purs, analysées par LC-MS/MS : l'hémoglobine (chaîne α 97 %, chaîne β 55 %), la myoglobine (58 %), l'interféron-γ recombinant humain (69 %) puis des protéines plus rigides, l' α – lactalbumine (62 %), la β-lactoglobuline (67 %) et la BSA (48 %), les pourcentages indiqués représentent les recouvrements de séquence obtenus. Il est intéressant de noter que les concentrations des protéines sont relativement élevées (de l'ordre de 10 $\mu mol.L^{-1}$) compte tenu de la miniaturisation du système. De plus, aucune information n'est donnée sur la sensibilité.

(iii) Conclusion

Ces colonnes non remplies offrent l'avantage d'être relativement simples à préparer en s'affranchissant de l'utilisation de frittés. Un autre avantage, est l'absence de perte de charge induite par le remplissage. Cependant, les diamètres internes des colonnes non remplies doivent être de faible dimension pour permettre un accès suffisant des solutés aux sites actifs des enzymes immobilisées car les analytes diffusent lentement dans la phase mobile. De plus, les phases

tubulaires présentent une plus faible quantité de site actif comparées aux phases particulaires et donc une quantité d'enzymes immobilisées plus faible, d'où une capacité de digestion limitée.

Pour ces raisons, les supports monolithiques représentent à l'heure actuelle la nouvelle génération des supports d'immobilisation pour les systèmes miniaturisés. En effet, la structure continue du monolithique présente un net avantage pour la synthèse de réacteurs enzymatiques en capillaires puisque les phases monolithiques peuvent être synthétisées *in situ* en étant liées aux parois du capillaire. Elles ne nécessitent donc pas l'utilisation de frittés. Comme pour les formats conventionnels, deux types de monolithes peuvent être préparés dans des capillaires ou des microcanaux : les monolithes organiques et les monolithes inorganiques.

II.2.4.3. Les monolithes organiques en formats miniaturisés

De nombreuses études portent sur l'immobilisation des enzymes sur des monolithes à base de polymère organique. En effet, ils sont simples à synthétiser, résistants au pH et une grande variété de chimie est disponible. Le copolymère organique à base de GMA-*co*-EDMA précédemment décrit pour les IMERs en format conventionnel, a largement été utilisé pour la synthèse de monolithes *in situ* dans des capillaires. Le tableau III-4 illustre les applications principales des IMERs à base de monolithes organiques en format capillaire

Support monolithique	E.	Q_E (Ri)	Capillaires	Analyse	Protéine	Matrice	Mode d'évaluation de l'efficacité de digestion	Paramètres étudiés	LDD	Réf.
poly(GMA-EDMA) + AAm. Glutar.	T.	/	61,5 cm x 50µm d.i.	LC (2mm d.i.)–MS (IT)	Insuline, Lysozyme, Cyt c, Ova	Tampon	Activité enzymatique (BAEE). Seq. Cov.	Débit, solvant orga	/	[112]
poly(GMA-EDMA) + BuMA, activé glutar.	T.	/	10 cm x 180 µm d.i.	TC (C_{18}, 300µm d.i.) – LC (150 µm d.i.) – MS (FTICR)	BSA	Tampon	Seq. Cov., nombre de peptides,	Débit, solvant orga, stabilité	/	[113]
AAm, NAS milieu aqueux	T.	96-98 %	6cm x 530µm d.i.	MALDI-TOF	BSA, Cyt c, Myo	Tampon	Activité (BA*p*NA) Seq. Cov.	Influence quantité de T., pH, débit, stabilité	/	[114]
AA, NAS, EDMA	T.	/	2cm x 150µmd.i.	LC (75µm i.d.) – MS (IT)	Cyt c	Tampon	Activité (BAEE) Seq. Cov., 2 peptides spécifiques	Débit	/	[115]
EDMA, HEMA, VAL	T.	/	100 µm d.i.	MALDI-TOF	Myoglobine	Tampon	Activité (BAEE) Sée. Cov. Protéine non digérée	Influence quantité de T. , débit	/	[116]
EDMA, HEMA, VAL	T.	/	10 cm x 100 µm d.i.	IMER-ESI-MS en ligne	Mellitine, cyt c, Myo, BSA, Caséine, hTf, Ribonucléase, AGP	Tampon	Seq. Cov. , nombre de peptides.	Comparaison en ligne et en différé	/	[63]
EDMA + BMA ou HEMA + VAL	T.	/	20 mm x 50µm d.i.	IMER–TC–MS (TOF) en ligne	Myoglobine	Tampon	Km et Vmax (BAEE) Seq. Cov.	Effet T°C		[117]
EDMA et VAL	P.	/	20 cm x 100 µm d.i.	IMER–LC (100µm d.i.)–MS (TOF) en ligne	Myo, Hémoglobine, Ova, Albumine	Tampon	Nombre de peptide, Observation du TIC	Stabilité	0,25 µM (TIC)	[68]
poly(GMA-EDMA), + PEG méthacrylate, VAL	T.	/	100 µm d.i.	IMER–LC (100µm d.i.)–MS (TOF) en ligne	Cyt c, BSA	Tampon	Seq. Cov.	Débit. Interactions non spécifiques. Stabilité		[118]
poly(GMA-EDMA) activé époxyde	T.	35 µg (49 %)	2.5cm x 75µm d.i.	IMER–MS (TOF) en ligne	Cyt c	Tampon	Seq. Cov., nombre de peptides.	pH, débit, T°C interaction non spé, solvant organique,	/	[64]
poly(GMA-EDMA) activé aldéhyde	P.	/	5 cm x 48 µm d.i.	CE-IMER-CE-MS en ligne	Cyt c, Myo	Tampon	Seq. Cov.	/	/	[119]
poly(GMA-EDMA) activé glutar.	T.	/	10 cm x 100 µm d.i.	IMER-LC (75 µm d.i.)-MS (LTQ)	BSA, Extrait de levure	Tampon / Levure	Seq. Cov.	Durée de digestion, Stabilité	50 nM (Seq.Cov)	[69]

E. : Enzyme, T. Trypsine, P. : Pepsine. Q_E : quantité d'enzymes réellement immobilisées, Ri : rendement d'immobilisation, MER : réacteur d'enzymes immobilisées, TC : Colonne de piégeage, LC : chromatographie liquide, MS : spectrométrie de masse, IT : piège à ions, TOF : Analyseur à temps de vol, LTQ : trappe d'ions linéaire, FTICR : Spectrométrie de Masse à Résonance Cyclotronique Ionique à Transformée de Fourier, CE : électrophorèse capillaire. GMA : glycidyl méthacrylate, EDMA : ethylene diméthacrylate, VAL : 2-vinyl-4,4-diméthylazlactone, AAm : acrylamide, NAS : N-acrylosuccinimide, BuMA : butylméthacrylate, HEMA : 2-hydroxyéthyl méthacrylate. Glutar. : glutaraldéhyde, EDA : ethylènediamine, CDI : carbonyldiimidazole, CIM : "convective Interaction Media". MeOH : méthanol, MeCN : acétonitrile. HSA, BSA : albumine de sérum humain ou bovin, Myo : Myoglobine, Cyt c : cytochrome *c*, Ova : Ovalbumine, hTF : Holo-transferrine, AGP : glycoprotéine acide. BAEE : N-α-benzoyl-arginine-éthyl ester, BApNA : N-α-benzoyl-arginine-*p*-nitroanilide. Seq. Cov : Sequence Coverage (Recouvrement de séquence). LDD : limite de détection.

Tableau II-4 : Liste des supports monolithiques organiques greffés par des enzymes.

Krenkova *et al*. ont préparé un monolithe à base de poly(GMA-EDMA) dans un capillaire de 75 µm de diamètre interne [64]. La trypsine a directement été immobilisée *via* la fonction époxyde avec un taux de greffage de 49 %. Tout d'abord, l'adsorption non spécifique de protéines et de peptides sur le support a été observée. Afin d'éviter ces interactions hydrophobes non spécifiques, 20 % de méthanol ont été ajoutés dans le tampon de digestion. La digestion en ligne d'une solution de cytochrome *c* couplée directement à une détection par spectrométrie de masse a été réalisée. Le recouvrement de séquence obtenu ainsi que l'observation des pics correspondant à la protéine non digérée sur les spectres ont permis d'optimiser les paramètres de digestion. Ainsi, sur la gamme de pH étudiée (5-10), la digestion de la protéine sur l'IMER développé s'est révélée complète au dessus de pH 8,5. De plus, l'augmentation de la température entre 25 °C et 37 °C a mené à une augmentation du recouvrement de séquence de 70 à 80 %. Ces résultats confirment encore les similarités des conditions de digestion entre la digestion en solution et sur enzymes immobilisées. La durée de digestion a également été optimisée : seules 20 secondes de digestion ont suffi pour obtenir les mêmes résultats qu'après 3 heures de digestion en solution, en termes de recouvrement de séquence, du nombre de peptides et du nombre de sites de coupure manqués.

Afin de diminuer l'hydrophobie du monolithe à base de poly(GMA-EDMA) qui génère des interactions non spécifiques, Duan *et al.* ont ajouté un monomère hydrophile, l'acrylamide (AAm) à leur préparation [112]. La trypsine a ainsi été immobilisée après activation de la fonction époxyde du monolithe par du glutaraldéhyde. Le substrat BAEE a été utilisé pour mesurer l'activité enzymatique et les résultats montrent que le monolithe préparé avec de l'acrylamide présente une meilleure activité que celui préparé sans AAm. L'hydrophilie apportée par l'acrylamide réduit l'adsorption de substrat sur le support et offre donc une meilleure accessibilité à l'enzyme. En revanche, aucune mesure du taux de greffage n'a pu être effectuée.

A l'inverse, Zhang *et al.* ont préparé un monomère plus hydrophobe dédié à la digestion des protéines de faibles abondances [113]. Un monomère possédant un groupement alkyle C_4 a été introduit dans la préparation du monolithe afin de combiner une étape d'enrichissement par rétention hydrophobe et l'étape de digestion. Ce support implique donc l'utilisation de 10 à 20 % de solvant organique (MeOH ou MeCN) dans le tampon de digestion afin de désorber les peptides produits retenus par interactions hydrophobes sur le support. En comparant le nombre de peptides obtenus après digestions sur deux réacteurs de trypsine préparés sans ou avec groupement butyle, ce dernier a montré au final une meilleure efficacité de digestion de la BSA et une plus grande intensité des pics des peptides.

Palm et Novotny ont développé un réacteur capillaire (530 µm d.i.) de trypsine en milieu aqueux à base entre autres du monomère hydrophile, l'acrylamide et de N-acrylosuccinimide (NAS), le NAS présentant une grande réactivité vis-à-vis de la partie amine des enzymes et permet ainsi leur immobilisation [114]. Même si le taux de greffage de la trypsine sur ce support n'a pas été mesuré, des concentrations croissantes de trypsine ont été utilisées pour la préparation de différents réacteurs. Les activités enzymatiques obtenues ont eu tendance à augmenter pour des concentrations de trypsine croissantes. Cependant, comme déjà observé dans le cas de la colonne Chromolith®, l'activité enzymatique atteint une valeur maximale qui ne peut être dépassée même en augmentant la concentration d'enzymes immobilisées. Ce réacteur enzymatique a été utilisé pour les digestions séparées du cytochrome *c*, de la myoglobine et de la BSA analysés ensuite par MALDI-TOF. L'ajout de 25 % d'acétonitrile dans le tampon de digestion a permis d'améliorer le recouvrement de séquence de 47 % contre 32 % sans acétonitrile pour la digestion de BSA tandis que 40 % d'acétonitrile ont été nécessaires pour la digestion de la myoglobine (recouvrement de séquence : 29 %). De nouveau, ces forts pourcentages en solvant organique nécessaires pour une bonne efficacité de digestion confirment la présence d'interactions non spécifiques hydrophobes avec le support.

Par ailleurs, Duan *et al.* ont développé un réacteur de trypsine immobilisée sur un monolithe à base d'EDMA, d'acrylamide et de NAS dans un solvant porogène à base d'alcool et ont comparé l'activité de leur réacteur enzymatique [115] à celui précédemment développé par l'équipe de Novotny [114]. Le réacteur préparé en milieu aqueux possède donc une meilleure hydrophilie que celui préparé en milieu alcoolique. Cependant, la synthèse en milieu organique a permis l'obtention d'un support de plus forte résistance mécanique. En effet, au vu de leur faible solubilité en milieu aqueux, seules des faibles quantités de monomère et d'agent réticulant ont pu être utilisées pour la préparation du monolithe en milieu aqueux. Ce monolithe a donc une structure moins rigide et une plus faible résistance mécanique par rapport au monolithe préparé en solvant organique. Aux faibles débits, une meilleure activité enzymatique du « monolithe aqueux » par rapport à celle du « monolithe alcool » a été observée. Elle s'explique par le squelette plus relâché et hydrophile du monolithe. En revanche, à hauts débits, le « monolithe alcool » présente une meilleure activité qui s'explique par un meilleur transfert de masse. Ce dernier a donc été couplé à une analyse par nanoLC-MS/MS et a permis la digestion en ligne du cytochrome *c*. Là encore, la digestion a été effectuée en milieu pur et l'évaluation de l'efficacité de digestion sur l'IMER a été réalisée en comparant le recouvrement de séquence et les peptides obtenus avec ceux obtenus après une digestion en solution. Des résultats très similaires ont été obtenus entre une digestion de 27 secondes sur l'IMER et de 12 h en solution. La digestion en ligne d'un mélange de 4 protéines standards a ensuite été réalisée durant 142 secondes. Le cytochrome *c* a été identifié avec le même

nombre de peptides et le même recouvrement de séquence que lorsqu'il était digéré seul. Cependant, les 3 autres protéines n'ont été identifiées que par un seul peptide.

Le groupe de Svec a développé une série de réacteurs enzymatiques (trypsine et pepsine) dans des capillaires avec des monolithes variés à base d'EDMA [63,68,116,117]. Une fonction azlactone est intégrée au monolithe comme groupement réactif impliqué dans la liaison covalente avec la trypsine. La fonctionnalisation peut être effectuée en intégrant le monomère 2-vinyl-4,4-diméthyl-azlactone (VAL) à la réaction de polymérisation [63,116] ou par photogreffage du VAL sur le monolithe après polymérisation [117]. Dans une première étude, l'effet de l'ajout d'un monomère hydrophile à la synthèse du monolithe sur l'activité enzymatique a été étudié, notamment les deux monomères hydrophile acrylamide et le 2-hydroxylméthyl méthacrylate (HEMA) ont été comparés [116]. De nouveau, une meilleure activité enzymatique a été obtenue avec le monomère HEMA par rapport à l'acrylamide, c'est-à-dire en augmentant l'hydrophilie du support. La digestion de la myoglobine a été réalisée sur l'IMER à base d'EDMA et HEMA puis le digestat, analysé en MALDI-TOF a donné un recouvrement de séquence de 67 %. Cependant, aucune comparaison avec la digestion en solution n'a été effectuée. De plus, le tampon de digestion est purement aqueux et les interactions non spécifiques avec le support n'ont pas été étudiées. Le mélange de monomères EDMA et HEMA a ensuite été utilisé pour d'autres études de ce groupe [63,117].

Plus récemment, une étude du même groupe a montré l'adsorption non spécifique de la BSA sur le monolithe à base de poly(GMA-EDMA) [118]. Pour cela, de la BSA marquée par de la fluorescéine a été percolée sur le monolithe et, comme déjà mentionné précédemment [64], il a été montré que 20 % d'acétonitrile était nécessaire pour minimiser les interactions non spécifiques se développant entre la protéine et le support. Cependant, même s'il a été montré que l'ajout de solvant organique n'inactive pas complètement la trypsine [104,116,117], il affecte probablement sa capacité de digestion. De plus, dans le cas d'un couplage en ligne, les peptides les plus hydrophiles ne peuvent plus être retenus sur la colonne analytique. Le groupe a donc proposé la modification du monolithe poly(GMA-EDMA) par photogreffage de poly(éthylène glycol) méthacrylate afin de rendre le monolithe encore plus hydrophile avant le photogreffage du VAL permettant l'immobilisation de la trypsine. Cette nouvelle approche a permis de réduire les adsorptions non spécifiques des protéines et des peptides hydrophobes puisque seulement 5 % d'acétonitrile ont suffit pour éviter ces interactions non spécifiques.

Finalement, dans les nombreuses études développées à partir d'IMER à base de monolithes organiques poly(GMA-EDMA), l'ajout d'acétonitrile a permis une nette amélioration de l'efficacité de digestion. La plupart du temps, les auteurs expliquent ces résultats par une plus forte hydrolyse

obtenue avec des solvants ayant une faible constante diélectrique. En déshydratant l'enzyme grâce à de fortes teneurs en solvant organique, il serait possible d'augmenter les interactions ioniques entre le substrat et l'enzyme pour favoriser la réaction de digestion. Cependant, cette dernière étude a prouvé l'importance des interactions non spécifiques développées avec ce support.

Le choix d'un support hydrophile est donc essentiel pour l'immobilisation des enzymes. C'est pour cette raison que nous nous sommes intéressés à la synthèse des monolithes inorganiques à base de silice en format capillaire dédiés à l'immobilisation de biomolécules.

II.2.4.4. Les monolithes de silice en formats miniaturisés

Le procédé de synthèse des monolithes à base de silice est le procédé sol-gel précédemment décrit. Ce procédé permet de générer un réseau de silice à partir de précurseurs moléculaires en solution pour former des monolithes. Comme décrit pour les immunoadsorbants, ce procédé a largement été utilisé pour immobiliser des enzymes par encapsulation dans le réseau de silice [38,120]. En effet, cette technique permet la fabrication de supports avec des pores de taille spécifiquement adaptée pour permettre au substrat de pénétrer dans le réseau tout en prévenant le relargage d'enzymes [121].

La préparation d'un monolithe nécessite alors une étape préalable de traitement du capillaire permettant au matériau sol-gel de s'accrocher à la paroi interne du capillaire. Le protocole de prétraitement de capillaire le plus utilisé est celui développé par Hjertén [122]. Il consiste en une étape de rinçage à la soude à température ambiante permettant d'augmenter le nombre de groupements silanols présents à la surface du capillaire de silice. Ce rinçage est suivi par une réaction de silanisation en milieu acide. L'agent silanisant contient un groupement silane trifonctionnel capable de se lier à la paroi de silice du capillaire et une autre fonction susceptible de participer à la réaction de polymérisation et pour la formation du monolithe.

La plupart des applications font état de l'encapsulation des biomolécules dans la matrice sol-gel. Toutefois, des immobilisations d'enzymes par interactions covalentes sur le support sol-gel ont été décrites plus récemment. Le tableau II-5 présente les quelques études à propose d'IMERs à base de monolithe sol-gel, en format capillaire, appliqués à la digestion par de la trypsine et de la pepsine de peptides ou de protéines.

Monolithe	E	Format	Immobilisation	Q_E	Couplage analytique	Peptides / Protéines	Matrice	Réf.
TMOS	T	75µm	Encapsulation	0,9 µg/cm IMER	IMER-CE-UV	Bradykinine	Tampon	[123]
PSG-PEG (MPTMS)	P	75µm	Encapsulation	/	CE-MS en différé	Hémoglobine, Lysozyme, insuline	Tampon	[49]

PSG-PEG (MPTMS)	T	75µm	liaison covalente	97 ng/cm IMER	IMER-CE-UV	Neurotensine, insuline, anhydrase carbonique, BSA	Tampon	[49]
TEOS, APTES, CTAB	T	100µm	liaison covalente	1,3 µg / cm IMER	µLC-MS en différé	Myoglobine	Tampon extrait *E. coli*	[124]

E. : enzyme. T. : Trypsine, P. : Pepsine. Q_E : quantité d'enzymes immobilisées, Ech. Echantillon. TMOS : tétraméthoxysilane, TEOS : tétraétoxysilane, PSG : sol-gel photopolymérisé, MPTMS : méthacryloxypropyltriméthoxysilane, APTES : aminorpopyltriétoxysilane, CTAB : cétyltrimétylammonium bromure, CE : électrophorèse capillaire, MS : spectrométrie de masse, BAEE : N-benzoyl-L-arginine-éthyl ester. BSA : albumine de sérum bovin.

Tableau II-5 : Liste des supports monolithiques sol-gel utilisés pour l'immobilisation d'enzymes en format miniaturisé.

(i) Encapsulation des enzymes

Par un procédé s'apparentant au procédé sans alcool développé par Ellerby *et al.,* Kato *et al.* ont développé un réacteur de trypsine [123]. Après traitement du capillaire par du méthacryloxyproypltriméthoxysilane (MPTMS), un monolithe sol-gel est préparé à partir du précurseur TMOS et l'encapsulation de la trypsine a lieu lorsque le tampon la contenant est ajouté. Ce réacteur, de dimension 2,5 cm x 75 µm d.i., a été appliqué à la digestion de petits substrats tels le BAEE et à la séparation du produit et du substrat non hydrolysé dans la partie non remplie du même capillaire par électrochromatographie capillaire. La quantité d'enzymes réellement immobilisées a été mesurée et 0,9 µg de trypsine par cm d'IMER ont été immobilisés. Les enzymes immobilisées ont montré une meilleure activité que l'enzyme libre. Cependant, l'activité enzymatique diminue de 75 % de sa valeur initiale au bout de 4 jours après 50 analyses. De plus, l'efficacité de ce réacteur pour la digestion de protéines n'a pas été démontrée. Enfin, le débit hydrodynamique est faible dans ce type de colonne. Pour ces raisons, des larges macropores doivent être générés afin de permetre aux larges molécules d'atteindre les sites actifs des enzymes immobilisées. Pour ces raisons des monolithes sol-gel photopolymérisés (PSG) ont été développés.

Comme le montre le tableau II-5, Kato *et al.* ont préparé un monolithe sol-gel photopolymérisé (PSG) à partir du précurseur méthacryloxypropyl-triméthoxysilane dans un capillaire de dimensions 5 cm x 75 µm d.i. [49]. Ce monolithe est composé d'un squelette rigide avec des pores de petites tailles et des larges pores assurant à la colonne une grande surface et une bonne perméabilité. Le monolithe PSG a été ensuite recouvert d'un film de matériau sol-gel contenant de la pepsine encapsulée. De plus, comme le montre la figure II-12 le monolithe PSG a été synthétisé dans seulement une partie du capillaire pour que la digestion enzymatique et la séparation par électrophorèse capillaire aient lieu dans le même capillaire.

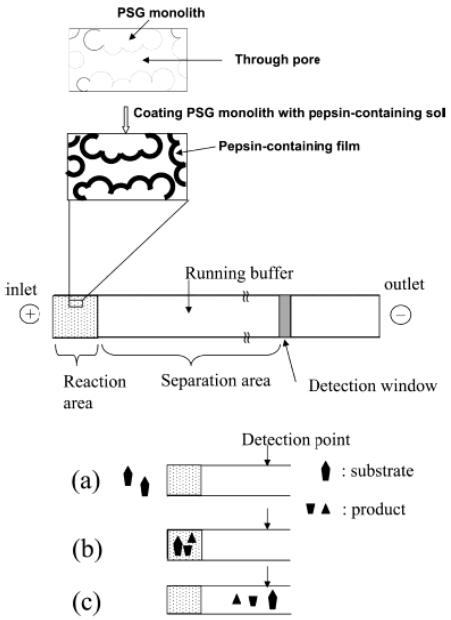


Figure II-12 : Schéma du réacteur de pepsine intégré à l'électrophorèse capillaire (CE). (a) Introduction des substrats. (b) Digestion enzymatique. (c) Les produits de la digestion sont séparés dans le capillaire par CE [49].

La solution de digestion-séparation utilisée est de l'acide formique. Dans ces conditions, l'activité enzymatique de la pepsine encapsulée a été étudiée avec de l'hémoglobine et la valeur obtenue est très proche de celle de la pepsine en solution. Finalement, la colonne capillaire développée contenant le monolithe PSG de pepsine et une partie de séparation couplée à un spectromètre de masse a permis la digestion, la séparation et l'analyse en ligne de protéines telles que la chaîne β de l'insuline (3,5 kDa) et le lysozyme (14,3 kDa) avec des recouvrements de séquence de 100 % et 73 % respectivement. Cette colonne a aussi été utilisée pour la digestion de protéines de plus haute masse moléculaire telles que l'anhydrase carbonique (29 kDa) et l'albumine de sérum bovin (66 kDa). Toutefois, aucune information n'est donnée sur la stabilité de l'IMER et le relargage de pepsine.

L'équipe de Brennan a elle aussi développé des colonnes capillaires à base de biomolécules immobilisées dans des monolithes sol-gel pour l'encapsulation de l'enzyme DHFR [125], l'enzyme gamma glutamyl-transpeptidase (γ-GT) [121] ou de l'anticorps anti-fluoroscéine [126] dans des capillaires de 250 µm de diamètre interne. Dans ces études, à la différence des travaux de Kato *et al.* précédemment cités, le débit est assuré par voie hydrodynamique : les analytes sont transférés à l'aide d'un pousse-seringue sur la colonne directement connectée au spectromètre de masse. La synthèse se fait en deux étapes et à partir du précurseur biocompatible diglycérylsilane (DGS). Après hydrolyse du DGS, une solution tampon contenant la biomolécule à encapsuler est ajoutée

puis le mélange réactif est incorporé rapidement dans le capillaire avant gélation. Cependant, les enzymes encapsulées dans un monolithe sol-gel préparé à partir du DGS seul ont montré une baisse d'activité par rapport aux enzymes en solution [44]. Ceci est expliqué par la structure microporeuse du monolithe et donc une faible diffusion du substrat. Pour cette raison, des agents porogène tels que l'oxyde de polyéthylène (PEO) [125] ou avec le poly(éthylèneglycol) (PEG) [121,126] ont été ajoutés afin de développer des monolithes mésoporeux pour retenir les biomolécules encapsulées et macroporeux pour permettre la diffusion rapide des larges molécules. Toutefois, même si une partie des biomolécules est bien retenue dans les mésopores, une grande partie est éliminée des macropores. De plus, que ce soit les réacteurs enzymatiques ou l'immunoadsorbant développés, aucun n'ont été appliqués à l'analyse de macromolécules.

(ii) Immobilisation covalente des enzymes

Afin de prévenir du relargage des enzymes encapsulées, quelques études témoignent de l'immobilisation covalente de l'enzyme sur le monolithe sol-gel.

L'équipe de Zare a préparé un réacteur enzymatique capillaire à partir d'un monolithe PSG macroporeux où la trypsine est immobilisée par liaison covalente sur un support fonctionnalisé par un aldéhyde [49]. Le polyéthylène glycol (PEG) a été incorporé lors de la synthèse menant à un monolithe PSG-PEG suffisamment hydrophile pour minimiser les interactions non spécifiques des peptides et des protéines avec la surface du monolithe. Finalement, 97 ng de trypsine par cm de microréacteur ont été immobilisés. L'activité enzymatique a été déterminée à l'aide du substrat BAEE. Non seulement, l'activité enzymatique de la trypsine liée de façon covalente sur le monolithe PSG-PEG est bien plus grande que celle de la trypsine en solution mais elle est aussi significativement plus élevée que celle de la trypsine encapsulée. En effet, l'immobilisation covalente permet de limiter l'autodigestion de l'enzyme et offre une stabilité structurale à l'enzyme. De plus, le monolithe hydrophile procure aux enzymes un microenvironnement favorable qui améliore la stabilité des enzymes immobilisées. Finalement, après la digestion de la neurotensine (1,7 kDa) et de la chaîne β de l'insuline (3,5 kDa) dans ce capillaire, le chromatogramme UV montre bien l'apparition de pics correspondant aux fragments peptidiques. Toutefois, cet IMER n'a pas été appliqué à la digestion de protéines de plus haute masse moléculaire et aucune application en échantillon réelle n'a été réalisée.

Récemment, Ma *et al.* ont préparé un réacteur capillaire (100 µm d.i.) de trypsine immobilisée pour la digestion d'un mélange de protéines contenant le cytochrome *c*, la myoglobine, l'anhydrase carbonique, et la BSA [124]. Le support d'immobilisation est un monolithe à base de

silice hybride inorganique-organique préparé à partir du TEOS et de l'APTES comme précurseurs et un tensioactif cationique, le cétyltriméthylammonium bromure (CTAB). La synthèse sera décrite plus en détail au dernier chapitre du manuscrit, car appliquée dans cette étude. La mesure de la quantité d'enzymes immobilisées sur cet IMER a montré que 1,3 µg de trypsine était réellement greffée sur 1 cm du réacteur enzymatique, ce qui est comparable à ce qui a été obtenu pour la trypsine encapsulée [123] et 10 fois supérieur à la valeur obtenue sur un monolithe PSG-PEG immobilisée par la trypsine via une liaison covalente [49]. Ainsi, sur un réacteur de 2 cm de longueur, la digestion à 300 $nL.min^{-1}$ d'une solution de myoglobine et l'analyse par µLC-MS/MS ont montré un recouvrement de séquence de la protéine de 90 %. Pour évaluer les performances du réacteur enzymatique à l'analyse protéomique, un réacteur de trypsine de 10 cm a été utilisé pour la digestion d'un extrait protéique d'*Escherichia coli*. Ainsi, 208 protéines ont été identifiées en 150 secondes contre seulement 176 en 24 h par digestion en solution, incluant des protéines de 3 kDa à 155 kDa. Toutefois, malgré la grande perméabilité du monolithe et sa résistance à la pression, le microréacteur n'a pas été couplé en ligne à l'analyse par LC-MS.

(iii) Conclusion

De nombreuses applications ont été développées pour l'encapsulation de biomolécules dans des matrices sol-gel et parmi elles, quelques une pour l'encapsulation d'enzymes. En effet, l'encapsulation des enzymes semble préserver leur activité par comparaison à une liaison covalente sur le support. Quelques équipes s'intéressent particulièrement à la synthèse de ces réacteurs en format capillaire. Toutefois, malgré les nombreuses optimisations pour développer des supports mésoporeux afin de retenir les biomolécules encapsulées et macroporeux permettant une diffusion rapide des molécules, le relargage d'une grande partie des enzymes encapsulées est la plupart du temps observé et il n'existe qu'une seule étude appliquée à la digestion des protéines. Afin de remédier au relargage des enzymes, l'immobilisation par liaison covalente a été une alternative. De nouveau, une seule application des IMERs sol-gel en capillaire a porté sur l'analyse d'un échantillon réel, il s'agit de l'analyse protéomique d'un extrait d'*E. coli* et aucune application n'a porté sur l'analyse d'une protéine ciblée en échantillons réels.

Même si peu d'applications ont encore été développées, l'utilisation de monolithes sol-gel pour l'immobilisation covalente d'enzymes reste donc être très prometteuse pour la fabrication de réacteurs en format capillaire tout en limitant les interactions non spécifiques avec le support.

II.2.5. Conclusion

Ces études démontrent le grand potentiel des enzymes immobilisées. En particulier, les réacteurs ainsi préparés permettent une digestion couplée en ligne à l'analyse et donc un gain de temps considérable, une diminution de la consommation d'enzymes et une réduction du nombre d'étapes manuelles.

Cependant, l'analyse de protéines ciblées faiblement abondantes dans des échantillons biologiques pose le problème de la sensibilité de la méthode d'analyse. En effet, la grande complexité des matrices comme le plasma et notamment la présence de protéines majoritaires et le grand nombre de protéines peuvent masquer les protéines minoritaires d'intérêt lors d'une analyse par LC-MS. Les techniques de traitement d'échantillon permettant d'éliminer un grand nombre d'interférent profitent à l'analyse de protéines ciblées. En particulier, le haut degré de sélectivité apporté par des techniques d'extraction par affinité comme l'immunoextraction décrite au début de ce chapitre en fait une méthode de choix pour l'analyse de protéines ciblées. La dernière partie de ce chapitre est donc consacrée au couplage entre une étape d'immunoextraction d'une protéine ciblée et la digestion enzymatique sur support d'enzymes immobilisées afin de développer une méthode totalement automatisable

II.3. Analyse totale en ligne d'une protéine ciblée

Le couplage entre l'immunoextraction et la digestion sur support solide pose le problème de la compatibilité de solvant entre ces deux étapes. En effet, la digestion est le plus souvent effectuée par de la trypsine dont l'activité est optimale à pH 8 alors que l'élution des protéines sur l'immunoadsorbant requiert l'utilisation d'acide qui réduit l'activité voire inactive la trypsine. Pour cette raison, très peu d'applications portent sur le couplage d'un immunoadsorbant avec un réacteur d'enzymes immobilisées. Les stratégies développées consistent à augmenter le pH entre les deux étapes par une pompe additionnelle ou en retenant la protéine sur colonne échangeuse d'ions avant la digestion.

Ainsi, pour l'analyse de l'hémoglobine, l'équipe de Regnier a proposé d'intercaler une colonne mixte échangeuse d'ions (anions et cations) de 30 x 2,1 mm d.i. entre l'immunoadsorbant anti-hémoglobine et le réacteur de trypsine Poroszyme® [22]. Le montage est schématisé en figure II-13.

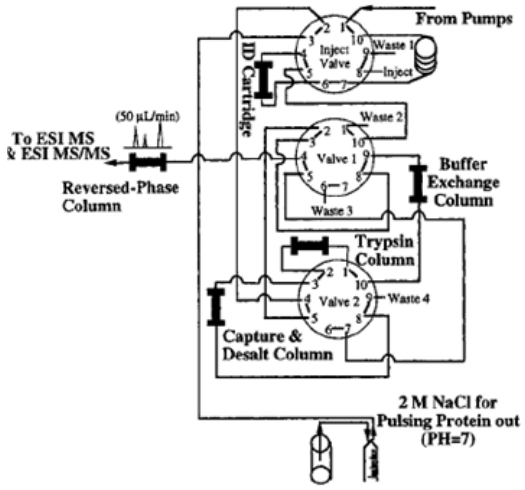


Figure II-13 : Montage couplant un IS, une colonne échangeuse d'ions, un réacteur de trypsine immobilisée et une colonne de piégeage à l'analyse par LC-MS [22].

Ainsi, après l'élution de l'hémoglobine de l'IS avec une solution d'acide chlorhydrique (pH 1,9), la protéine chargée positivement est retenue sur le support échangeur de cations. Une étape de lavage permet d'ajuster le pH à une valeur compatible avec la trypsine (7,5). A ce pH, la protéine devient en partie chargée négativement puisque l'hémoglobine à un pI de 6,8. La résine échangeuse d'anions va permettre de conserver la rétention de la protéine sur la colonne mixte d'échange d'ions. Ensuite, la percolation d'une solution de NaCl concentrée permet de désorber la protéine de la colonne échangeuse d'ions et de la transférer sur le réacteur enzymatique dans des conditions compatibles avec la digestion trypsique. Les peptides générés sont retenus sur une colonne de piégeage puis, après dessalage, ils sont transférés et séparés sur la colonne analytique avant d'être détectés par spectrométrie de masse. Ce système a été appliqué à l'analyse en ligne de deux variantes de l'hémoglobine et a permis leur distinction. Même si l'analyse a été effectuée dans un mélange de 5 protéines du plasma (globuline, fibrinogène, apo-transferrine, albumine et thrombine), aucune application à un échantillon réel n'a permis de confirmer la réelle sélectivité de l'analyse. De plus, le rendement d'immunoextraction n'a pas été étudié et aucune méthode de quantification ou même d'évaluation de l'efficacité du système total n'a été développée.

Une autre stratégie a consisté à coupler un immunoadsorbant anti-BSA au réacteur enzymatique de trypsine StyrosZyme^{TM} au moyen d'une pompe additionnelle délivrant une solution basique (PBS, pH 10,8) en continu sur le réacteur enzymatique après l'immunoadsorbant [28]. Ainsi, l'analyte élué de l'IS à pH acide (pH 2,7) est transféré sur la précolonne de trypsine avec un pH ajusté autour de 8, ce qui permet une digestion de la protéine. Le montage est représenté en

figure II-14. Après digestion, les peptides sont transférés sur une colonne de piégeage puis élués vers la colonne analytique et le spectromètre de masse.

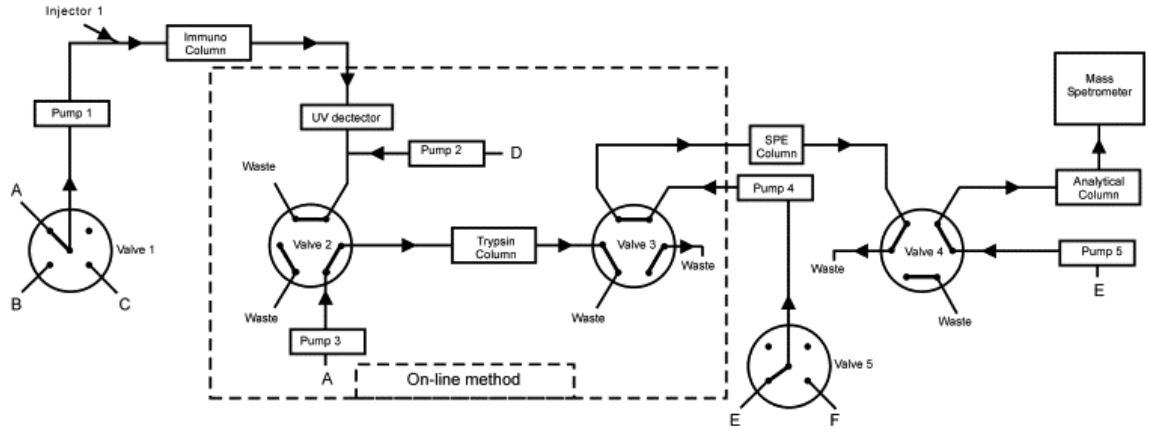


Figure II-14 : Schéma du procédé d'analyse en ligne couplant l'IS, la Poroszyme®, une colonne de piégeage et une analyse par LC-MS. A : solution de conditionnement de l'IS et de la Poroszyme® (PBS pH 7,4), B : solution de lavage de l'IS (NaCl 0.15M), C : solution d'élution (pH 2,7), D : solution de PBS à pH 10,8 utilisée pour ajuster le pH au niveau du réacteur de trypsine. E et F constituent la phase mobile de la LC-MS [28].

Après avoir mis au point la méthode de couplage, une courbe d'étalonnage de l'analyse totale a été établie entre 0,1 et 15 $\mu mol.L^{-1}$ de BSA dans du tampon PBS en intégrant le pic correspondant à un peptide spécifique de la BSA. L'analyse d'un échantillon d'urine humaine dopée par 4 $\mu mol.L^{-1}$ de BSA montre une précision de 93 % par rapport à la courbe de calibration démontrant la très grande sélectivité de l'étape d'immunoextraction. L'analyse totale a montré une bonne répétabilité avec un coefficient de variation de 3 %. Toutefois, en comparant le système en ligne à une analyse en différé comprenant une immunoextraction, une digestion en solution de 15 h et une analyse par SPE-LC-MS, le rendement obtenu n'est que de 4 %. Ce faible rendement est totalement lié à l'étape de digestion en ligne puisque les étapes d'immunoextraction et d'analyse SPE en ligne ont un rendement de 90 et 95 % respectivement.

Finalement, en raison de leur l'incompatibilité, très peu d'applications portent sur le couplage entre l'étape d'immunoextraction et l'étape de digestion par la trypsine et dans les deux exemples cités ci-dessus, les supports d'enzymes immobilisées sont des supports commerciaux.

Pour ces raisons, les études portent actuellement sur le couplage d'une étape d'extraction par affinité compatible à la digestion enzymatique. Citons par exemple le couplage d'une technique d'affinité par un inhibiteur enzymatique à une digestion enzymatique par la trypsine et à l'analyse par LC-MS pour l'analyse des métalloprotéases matricielles (MMP) [82]. Ainsi, les enzymes actives sont retenues sur le support d'affinité et sont ensuite éluées vers un réacteur de trypsine

immobilisée sur un support de Sépharose par une solution tampon Tris à 25 mmol.L^{-1} contenant 5 mmol.L^{-1}d'EDTA (acide éthylène diamine tétra acétique) et dont le pH (8,2) est compatible avec la digestion trypsique. L'EDTA a toutefois tendance à déstabiliser la trypsine en chélatant les ions calcium. Le transfert entre le réacteur de trypsine et la colonne de piégeage est donc assuré par une solution contenant des ions Ca^{2+} afin de minimiser le contact entre la trypsine et l'EDTA et stabiliser la trypsine. Ainsi, aucun effet négatif de l'EDTA sur la trypsine n'a été observé. Ce système a été appliqué à l'analyse de 40 pmol de MMP et un recouvrement de séquence de 93 % a été obtenu. La comparaison entre un échantillon pur dopé et un échantillon d'urine dopée a montré des résultats similaires, seule une légère baisse de l'intensité des signaux pour l'analyse dans l'urine est observée. Une bonne sensibilité de 8 nmol.L^{-1} a d'ailleurs été estimée en injectant un grand volume d'urine (500 µL). Toutefois, l'adsorption non spécifique des peptides les plus hydrophobes sur le support d'enzymes immobilisées a été constatée. La limitation majeure de ce système est qu'il n'est pas quantitatif. En effet, dans la gamme de concentration étudiée, les réponses des signaux ne sont pas linéairement dépendantes de la concentration injectée.

L'étape d'extraction en amont de la digestion étant jugée indispensable pour l'analyse fiable et quantitative d'une protéine ciblée dans un échantillon complexe, la mise au point d'un système couplant un immunoadsorbant à un réacteur enzymatique puis à l'analyse par LC-MS a été l'objet de cette étude.

II.4. Conclusion

Au cours de ce chapitre les méthodes d'immobilisation des anticorps et des enzymes pour l'obtention d'immunoadsorbants et de réacteurs enzymatiques ont été longuement détaillées ainsi que leurs applications pour l'analyse des protéines ciblées. Les supports d'immunoextraction ont montré une grande sélectivité vis-à-vis des protéines ciblées dans des échantillons extrêmement complexes tels que le plasma. Par ailleurs, ces dernières années, la digestion enzymatique en solution a été remplacée par la digestion sur supports d'enzymes immobilisées. L'utilisation d'enzymes immobilisées présente un grand intérêt pour réduire le temps de digestion et limiter les étapes manuelles qui sont sources d'interférences. Ils permettent aussi la mise au point d'une digestion couplée en ligne à l'analyse. Dans de nombreuses études, des supports commerciaux de trypsine immobilisée sont utilisés. Pour les autres, les réacteurs ont été élaborés au laboratoire. D'autres études portent sur l'immobilisation d'enzymes sur des supports, mais la quantité de

trypsine réellement immobilisée sur le support a rarement été mesurée et aucune optimisation n'a été effectuée. De plus, très peu d'études portent sur la comparaison de différents supports d'enzymes immobilisées. L'outil le plus utilisé afin d'évaluer l'efficacité de digestion est le recouvrement de séquence et seule une étude a témoigné du développement d'un outil de quantification de la protéine digérée. Enfin, très peu d'IMERs sont appliqués à l'analyse d'échantillons réels ou même de mélanges de protéines et les rares applications à des échantillons comme l'urine ont montré la nécessité d'une étape de traitement d'échantillon pour la quantification. En effet, la complexité des échantillons biologiques ne permet pas la détection des protéines minoritaires après la digestion enzymatique. Finalement, le couplage d'une immunoextraction à la digestion sur support d'enzymes immobilisées suivies d'une analyse par LC-MS présente un réel intérêt pour l'analyse de protéines ciblées dans des échantillons biologiques. Les peu d'applications développées à l'heure actuelle nous ont mené à développer un tel système analytique avec l'aide d'une protéine modèle, le cytochrome *c*.

Au cours du chapitre suivant, la digestion en ligne sera développée et comparée à une digestion en solution. Pour cela, plusieurs réacteurs enzymatiques seront développés et comparés. L'étude bibliographique a montré l'importance du choix du support d'immobilisation, en particulier pour le contrôle des interactions non spécifiques. De plus, peu d'études ont porté sur l'optimisation du taux de greffage. Pour ces raisons, des supports présentant une bonne hydrophilie ont été choisis et le taux de greffage étudié. Afin de comparer les IMERs développés, l'utilisation d'un substrat chromogène tel que le BA*p*NA semble être une bonne alternative à la digestion et à l'analyse complexe des protéines. Le chapitre IV sera ensuite dédié à la mise en œuvre de l'immunoextraction, c'est-à-dire la synthèse d'un immunoadsorbant et sa caractérisation, puis l'immunoadsorbant développé sera couplé à la digestion enzymatique. Un outil de quantification de la protéine sera d'ailleurs développé. Enfin, le chapitre V portera sur la miniaturisation du système analytique en particulier la synthèse du réacteur enzymatique en capillaire.

II.5. Références

[1] N.L. Anderson, N.G. Anderson, *Mol Cell Proteomics* 1 (2002) 845.
[2] K. Merrell, K. Southwick, S.W. Graves, M.S. Esplin, N.E. Lewis, C.D. Thulinab, *J. Biomol. Tech.* 15 (2004) 238.
[3] E.F. Petricoin, C.P. Paweletz, L.A. Liotta, *J. Mammary Gland Biol. Neoplasia* 7 (2002) 433.
[4] V. Pichon, *J. Chromatogr., A* 1152 (2007) 41.
[5] V. Pichon, F. Chapuis-Hugon, *Anal. Chim. Acta* 622 (2008) 48.
[6] F. Chapuis, J.-U. Mullot, V. Pichon, G. Tuffal, M.-C. Hennion, *J. Chromatogr., A* 1135 (2006) 127.
[7] F. Hugon-Chapuis, J.U. Mullot, G. Tuffal, M.C. Hennion, V. Pichon, *J. Chromatogr., A* 1196-1197 (2008) 73.
[8] F. Chapuis, V. Pichon, F. Lanza, S. Sellergren, M.C. Hennion, *J. Chromatogr., A* 999 (2003) 23.
[9] A. Bossi, F. Bonini, A.P.F. Turner, S.A. Piletsky, *Biosens. Bioelectron.* 22 (2007) 1131.
[10] A.L. Hillberg, M. Tabrizian, *IRBM* 29 (2008) 89.
[11] R. Stoltenburg, C. Reinemann, B. Strehlitz, *Biomol. Eng.* 24 (2007) 381.
[12] J.A. Cruz-Aguado, G. Penner, *J. Agric. Food Chem.* 56 (2008) 10456.
[13] T. Nguyen, R. Pei, M. Stojanovic, Q. Lin, *Microfluidics and Nanofluidics* 6 (2009) 479.
[14] B. Madru, F. Hugon-Chapuis, E. Peyrin, V. Pichon, *Anal. Chem. Article accepted* (2009).
[15] J. Daussant, F.X. Desvaux. *Introduction to immunochemical techniques for medical diagnosis, food quality control and environmental testing. Institute of chemical technology*, ICT Press, Prague, 2007.
[16] N. Delaunay-Bertoncini, Université de Paris VI. *Développement d'immunoadsorbants à base d'anticorps monoclonaux pour l'extraction sélective de familles de micropolluants organiques contenus dans des matrices complexes. Comparaison avec des polymères à empreintes moléculaires*, novembre 2001.
[17] D.S. Hage, *J. Chromatogr., B* 715 (1998) 3.
[18] L.J. Janis, F.E. Regnier, *J. Chromatogr., A* 444 (1988) 1.
[19] L.J. Janis, F.E. Regnier, *Anal. Chem.* 61 (1989) 1901.
[20] L.J. Janis, A. Grott, F.E. Regnier, S.J. Smith-Gill, *J. Chromatogr., A* 476 (1989) 235.
[21] R.W. Nelson, J.R. Krone, A.L. Bieber, P. Williams, *Anal. Chem.* 67 (1995) 1153.
[22] Y.L.F. Hsieh, H. Wang, C. Elicone, J. Mark, S.A. Martin, F. Regnier, *Anal. Chem.* 68 (1996) 455.
[23] J.W. Sen, H.R. Bergen, N.H.H. Heegaard, *Anal. Chem.* 75 (2003) 1196.
[24] L.-H. Gam, S.-Y. Tham, A. Latiff, *J. Chromatogr., B* 792 (2003) 187.
[25] M. Thevis, M. Bredehöft, H. Geyer, K. Matthias, D. Philippe, S. Wilhelm, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 20 (2006) 3551.
[26] K.A. Tubbs, U.A. Kiernan, E.E. Niederkofler, D. Nedelkov, A.L. Bieber, R.W. Nelson, *Anal. Chem.* 78 (2006) 3271.
[27] M. Berna, C. Schmalz, K. Duffin, P. Mitchell, M. Chambers, B. Ackermann, *Anal. Biochem.* 356 (2006) 235.
[28] J.S. Hoos, H. Sudergat, J.-P. Hoelck, M. Stahl, J.S.B. de Vlieger, W.M.A. Niessen, H. Lingeman, H. Irth, *J. Chromatogr., B* 830 (2006) 262.
[29] D. Rodriguez-Cabaleiro, K. Van Uytfanghe, V. Stove, T. Fiers, L.M. Thienpont, *Clin Chem* 53 (2007) 1462.
[30] W. Li, O. Nemirovskiy, S. Fountain, W. Rodney Mathews, G. Szekely-Klepser, *Anal. Biochem.* 369 (2007) 41.
[31] F. Guan, C.E. Uboh, L.R. Soma, E. Birks, J. Chen, J. Mitchell, Y. You, J. Rudy, F. Xu, X. Li, G. Mbuy, *Anal. Chem.* 79 (2007) 4627.
[32] E. Duriez, F.o. Fenaille, J.-C. Tabet, P. Lamourette, D. Hilaire, F.o. Becher, E. Ezan, *J. Proteome Res.* 7 (2008) 4154.
[33] M.-C. Hennion, V. Pichon, *J. Chromatogr., A* 1000 (2003) 29.
[34] M.A.J. Godfrey, *The Analyst* 123 (1998) 2501.
[35] C.L. Flurer, M. Novotny, *Anal. Chem.* 65 (1993) 817.
[36] B. Akerstrom, T. Brodin, K. Reis, L. Bjorck, *J Immunol* 135 (1985) 2589.
[37] A.M. Siouffi, *J. Chromatogr., A* 1000 (2003) 801.
[38] R. Gupta, N.K. Chaudhury, *Biosens. Bioelectron.* 22 (2007) 2387.

[39] B.C. Dave, B. Dunn, J.S. Valentine, J.I. Zink, *Anal. Chem.* 66 (1994) 1120A.
[40] W. Jin, J.D. Brennan, *Anal. Chim. Acta* 461 (2002) 1.
[41] L.M. Ellerby, C.R. Nishida, F. Nishida, S.A. Yamanaka, B. Dunn, J.S. Valentine, J.I. Zink, *Science* 255 (1992) 1113.
[42] D. Lopez-Ferrer, J.L. Capelo, J. Vazquez, *J. Proteome Res.* 4 (2005) 1569.
[43] I. Gill, A. Ballesteros, *J. Am. Chem. Soc.* 120 (1998) 8587.
[44] T.R. Besanger, Y. Chen, A.K. Deisingh, R. Hodgson, W. Jin, S. Mayer, M.A. Brook, J.D. Brennan, *Anal. Chem.* 75 (2003) 2382.
[45] X. Sui, J.A. Cruz-Aguado, Y. Chen, Z. Zhang, M.A. Brook, J.D. Brennan, *Chem. Mater.* 17 (2005) 1174.
[46] M.A. Brook, Y. Chen, K. Guo, Z. Zhang, J.D. Brennan, *J. Mater. Chem.* 14 (2004) 1469.
[47] T.-Y. Lin, C.-H. Wu, J.D. Brennan, *Biosens. Bioelectron.* 22 (2007) 1861.
[48] M. Kato, K. Sakai-Kato, T. Toyo'oka, *J. Sep. Sci.* 28 (2005) 1893.
[49] M. Kato, K. Sakai-Kato, H.M. Jin, K. Kubota, H. Miyano, T. Toyo'oka, M.T. Dulay, R.N. Zare, *Anal. Chem.* 76 (2004) 1896.
[50] J.D. Brennan, D. Benjamin, E. DiBattista, M.D. Gulcev, *Chem. Mater.* 15 (2003) 737.
[51] R.B. Bhatia, C.J. Brinker, A.K. Gupta, A.K. Singh, *Chem. Mater.* 12 (2000) 2434.
[52] K.K. Flora, J.D. Brennan, *Chem. Mater.* 13 (2001) 4170.
[53] M.M. Collinson, *TrAC, Trends Anal. Chem.* 21 (2002) 31.
[54] K. Nakanishi, H. Minakuchi, N. Soga, N. Tanaka, *J. Sol-Gel Sci. Technol.* 13 (1998) 163.
[55] S. Ota, S. Miyazaki, H. Matsuoka, K. Morisato, Y. Shintani, K. Nakanishi, *J. Biochem. Biophys. Methods* 70 (2007) 57.
[56] M. Cichna, D. Knopp, R. Niessner, *Anal. Chim. Acta* 339 (1997) 241.
[57] M. Cichna-Markl, *J. Chromatogr., A* 1124 (2006) 167.
[58] E. Peronnet, L. Becquart, J. Martinez, J.-P. Charrier, C. Jolivet-Reynaud, *Clin. Chim. Acta* 377 (2007) 243.
[59] V. Pichon, L. Chen, M.C. Hennion, R. Daniel, A. Martel, F. Le Goffic, J. Abian, D. Barcelo, *Anal. Chem.* 67 (1995) 2451.
[60] M. Bredehöft, W. Schänzer, M. Thevis, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 22 (2008) 477.
[61] A. Tanaka, T. Tosa, T. Kobayashi, Industrial application of immobilized biocatalysts, Marcel Dekker, 1992.
[62] G. Marie, L. Serani, O. Laprevote, *Anal. Chem.* 72 (2000) 5423.
[63] D.S. Peterson, T. Rohr, F. Svec, J.M.J. Frechet, *J. Proteome Res.* 1 (2002) 563.
[64] J. Krenkova, Z. Bilkova, F. Foret, *J. Sep. Sci.* 28 (2005) 1675.
[65] C. Zhao, H. Jiang, D.R. Smith, S. Bruckenstein, T.D. Wood, *Anal. Biochem.* 359 (2006) 167.
[66] G.W. Slysz, D.C. Schriemer, *Anal. Chem.* 77 (2005) 1572.
[67] M. Petro, F. Svec, J.M.J. Fréchet, *Biotechnol. Bioeng.* 49 (1996) 355.
[68] L. Geiser, S. Eeltink, F. Svec, J.M.J. Fréchet, *J. Chromatogr., A* 1188 (2008) 88.
[69] S. Feng, M. Ye, X. Jiang, W. Jin, H. Zou, *J. Proteome Res.* 5 (2006) 422.
[70] G. Vecchione, B. Casetta, R. Santacroce, M. Margaglione, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 15 (2001) 1383.
[71] J. Carol-Visser, M. van der Schans, A. Fidder, A.G. Hulst, B.L.M. van Baar, H. Irth, D. Noort, *J. Chromatogr., B* 870 (2008) 91.
[72] S. Canarelli, I. Fisch, R. Freitag, *J. Chromatogr., B* 775 (2002) 27.
[73] S. Hara, V. Katta, H.S. Lu, *J. Chromatogr., A* 867 (2000) 151.
[74] E. Calleri, C. Temporini, E. Perani, A.D. Palma, D. Lubda, G. Mellerio, A. Sala, M. Galliano, G. Caccialanza, G. Massolini, *J. Proteome Res.* 4 (2005) 481.
[75] J. Samskog, D. Bylund, S.P. Jacobsson, K.E. Markides, *J. Chromatogr., A* 998 (2003) 83.
[76] J. Carol, M.C.J.K. Gorseling, C.F. de Jong, H. Lingeman, C.E. Kientz, B.L.M. van Baar, H. Irth, *Anal. Biochem.* 346 (2005) 150.
[77] E. Calleri, C. Temporini, E. Perani, C. Stella, S. Rudaz, D. Lubda, G. Mellerio, J.L. Veuthey, G. Caccialanza, G. Massolini, *J. Chromatogr., A* 1045 (2004) 99.
[78] C. Temporini, E. Perani, F. Mancini, M. Bartolini, E. Calleri, D. Lubda, G. Felix, V. Andrisano, G. Massolini, *J. Chromatogr., A* 1120 (2006) 121.
[79] R. Nicoli, S. Rudaz, C. Stella, J.L. Veuthey, *J. Chromatogr., A* 1216 (2009) 2695.

[80] R. Nicoli, N. Gaud, C. Stella, S. Rudaz, J.L. Veuthey, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 48 (2008) 398.
[81] H. Ehring, *Anal. Biochem.* 267 (1999) 252.
[82] R. Freije, T. Klein, B. Ooms, H.F. Kauffman, R. Bischoff, *J. Chromatogr., A* 1189 (2008) 417.
[83] P.L. Urban, D.M. Goodall, N.C. Bruce, *Biotechnol. Adv.* 24 (2006) 42.
[84] A.M. Girelli, E. Mattei, *J. Chromatogr., B* 819 (2005) 3.
[85] G. Massolini, E. Calleri, *J. Sep. Sci.* 28 (2005) 7.
[86] J. Krenkova, F. Foret, *Electrophoresis* 25 (2004) 3550.
[87] S. Koutsopoulos, K. Patzsch, W.T.E. Bosker, W. Norde, *Langmuir* 23 (2007) 2000.
[88] J.R. Freije, P.P.M.F.A. Mulder, W. Werkman, L. Rieux, H.A.G. Niederlander, E. Verpoorte, R. Bischoff, *J. Proteome Res.* 4 (2005) 1805.
[89] J. Vukovic, H. Loftheim, B. Winther, J.L.E. Reubsaet, *J. Chromatogr., A* 1195 (2008) 34.
[90] K.A. Cobb, M. Novotny, *Anal. Chem.* 61 (1989) 2226.
[91] J. Gobom, E. Nordhoff, R. Ekman, P. Roepstorff, *Int. J. Mass Spectrom.* 169-170 (1997) 153.
[92] J. Pedroche, M. del Mar Yust, C. Mateo, R. Fernandez-Lafuente, J. Giron-Calle, M. Alaiz, J. Vioque, J.M. Guisan, F. Millan, *Enzyme Microb. Technol.* 40 (2007) 1160.
[93] B.C.C. Pessela, G. Dellamora-Ortiz, L. Betancor, M. Fuentes, J.M. Guisan, R. Fernandez-Lafuente, *Enzyme Microb. Technol.* 40 (2007) 310.
[94] E. Kurimoto, T. Harada, A. Akiyama, T. Sakai, K. Kato, *J Biochem* 130 (2001) 295.
[95] M.T. Cancilla, M.D. Leavell, J. Chow, J.A. Leary, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 97 (2000) 12008.
[96] M. Malmsten, A. Larsson, *Colloids Surf., B* 18 (2000) 277.
[97] S.A. Busby, M.J. Chalmers, P.R. Griffin, *Int. J. Mass Spectrom.* 259 (2007) 130.
[98] L. Wang, H. Pan, D.L. Smith, *Mol Cell Proteomics* 1 (2002) 132.
[99] L. Riggs, C. Sioma, F.E. Regnier, *J. Chromatogr., A* 924 (2001) 359.
[100] M.M. Green, J.A. Gladner, L.W. Cunningham, H. Neurath, *J. Am. Chem. Soc.* 74 (1952) 2122.
[101] M.T. Davis, T.D. Lee, M. Ronk, S.A. Hefta, *Anal. Biochem.* 224 (1995) 235.
[102] E. Bonneil, M. Mercier, K.C. Waldron, *Anal. Chim. Acta* 404 (2000) 29.
[103] L. Lim, M. Tomatsu, T. Takeuchi, *Anal. Bioanal. Chem.* 386 (2006) 614.
[104] G.W. Slysz, D.C. Schriemer, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 17 (2003) 1044.
[105] B.E. Slentz, N.A. Penner, F.E. Regnier, *J. Chromatogr., A* 984 (2003) 97.
[106] E. Bonneil, K.C. Waldron, *Talanta* 53 (2000) 687.
[107] L.N. Amankwa, W.G. Kuhr, *Anal. Chem.* 64 (1992) 1610.
[108] L. Licklider, W.G. Kuhr, M.P. Lacey, T. Keough, M.P. Purdon, R. Takigiku, *Anal. Chem.* 67 (1995) 4170.
[109] J. Krenková, K. Klepárník, F. Foret, *J. Chromatogr., A* 1159 (2007) 110.
[110] E.C.A. Stigter, G.J. de Jong, W.P. van Bennekom, *Anal. Chim. Acta* 619 (2008) 231.
[111] E. Stigter, G. de Jong, W. van Bennekom, *Anal. Bioanal. Chem.* 389 (2007) 1967.
[112] J. Duan, Z. Liang, C. Yang, J. Zhang, L. Zhang, W. Zhang, Y. Zhang, *Proteomics* 6 (2006) 412.
[113] K. Zhang, S. Wu, X. Tang, N.K. Kaiser, J.E. Bruce, *J. Chromatogr., B* 849 (2007) 223.
[114] A.K. Palm, M.V. Novotny, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 18 (2004) 1374.
[115] J. Duan, L. Sun, Z. Liang, J. Zhang, H. Wang, L. Zhang, W. Zhang, Y. Zhang, *J. Chromatogr., A* 1106 (2006) 165.
[116] D.S. Peterson, T. Rohr, F. Svec, J.M.J. Frechet, *Anal. Chem.* 74 (2002) 4081.
[117] D.S. Peterson, T. Rohr, F. Svec, J.M.J. Frechet, *Anal. Chem.* 75 (2003) 5328.
[118] J. Krenkova, N.A. Lacher, F. Svec, *Anal. Chem.* 81 (2009) 2004.
[119] R.M. Schoenherr, M. Ye, M. Vannatta, N.J. Dovichi, *Anal. Chem.* 79 (2007) 2230.
[120] V.B. Kandimalla, V.S. Tripathi, H. Ju, *Crit. Rev. Anal. Chem.* 36 (2006) 73
[121] T.R. Besanger, R.J. Hodgson, J.R.A. Green, J.D. Brennan, *Anal. Chim. Acta* 564 (2006) 106.
[122] S. Hjertén, *J. Chromatogr., A* 347 (1985) 191.
[123] K. Sakai-Kato, M. Kato, T. Toyo'oka, *Anal. Chem.* 74 (2002) 2943.
[124] J. Ma, Z. Liang, X. Qiao, Q. Deng, D. Tao, L. Zhang, Y. Zhang, *Anal. Chem.* 80 (2008) 2949.
[125] R.J. Hodgson, Y. Chen, Z. Zhang, D. Tleugabulova, H. Long, X. Zhao, M. Organ, M.A. Brook, J.D. Brennan, *Anal. Chem.* 76 (2004) 2780.
[126] R.J. Hodgson, M.A. Brook, J.D. Brennan, *Anal. Chem.* 77 (2005) 4404.

CHAPITRE III : DEVELOPPEMENT D'UNE METHODE DE DIGESTION EN LIGNE

Ce chapitre est dédié à la caractérisation de réacteurs enzymatiques de trypsine et de pepsine en vue d'une digestion en ligne. Compte tenu de la complexité du système, une protéine modèle a été choisie pour les étapes de développement, le cytochrome *c*. Après avoir mis au point la digestion en solution du cytochrome *c* ainsi que la méthode d'analyse par LC-MS/MS, un outil de quantification simple sera développé.

Ensuite, la mise au point la digestion en ligne du cytochrome *c* sur support d'enzymes immobilisées sera réalisée à l'aide d'une colonne commerciale de trypsine immobilisée, la StyrosZyme^{TM}. Puis, différents supports de greffage seront évalués pour l'immobilisation de la trypsine. Afin de comparer les performances des différents IMERs synthétisés, un outil simple et rapide pourra être développé à l'aide du substrat chromogène BA*p*NA. Enfin, l'IMER de trypsine ainsi optimisé sera appliqué à la digestion en ligne du cytochrome *c*. Toute la méthodologie de développement de l'IMER sera ensuite transposée au développement de l'IMER de pepsine pour son application à la digestion en ligne du cytochrome *c*.

III.1. Une protéine modèle, le cytochrome *c*

Le cytochrome *c* a été choisi comme protéine modèle car c'est une protéine extrêmement bien connue par les biologistes tant au niveau de ses fonctions qu'au niveau de sa structure.

Le cytochrome *c* est présent au niveau de la membrane interne des mitochondries. C'est un transporteur d'électrons participant à la réduction de O_2 au niveau de la chaîne respiratoire. Ce transfert électronique, du complexe cytochrome réductase vers le complexe cytochrome oxydase, met en jeu l'hème du cytochrome *c*, c'est-à dire le noyau porphyrinique contenant du fer qui passe réversiblement de l'état ferrique (fer III) à l'état ferreux (fer II).

Le cytochrome *c* utilisé pour cette étude est le cytochrome *c* de cœur de cheval. Il est composé de 105 acides aminés et possède une masse moléculaire de 11,8 kDa. Sa séquence primaire est décrite en figure III-1.

1 Met Gly Asp Val Glu Lys Gly Lys Lys Ile Phe Val Gln Lys Cys **15**

16 Ala Gln Cys His Thr Val Glu Lys Gly Gly Lys His Lys Thr Gly **30**

31 Pro Asn Leu His Gly Leu Phe Gly Arg Lys Thr Gly Gln Ala Pro **45**

46 Gly Phe Thr Tyr Thr Asp Ala Asn Lys Asn Lys Gly Ile Thr Trp **60**

61 Lys Glu Glu Thr Leu Met Glu Tyr Leu Glu Asn Pro Lys Lys Tyr **75**

76 Ile Pro Gly Thr Lys Met Ile Phe Ala Gly Ile Lys Lys Lys Thr **90**

91 Glu Arg Glu Asp Leu Ile Ala Tyr Leu Lys Lys Ala Thr Asn Glu

Figure III-1 : Structure primaire du cytochrome c du cœur de cheval [1].

Le cytochrome *c* est globalement sphérique, avec un diamètre de 3,4 nm autour de l'hème lié aux deux cystéines de la protéine par des liaisons covalentes. La figure III-2 est une représentation de la structure tridimensionnelle de la protéine.

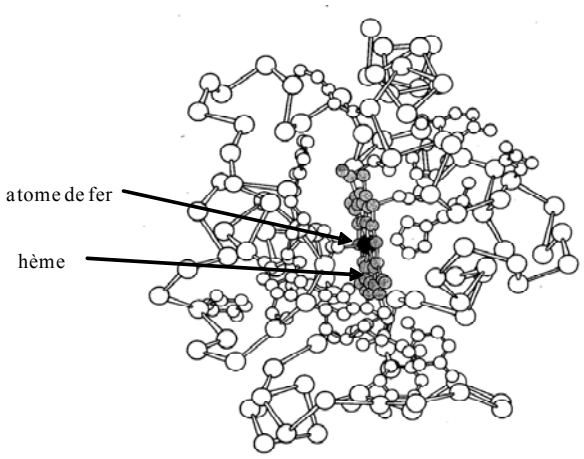


Figure III-2 : Structure tridimensionnelle du cytochrome c. Adapté de [2].

Le cœur de la molécule est hydrophobe et sa surface est composée d'une majorité de lysine chargées positivement, d'où une protéine hautement basique et très soluble dans l'eau. Son point isoélectrique est de 10,6. Cette protéine a aussi été choisie comme protéine modèle car elle contient seulement deux cystéines qui sont inaccessibles puisqu'elles participent à la liaison avec l'hème. Le cytochrome *c* ne contient donc pas de pont disulfure pouvant rendre la protéine plus rigide et conduire à une digestion longue et difficile

Dans cette étude, le choix du cytochrome *c* comme protéine modèle a également été motivé par la disponibilité d'anticorps monoclonaux dont la mise en œuvre est décrite dans le chapitre IV. Enfin, le cytochrome *c* a été choisi comme protéine modèle puisqu'il n'est pas présent dans le plasma et peut donc être dopé puis quantifié dans cette matrice.

III.2. Mise au point de l'analyse par LC-MS/MS

Deux enzymes de digestion ont été testées. Tout d'abord, la digestion en ligne a été mise au point avec la trypsine. Puis, le protocole mis au point a été transposé à une autre enzyme, la pepsine. Le développement de la digestion en ligne sur support d'enzymes immobilisées nécessite tout d'abord la mise au point de la méthode de séparation des peptides issus de la digestion. Pour cela, des digestions en solution du cytochrome *c* par de la trypsine ont été effectuées et les digestats ainsi obtenus ont été analysés par LC-MS/MS.

III.2.1. Montage expérimental pour l'analyse des peptides

Après digestion enzymatique, les peptides obtenus sont séparés par chromatographie liquide et détectés par spectrométrie de masse. La séparation chromatographique est effectuée en mode phase inverse sur une colonne de silice greffée octadécyle C_{18} de dimension 150 x 3 mm d.i.. La phase mobile est constituée d'eau et d'acétonitrile acidifiés à 0,1 % d'acide formique et un débit de 400 $\mu L.min^{-1}$. La détection est assurée, après ionisation électrospray, par un spectromètre de masse en mode MS/MS avec un piège à ions. Dans le cas de la trypsine, la digestion enzymatique est réalisée en milieu salin. Le mélange doit donc être dessalé avant la détection par spectrométrie de masse. Ceci a été réalisé à l'aide une précolonne de silice greffée octadécyle C_{18} (15 x 3,2 mm d.i) placée en amont de la colonne analytique. Le montage expérimental est décrit en figure III-3.

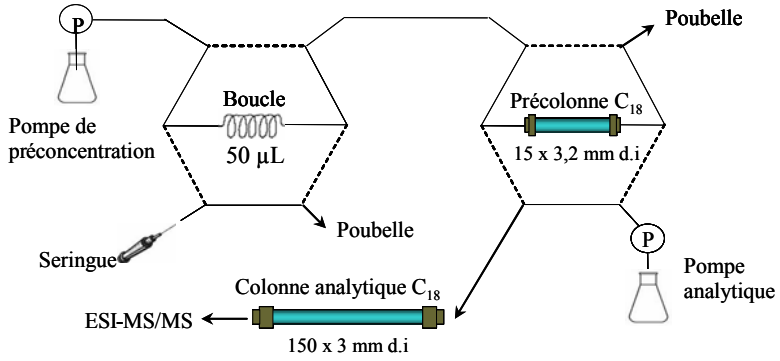


Figure III-3 : Schéma du montage pour l'analyse d'un digestat par LC-MS/MS.

Le protocole consiste à remplir la boucle d'injection de 50 µL par le digestat, puis par commutation de la première vanne, le mélange peptidique est transféré sur la précolonne de piégeage avec de l'eau pure délivrée par la pompe de préconcentration. Ainsi, la percolation

d'un mL d'eau (2 min à 500 µL.min^{-1}) permet d'éliminer les sels, ce qui correspond à plus de dix fois le volume mort de la précolonne de dessalage. Il est important de s'assurer que ce volume de dessalage n'engendre pas de perte des peptides retenus au niveau de la précolonne de piégeage, c'est-à-dire que le volume de fin de fixation ne soit pas dépassé. Après commutation de la deuxième vanne contenant la précolonne de piégeage, la phase mobile de la pompe analytique vient désorber les peptides pour les transférer vers la colonne analytique où ils seront séparés puis détectés par MS. La chaîne chromatographique utilisée, les conditions analytiques et les paramètres d'acquisition de la masse sont donnés en annexe 2.

III.2.2. Digestion trypsique en solution – Rappel des essais préliminaires

Comme mentionné au chapitre II, la digestion des protéines en vue de leur analyse est majoritairement effectuée avec de la trypsine comme enzyme de digestion car son mode de clivage est très spécifique. Les conditions de digestion trypsique sont aujourd'hui bien connues et ont déjà été décrites (pH 7-8 en présence de Ca^{2+}, 37°C). Dans cette étude, une solution tamponnée à pH 8 (tampon Tris à 50 mmol.L^{-1}) contenant 10 mmol.L^{-1} de $CaCl_2$ a été utilisée comme tampon de digestion trypsique. Concernant le ratio enzyme / substrat (E/S), une étude préliminaire a été menée au laboratoire [3]. Pour cela, des digestions en solution de cytochrome *c* avec différents ratios E/S (entre 1/20 et 1/200) ont été réalisées et, après analyse par LC-MS, les intensités des trois ions les plus intenses correspondant à des peptides du cytochrome *c* ont été comparées. Les résultats obtenus sont présentés sur la figure III-4.

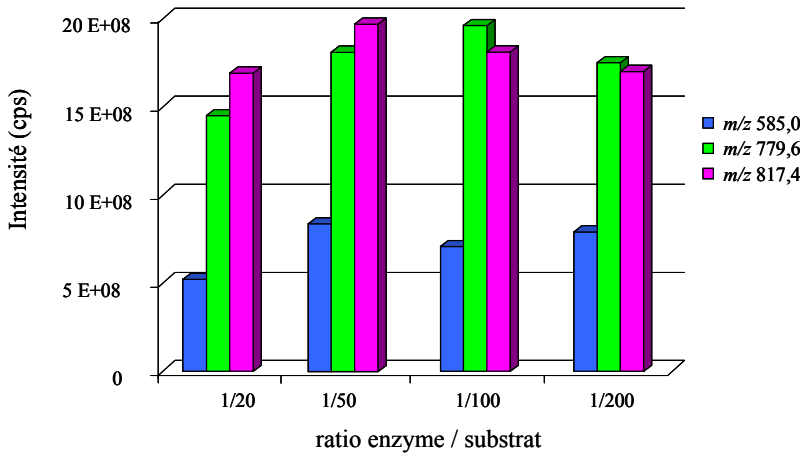


Figure III-4 : Influence du ratio enzyme / substrat (E/S) sur des ions des peptides issus de la digestion trypsique en solution du cytochrome c. Adapté de [3].

Comme l'illustre la figure III-4, peu de variations flagrantes ont été observées pour les différents ratios testés. Les ratios 1/50 et 1/100 semblent toutefois être le meilleur compromis car ils présentent des intensités légèrement supérieures par rapport aux deux autres ratios (1/20 et 1/200).

L'ajout de solvant organique comme le méthanol ou l'acétonitrile a également été étudié mais aucune amélioration sur l'efficacité de digestion, suivant ce mode d'évaluation, n'a été observée contrairement à ce que suggèrent certaines études [4]. En effet, les protéines ont tendance à se dénaturer en présence de solvant organique.

La durée de digestion est aussi un paramètre très important. La digestion en solution peut durer entre 4 et 20 heures et dépend non seulement de la quantité d'enzyme incubée mais aussi de la protéine à digérer. Pour vérifier cela, différentes digestions ont été effectuées suivant différents temps d'incubation. Comme précédemment, la figure III-5 reporte les intensités des 3 peptides choisis pour un ratio E/S de 1/100 en fonctions de la durée de digestion [3].

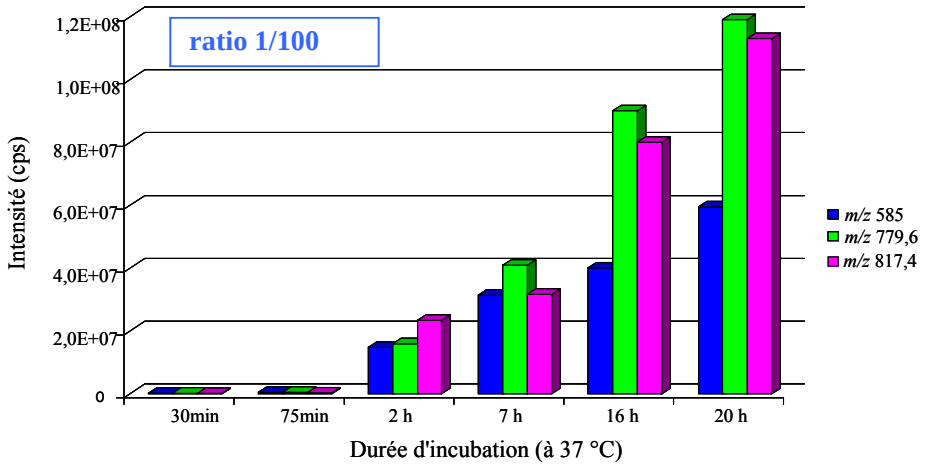


Figure III-5 : Influence de la durée de digestion sur l'intensité de trois ions des peptides issus de la digestion trypsique en solution dans un tampon Tris (50 mmol.L^{-1}, pH 8 + 10 mmol.L^{-1} de $CaCl_2$) avec un ratio enzyme / substrat (E/S) de 1/100. Adapté de [3].

Ainsi, 16 heures de digestion sont nécessaires pour garantir une digestion efficace en solution avec un ratio 1/100. Par la suite, un ratio de 1/50 a été choisi compte tenu des résultats similaires obtenus avec le ratio 1/100, la digestion sera également réalisée durant 16 heures. Enfin, de la trypsine traitée avec le TPCK (*Tosyl Phenyl Chloromethyl Ketone*) a été utilisée afin d'inhiber irréversiblement la chymotrypsine présente dans le milieu. La digestion en solution est stoppée en passant le digestat au réfrigérateur à 4 °C. Les conditions de digestion choisies pour la présente étude sont décrites en annexe 3.

III.2.3. Analyse du digestat trypsique par LC-MS/MS et identification du cytochrome c.

III.2.3.1. Analyse du mélange peptidique

Dans cette étude, 1 mL d'une solution de cytochrome *c* dopée à 100 µg.mL^{-1} est digérée en solution par de la trypsine durant 16 h à 37 °C et une fraction de 50 µL est injectée en LC-MS/MS, ce qui correspond à un équivalent de 5 µg injectés. La figure III-6 a) présente le chromatogramme du courant ionique total obtenu. Le courant ionique total présente de nombreux pics qui sont attribués aux peptides du cytochrome *c* par le logiciel bioinformatique MASCOT. A titre d'exemple, la figure III-6 b) présente le spectre de masse du peptide élué à 11,4 minutes (EETLMEYLENPK). Le spectre de masse contient des ions simplement et doublement chargés, ce dernier étant le plus intense dans ces conditions expérimentales. La figure III-6 c) présente aussi le spectre de collision de cet ion de rapport *m/z* 748,6 et les fragments sont annotés selon la nomenclature de Roepstoff et Fohlman [5]. Les fragments peuvent être de types a, b et c si la charge est portée par le côté N terminal ou x, y, z si la charge est portée sur le C terminal du peptide. Les deux types de fragments majoritaires sont les b et y.

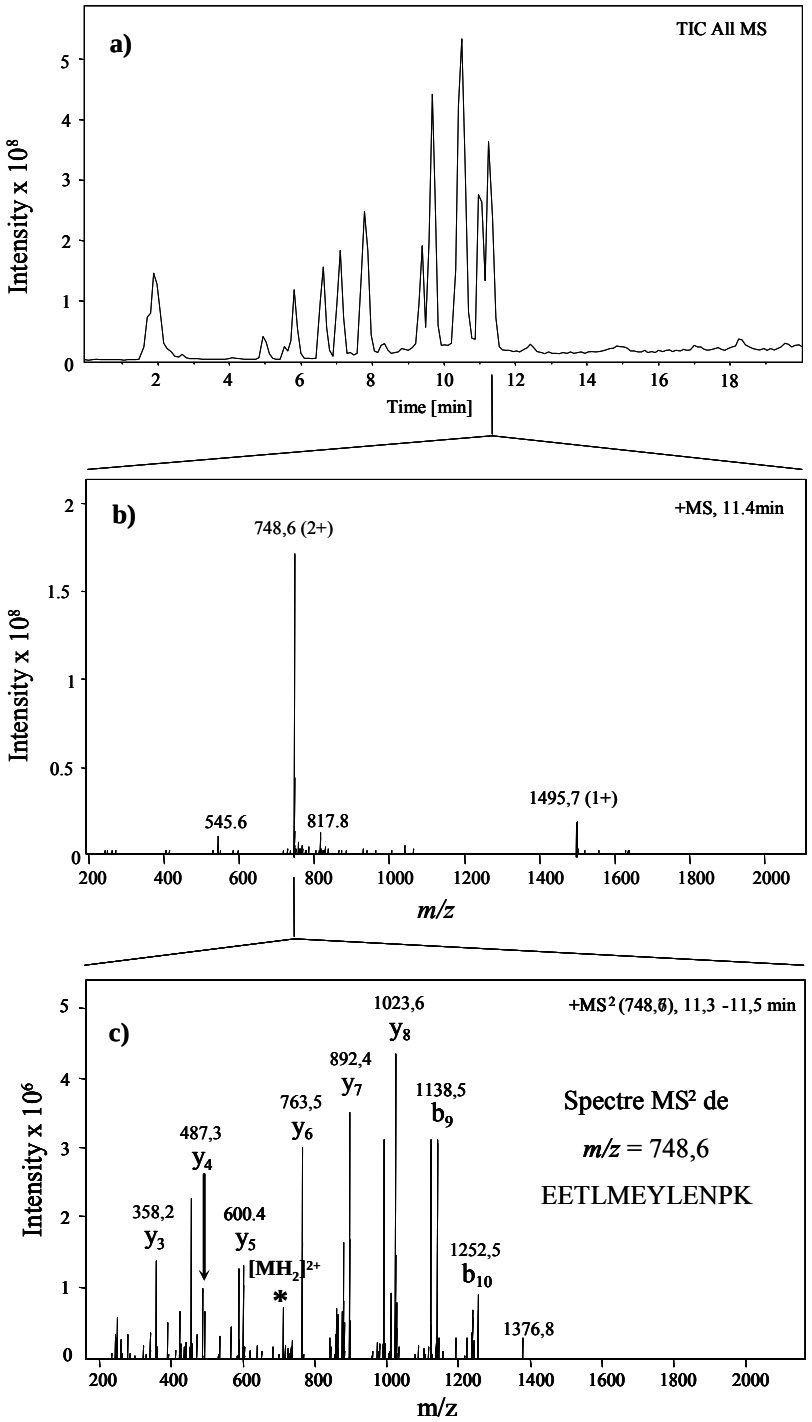


Figure III-6 : Résultats obtenus après l'analyse d'un mélange issu de la digestion en solution à la trypsine (E/S : 1/50) de 5 µg de cytochrome c (50 µL injecté). (a) Chromatogramme du courant ionique total (TIC) en mode MS. (b) Spectre de masse obtenu à 11,4 minutes. (c) Spectre de collision de l'ion précurseur de m/z 748,6.

Tous les spectres obtenus par analyse LC-MS/MS sont exportés vers le logiciel MASCOT (www.matrixscience.com) en mode *MS/MS Ion Search*. Ainsi, les spectres expérimentaux sont comparés aux spectres théoriques présents dans les banques de données. Le traitement du chromatogramme ainsi que les paramètres utilisés pour la reconnaissance du

cytochrome *c* par le logiciel MASCOT sont décrits en annexe 4. Le logiciel reconnaît la protéine en identifiant les peptides pouvant être attribués à cette protéine après digestion enzymatique. Lorsqu'une protéine est identifiée, un rapport y est associé indiquant les peptides identifiés, leur séquence, les fragments MS/MS correspondant, ainsi que le recouvrement de séquence.

Dans un premier temps, MASCOT n'ayant pas détecté de peptides résultant de l'autolyse de la trypsine, ils ont été recherchés « manuellement » sur le courant ionique total obtenu après digestion en solution de cytochrome *c*. En effet, le mélange de peptides issu d'une digestion en solution qui contient de la trypsine étant injecté en LC-MS, des peptides issus de l'autolyse de la trypsine sont probablement présents. Cinq peptides issus de l'autolyse ont bien été identifiés et sont listés dans le tableau III-1. Cependant, comparé aux peptides du cytochrome *c*, les intensités des peptides d'autolyse de la trypsine sont faibles, n'interférant en aucun cas ceux du cytochrome *c*.

Tr (min)	***m/z* détectés**	**Masse (Da) théorique**	**Position**	**Séquence**
8,5	577,4 (2+) ; 1153,6 (1+)	1152,6	146-156	SSGTSYPDVLK
9	549,3 (4+) ; 731,9 (3+)	2193	170-190	SAYPGQITSNMFCAGYLQGGK
10,2	748,7 (3+) ; 1137,1 (2+)	2273,2	90-109	SIVHPSYNSNTLNNDIMLIK

Tableau III-1: Liste des peptides d'autolyse de la trypsine détectés après digestion en solution

III.2.3.2. Identification du cytochrome *c*

Après digestion en solution de 5 µg de cytochrome *c* (0,43 nmol), MASCOT a bien reconnu la protéine. En effet, l'analyse des données a permis la reconnaissance de 19 ions de rapports *m/z* différents correspondant à 12 peptides spécifiques du cytochrome *c* avec un recouvrement de séquence de 77 %. Le rapport MASCOT obtenu est présenté en annexe 5. Trois autres digestions en solution ont été effectuées dans les mêmes conditions et leur analyse par LC-MS/MS répétée deux fois a permis d'identifier deux autres peptides. Ainsi, en cumulant tous les peptides détectés, 26 rapports *m/z* correspondant à 14 peptides ont été détectés par MASCOT et sont présentés sur le tableau III-2. Sont notés, les rapports *m/z* détectés, leurs états de charge, la masse et la séquence du peptide correspondant ainsi que les temps de rétention de chaque peptide, la position de chaque peptide dans la séquence d'acides aminés du cytochrome *c* et la présence ou nom d'un site de coupure manqué par la trypsine

(en gras). Finalement, en prenant en compte ces 14 peptides, le recouvrement de séquence correspondant est de 85 %.

Tr (min)	*m/z* détectés par Mascot	Charges	Masse (Da) du peptide correspondant	Séquences peptidiques	Positions	Coupure manquée
5,2	403,8 ; 806,5	2+ ; 1+	805,5	**K**YIPGTK	74-80	1
5,6	381,8	2+	761,5	**K**IFVQK	9-14	1
5,9	339,7 ; 678,5	2+ ; 1+	677,4	YIPGTK	75-80	0
6,6	634,5	1+	633,4	IFVQK	10-14	0
7,1	533,9 ; 800,1	3+ ; 2+	1597,8	**K**TGQAPGFTYTDANK	40-54	1
7,8	736,1	2+	1469,7	TGQAPGFTYTDANK	41-54	0
8,3	303,6 ; 454,9	3+ ; 2+	906,5	MIFAGI**K**K	81-88	1
9,4	390,4 ; 584,9 ; 1168,6	3+ ; 2+ ; 1+	1167,6	TGPNLHGLFGR	29-39	0
9,7	390,3 ; 779,5	2+ ; 1+	778,4	MIFAGIK	81-87	0
10,5	812,6	2+	1622,8	EETLMEYLENP**K**K	62-74	1
10,7	482,7 ; 964,6	2+ ; 1+	963,5	EDLIAYLK	93-100	0
11,1	545,6 ; 817,5	3+ ; 2+	1632,8	IFVQ**K**CAQCHTVEK	10-23	1
11,2	694,6 ; 1041,5	3+ ; 2+	2080	GITW**K**EETLMEYLENPK	57-73	1
11,4	499,2 ; 748,6 ; 1495,7	3+ ; 2+ ; 1+	1494,7	EETLMEYLENPK	62-73	0
				Nombre de peptides totaux reconnus par MASCOT		**14**
				Recouvrement de séquence correspondant (%)		**85**

Tableau III-2 : Peptides identifiés par MASCOT après 3 digestions en solution à la trypsine (E/S : 1/50) de 5 µg de cytochrome c (50 µL injecté). L'analyse par LC-MS/MS a été répétée 2 fois pour chaque digestat.

Compte tenu du grand nombre de peptides reconnus et donc d'un recouvrement de séquence important, la digestion en solution par la trypsine permet une digestion efficace du cytochrome *c*. Pour estimer l'efficacité de la digestion, la plupart des études utilisent le nombre de peptides détectés par les banques de données et le recouvrement de séquence obtenu [6-9]. Cependant, dans cette étude, après 3 analyses d'une même digestion de 5 µg de cytochrome *c*, les recouvrements de séquence obtenus par le logiciel MASCOT varient entre 61 % et 77 % et ceux obtenus après analyse de 4 digestats indépendants varient entre 48 et 77 % alors que les courants ioniques totaux obtenus sont très similaires. Ce manque de répétabilité a déjà été mentionné dans la littérature [10,11]. Par conséquent, l'utilisation des recouvrements de séquence ne semble pas être un outil suffisant pour évaluer les performances et la répétabilité de la méthode.

Un outil de quantification de la protéine par spectrométrie de masse a été mis au point en vue d'évaluer les performances des différents IMERs. Comme mentionné au chapitre I, la quantification des protéines par LC-MS est à l'heure actuelle un réel challenge. Les techniques par marquage sont les plus précises mais elles sont longues à mettre en œuvre et

surtout très coûteuses. L'outil de quantification développé dans cette étude est fondé sur la relation linéaire entre la quantité de protéine digérée et les aires des pics des peptides obtenus après digestion enzymatique [12]. Cette relation sera utilisée pour la quantification de la protéine, afin d'estimer la limite de quantification du cytochrome *c* après son analyse.

III.2.3.3. Méthode de quantification du cytochrome *c*

Le principe de quantification du cytochrome *c* proposé repose sur la mesure de l'aire de deux pics correspondant à deux peptides caractéristiques du cytochrome *c*.

A cet effet, le programme BLAST a été utilisé. Dans notre cas, tous les peptides identifiés ont été soumis à ce programme. Plus la valeur du score obtenu pour le cytochrome *c* (cœur de cheval) est élevée, plus la similitude est significative. De cette façon, 6 peptides ont été sélectionnés parmi les peptides du tableau III-2 car ils présentaient les meilleurs scores (entre 44,3 et 61,7). Il s'agit des peptides de masses 1597,8 ; 1469,7 ; 1622,8 ; 1632,8, 2080 et 1494,7 Da. La deuxième étape a consisté à extraire du courant ionique total, les ions des rapports *m/z* correspondant aux différents états de charge de ces peptides (Tableau III-2). Les pics obtenus ont été intégrés et les aires comparées. Ainsi les plus grandes aires ont été obtenues pour les ions de rapports *m/z* 736,1 ; 812,6 ; 817,5 et 748,6 correspondant respectivement aux peptides de masses 1469,7 ; 1622,8 ; 1632,8 et 1494,7 Da. Ces quatre rapports *m/z* correspondent à l'état doublement chargé des peptides. Huang *et al.* ont d'ailleurs démontré que la fragmentation d'un peptide doublement chargé est plus informative et caractéristique que celle d'un peptide simplement [13], ceci constitue un argument supplémentaire pour le choix de peptides doublement chargés. La figure III-7 présente la superposition des chromatogrammes d'extraction d'ions pour ces quatre rapports *m/z*.

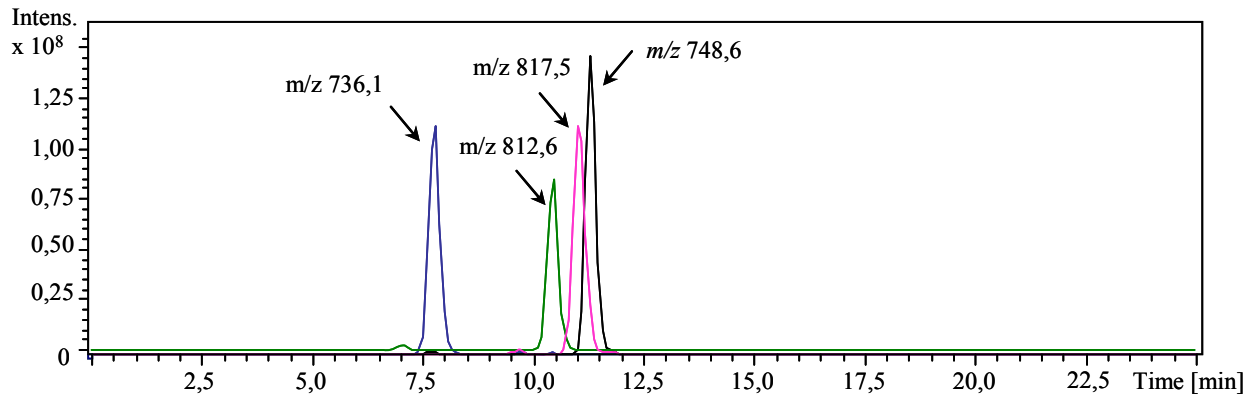


Figure III-7 : Chromatogramme de quatre ions extraits du courant ionique total (m/z 736,1, 812,6, 817,5 et 748,6) correspondant à quatre peptides du cytochrome c obtenus après analyse par LC-MS/MS d'un digestat trypsique (E/S : 1/50) de 5 µg de cytochrome c (50 µL injecté).

Finalement, les deux rapports *m/z* choisis pour la quantification du cytochrome *c* sont les rapports *m/z* 736,1 et *m/z* 748,6. Ils ont été choisis pour leur probabilité à appartenir au cytochrome *c* et leur intensité. De plus, ils correspondent à des peptides sans aucun site de coupure manqué, ce qui assure une digestion complète du peptide et donc une plus grande stabilité vis-à-vis de la digestion. En effet, les peptides présentant une rupture manquée ont eux, tendance à diminuer voire disparaître si la digestion est plus efficace [14].

Afin de démontrer la pertinence de cet outil, les deux pics correspondant aux deux ions de rapports *m/z* 736,1 et *m/z* 748,6 ont été intégrés pour les analyses répétées deux fois des 4 digestions indépendantes réalisées en solution. Les moyennes des aires relatives sont présentées sur la figure III-8, la valeur 100 % correspondant à l'aire la plus grande obtenue.

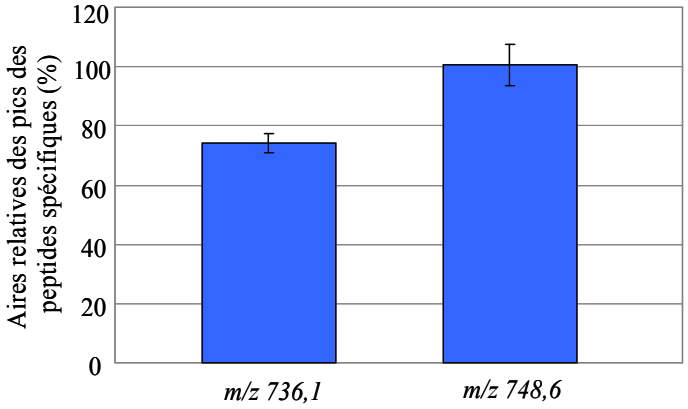


Figure III-8 : Diagramme représentant les aires des pics correspondant aux rapports m/z 736,1 et 748, 6 des deux peptides spécifiques du cytochrome c obtenus après les analyses répétées deux fois de 4 digestions à la trypsine (E/S : 1/50) de 5 µg de cytochrome c (50 µL injecté).

On peut noter que des coefficients de variations inférieurs à 7 % ont été obtenus pour les deux rapports *m/z* choisis. La bonne répétabilité des aires indique non seulement la bonne répétabilité de l'analyse par spectrométrie de masse mais aussi celle de la digestion en solution puisque 4 digestions différentes ont été effectuées. Cette répétabilité est bien meilleure que celle des recouvrements de séquence dont le coefficient de variation est de l'ordre de 25 %. En conclusion, l'outil développé est plus performant que le recouvrement de séquence.

A ce stade de l'étude, il était essentiel de vérifier si la réponse obtenue par la mesure des aires était linéaire avec la quantité de cytochrome *c* digérée. Pour cela, des quantités croissantes de cytochrome *c* comprises entre 0,17 et 3,5 nmol (2 et 40 µg) ont été digérées en solution avec un rapport E/S constant de 1/50 puis analysées par LC-MS/MS. La figure III-9 présente les aires des pics correspondant aux rapports *m/z* 748,6 et *m/z* 736,1 en fonction de la quantité de cytochrome *c* digérée.

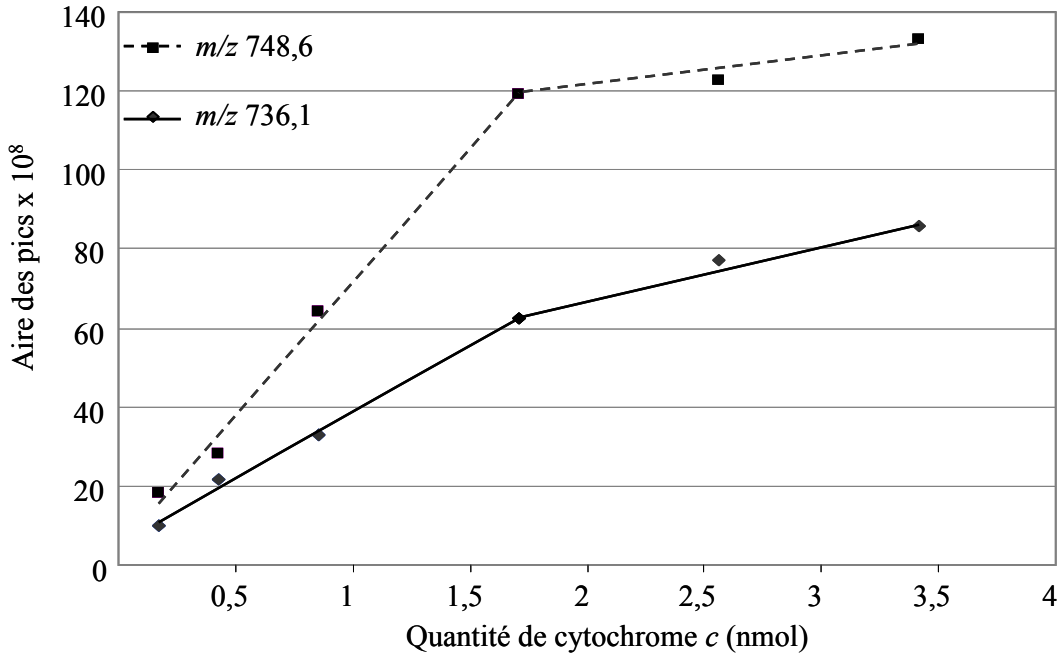


Figure III-9 : Aires des deux rapports m/z 736,1 et 748,6 correspondant aux deux peptides spécifiques du cytochrome c en fonction de la quantité de cytochrome c digérée en solution par la trypsine (E/S = 1/50) entre 0,17 et 3,5 nmol.

Comme le montre clairement la figure III-9, les aires des pics des deux peptides spécifiques sont bien proportionnelles à la quantité de cytochrome *c* digérée entre 0,17 et 1,7 nmol. L'outil de quantification peut donc être utilisé de façon pertinente dans cette gamme de concentration. Cette limite de 1,7 nmol n'est pas liée à la digestion puisque le rapport E/S a été maintenu constant, elle correspond donc à la gamme de linéarité du spectromètre de

masse. Dans la suite de cette étude, des quantités inférieures à 1,7 nmol (20 µg) seront analysées. Cette valeur n'est pas une limitation pour l'analyse des protéines ciblées puisque de plus faibles quantités sont généralement recherchées pour les protéines minoritaires.

Il est toutefois important de noter que l'ion de rapport *m/z* 736,1 correspondant au peptide de masse 1469,7 est le seul état de charge (2+) de ce peptide observé sur le spectre de masse, tandis que dans le cas de l'ion de rapport *m/z* 748,6, correspondant à l'état de charge 2+ du peptide de masse 1494,7 Da, deux autres ions correspondant à l'ion moléculaire et à l'état de charge 3+ sont observés sur le spectre de masse. Ceci peut expliquer les différences de comportement observées entre les deux ions spécifiques choisis pour la quantification du cytochrome c.

III.2.4. Analyse d'un digestat à la pepsine et identification du cytochrome c

D'autres enzymes peuvent être utilisées pour la digestion des protéines. La pepsine est une enzyme moins spécifique que la trypsine mais elle est aujourd'hui de plus en plus utilisée en raison de ses conditions de digestion acide.

Comme mentionné précédemment, le pH optimal de la digestion est situé entre 2 et 3. Par conséquent, l'acide formique à pH 2 a été utilisé comme condition de digestion. L'acide formique présente l'avantage d'être compatible avec la détection par spectrométrie de masse et a déjà été utilisé pour des digestions par la pepsine [15]. Pour le développement de la méthode d'analyse, le rapport E/S choisi est de 1/25 afin de s'assurer d'une digestion efficace du cytochrome *c*. Des digestions de 2 µg cytochrome *c* ont été réalisées en solution à pH 2 durant une nuit à 37 °C (annexe 3) puis le digestat est analysé par LC-MS/MS. Une fraction de la solution (20 µL) est ensuite directement injectée sur la colonne analytique *via* un passeur d'échantillon. En effet, la solution de digestion ne contenant pas de sel, elle est donc compatible avec la MS. L'analyse LC-MS est très similaire à celle utilisée pour l'analyse de digestats trypsique. La même colonne analytique C_{18} (150 x 3 mm d.i.) a été utilisée avec la même phase mobile. Le gradient a toutefois été modifié, mais les paramètres du piège à ions pour l'analyse MS/MS sont les même que ceux utilisés pour la trypsine (annexe 2).

Quatre digestions en solution du cytochrome *c* par la pepsine ont été effectuées et le courant ionique total obtenu en mode MS simple est présenté sur la figure III-10.

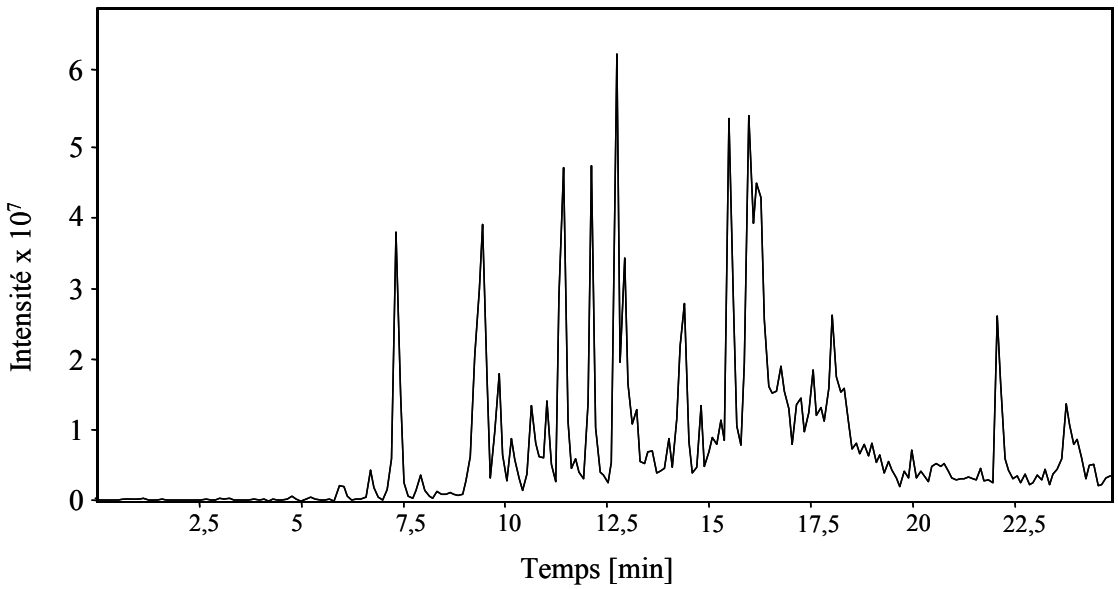


Figure III-10 : Courant ionique total en mode MS obtenu après l'analyse par LC-MS/MS d'un mélange issu de la digestion en solution à la pepsine de 5 µg de cytochrome c.

Après l'analyse par LC-MS/MS, le traitement des résultats par le logiciel MASCOT n'a pas permis systématiquement la reconnaissance du cytochrome *c* et dans le cas où la protéine est reconnue, le recouvrement de séquence obtenu est d'environ 30 %. Ceci peut s'expliquer par la faible spécificité de la pepsine. Le logiciel MASCOT recherche uniquement les ruptures au niveau des liaisons peptidiques dans lesquelles sont engagés un résidu phénylalanine ou un résidu leucine. Toutefois, d'autres sites de coupure ont été observés dans la littérature tels qu'au niveau des résidus alanine, tryptophane ou tyrosine [16,17]. L'outil MASCOT étant peu performant dans ce cas, les peptides du cytochrome *c* ont finalement été recherchés manuellement. Le logiciel *PeptideCutter* décrit au chapitre I a permis d'obtenir la liste des peptides théoriques pouvant être obtenus après digestion à la pepsine du cytochrome *c* provenant du cœur de cheval selon les paramètres entrés. En particulier, un site de clivage manqué a été autorisé. Chacun des peptides obtenus ainsi que leurs différents états de charge, de 1+ à 4+ a ont été recherchés sur le courant ionique total. Ainsi, 12 rapports *m/z* correspondant à 5 peptides ont été observés sur le courant ionique total obtenu après une digestion en solution de cytochrome *c*. Ces 5 peptides correspondent au final à un recouvrement de séquence de 65 %. Les résultats sont présentés dans le tableau III-3.

Tr (min)	*m/z* détectés par Mascot	Charges	Masse (Da) du peptide correspondant	Séquences peptidiques	Positions	Coupure manquée
7,3	348 ; 463,4 ; 694,5 ; 1387,8	4+ ; 3+ ; 2+ ; 1+	1386,8	AGIKKKTEREDL	84-95	0
9,5	509,8 ; 1018,4	2+ ; 1+	1017,5	GRKTGQAPGF	38-47	0
10,1	384,4 ; 575,9 ; 1150,6	3+ ; 2+ ; 1+	1149,6	IAYLKKATNE	96-105	1
12,8	704,5 ; 1056,4	3+ ; 2+	2111	TYTDANKNKGITWKRRTL	48-65	0
16,3	735	3+	2201	MEYLENPKKYIPGTKMIF	66-83	1
				Nombre de peptides totaux détectés		**5**
				Recouvrement de séquence correspondant (%)		**65**

Tableau III-3 : Peptides identifiés après analyse LC-MS/MS de 4 digestats à la pepsine de 5 µg de cytochrome c (20 µL injecté).

De la même manière que pour la digestion trypsique, deux peptides spécifiques ont été sélectionnés afin de quantifier le cytochrome *c*. Les aires des pics des rapports *m/z* des peptides issus de la digestion par la pepsine sont moins importantes que pour la digestion par la trypsine. Il a donc été choisi de sommer tous les rapports *m/z* observés correspondant aux différents états de charge observés de chacun des 5 peptides. Ces ions ont donc été extraits du courant ionique total et sommés, puis les pics obtenus ont été intégrés et comparés. Finalement, les deux peptides spécifiques du cytochrome *c* proposés sont ceux de masse 1386,8 Da et de masse 1017,5 Da puisque leurs réponses sont relativement intenses sur le chromatogramme et qu'ils n'ont pas de site de coupure manqué. La figure III-11 présente la réponse des deux peptides spécifiques en fonction de quantités croissantes de cytochrome *c* digérées entre 0,43 nmol et 3,4 nmol avec un rapport E/S constant. Chaque analyse a été répétée trois fois.

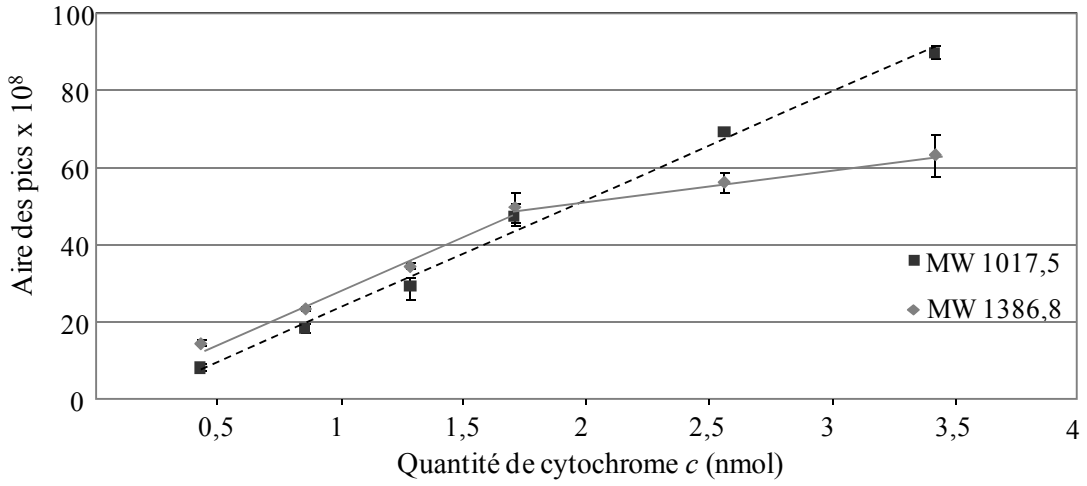


Figure III-11 : Somme des aires des pics correspondant aux différents rapports m/z des deux peptides spécifiques du cytochrome c de masses 1017,5 et 1386,8 Da en fonction de la quantité de cytochrome c digérée en solution par la pepsine (E / S = 1/25) entre 0,34 et 3,5 nmol (20 µL injecté), (n=3).

On peut tout d'abord observer la très bonne répétabilité de l'analyse avec des coefficients de variation inférieurs à 3 % pour les deux peptides. D'autre part, ces résultats montrent que les aires des deux peptides sont linéaires entre 0,43 et 1,7 nmol et entre 0,43 et 3,5 nmol pour les peptides de masses 1386,8 Da et 1017,5 Da respectivement. Ce résultat confirme la pertinence de l'outil de quantification développé pour la digestion du cytochrome *c* à la pepsine. De nouveau, il a été vérifié que la limite est liée à la gamme linéaire du spectromètre de masse.

Comme pour la trypsine, les deux peptides spécifiques choisis n'ont pas le même nombre d'états de charge observés sur leur spectre de masse, ce qui peut expliquer les différences de comportement entre les deux ions.

En conclusion, les digestions en solution du cytochrome *c* par la trypsine et la pepsine ont permis de confirmer l'efficacité de digestion de ces enzymes dans les conditions choisies et de mettre au point la méthode analytique. La trypsine et la pepsine ont montré de bons résultats avec des recouvrements de séquence de 77 % et de 65 % respectivement. Le choix de deux peptides spécifiques a permis d'évaluer la répétabilité de l'analyse chromatographique et de la digestion ainsi que d'estimer la gamme linéaire de quantification du cytochrome *c*. A cet stade, les contions de digestion et d'analyse mises au point, ces résultats nous permettent de développer la digestion en ligne sur support d'enzymes immobilisées.

III.3. Développement d'un microréacteur de trypsine

Après le développement de la méthode analytique d'un digestat trypsique, une digestion en ligne sur support d'enzymes immobilisées a tout d'abord été mise au point avec une colonne commerciale de trypsine immobilisée, la StyrosZyme™ (Orachrom). Cette colonne s'apparente fortement à la Poroszyme® utilisée dans de nombreuses études ces dernières années pour la digestion en ligne de protéines. En effet, ces deux colonnes sont à base d'un support polymérique organique, le polystyrène-divinylbenzène (PS-DVB) et sont de dimensions comparables.

III.3.1. Digestion en ligne sur un support commercial de trypsine immobilisée

III.3.1.1. Présentation du montage

La StyrosZyme™ est une colonne de trypsine immobilisée de dimensions 50 x 2,1 mm d.i. dont le support d'immobilisation est un monolithe à base de PS-DVB. Ce support présente donc une bonne résistance mécanique pour être couplé en ligne.

La digestion en ligne est réalisée selon le montage présenté sur la figure III-12. Le système est constitué, comme précédemment, d'une vanne d'injection et d'un système d'analyse LC-MS/MS incluant une précolonne de piégeage à base de silice greffée C_{18} (15 x 3,2 mm d.i.). Une vanne de commutation 6 voies a été en revanche ajoutée afin d'intégrer la colonne de digestion (IMER, « *IMmobilized Enzyme Reactor* ») au reste du système analytique.

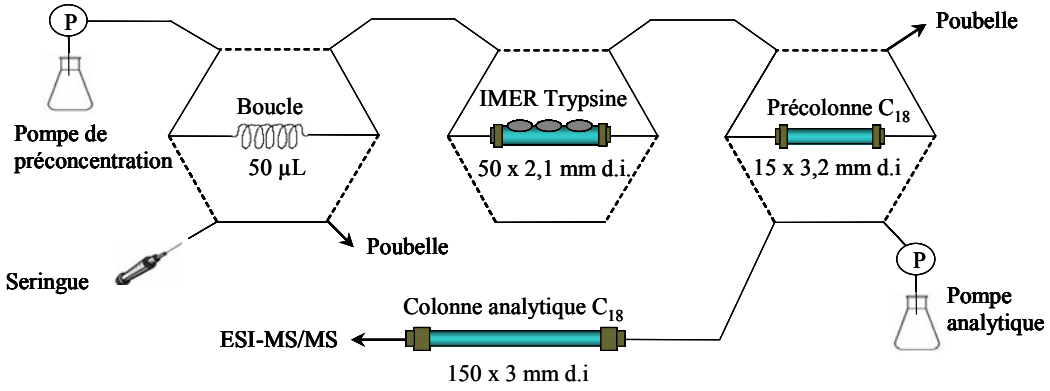


Figure III-12 : Schéma du montage de digestion en ligne sur le réacteur de trypsine comprenant un système de 3 vannes de commutation couplant la boucle d'injection, l'IMER de trypsine, une précolonne de piégeage et la colonne analytique connectée au spectromètre de masse.

Le protocole de digestion en ligne consiste alors à transférer le contenu de la boucle à l'aide du tampon de digestion vers la colonne d'enzymes immobilisées où la protéine est digérée. Les peptides ainsi générés sont transférés et piégés sur la précolonne contenant un support hydrophobe. Comme précédemment décrit, un dessalage à l'eau pure est ensuite réalisé. Enfin les peptides sont analysés par LC-MS/MS.

III.3.1.2. Développement d'une procédure de digestion en ligne

(i) Résultats préliminaires

Des études précédemment réalisées au laboratoire avec la colonne StyrosZyme^{TM} ont montré que la durée de digestion est effectivement grandement réduite grâce aux enzymes immobilisées puisque quelques minutes sont suffisantes pour une digestion efficace contre 16 heures en solution [18]. Cependant, avec la StyrosZyme^{TM}, un temps de contact de 20 minutes entre la trypsine et le cytochrome *c* est tout de même nécessaire pour garantir une digestion efficace du cytochrome *c*. Un tel temps de contact peut être assuré par un faible débit durant la percolation du mélange à digérer ou par arrêt du flux lorsque la solution à digérer se trouve au niveau du réacteur enzymatique. Le volume mort de la colonne StyrosZyme^{TM} étant estimé à 120 µL, un temps de contact de 20 minutes en flux continu dans la colonne StyrosZyme^{TM} ne peut donc être atteint qu'avec une vitesse linéaire de 2,5 mm.min^{-1} ce qui correspond à un débit de 6 µL.min^{-1}. Avec la pompe de préconcentration utilisée dans cette étude, ce débit ne peut être appliqué. Il a donc été choisi d'arrêter le flux pendant 20 minutes dans la colonne de digestion. Il est alors nécessaire d'optimiser le volume de transfert du cytochrome *c* de la boucle d'injection vers la colonne enzymatique en fonction du montage utilisé.

(ii) Optimisation du protocole de digestion en ligne sur la StyrosZyme^{TM}

Compte tenu du volume de la boucle (50 µL), des volumes des connectiques (15 µL) et du volume estimé de la colonne de digestion (120 µL), 185 µL de tampon de digestion doivent être en théorie percolés *via* la boucle pour transférer la totalité de l'échantillon sur la colonne de trypsine. Ce volume correspond à un temps de transfert de 110 secondes si le débit est fixé à 100 µL.min^{-1}. Le tampon de digestion utilisé est identique au tampon utilisé pour la digestion en solution (pH 8, présence de Ca^{2+}). Après le transfert de l'échantillon sur la colonne de digestion, le débit est arrêté durant 20 minutes puis la fin de la digestion est

provoquée par la reprise du débit. Les peptides générés sont alors transférés sur la colonne de dessalage par 500 µL de tampon de digestion. Le dessalage est alors effectué (comme précédemment pour l'analyse des peptides obtenus par digestion en solution) par percolation d'1 mL d'eau pure. Comme précédemment, la commutation de la vanne contenant la précolonne de piégeage permet ensuite à la phase mobile d'éluer les peptides vers la colonne analytique où ils seront séparés puis analysés par spectrométrie de masse dans les mêmes conditions analytiques que pour la digestion en solution (annexe 2). La procédure a été appliquée à la digestion de 5 µg de cytochrome *c*, elle est récapitulée dans le tableau III-4.

Etapes	Solvants utilisés
Chargement de la boucle	50 µL de tampon Tris (50 mmol.L^{-1}, pH 8) dopé à 5 µg de cytochrome *c*
Digestion en ligne	- transfert de la solution de cytochrome *c* vers la précolonne de digestion par 185 µL de tampon de digestion (Tris 50 mmol.L^{-1}, pH 8 avec 10 mmol.L^{-1} de $CaCl_2$) débit = 100 µL.min^{-1}) - arrêt du flux pendant 20 min - percolation de 500 µL de tampon de digestion vers la précolonne de dessalage (débit = 500 µL.min^{-1})
Dessalage	percolation de 1 mL d'eau pure (débit = 500 µL.min^{-1})
Séparation analytique	transfert des peptides de la précolonne de dessalage vers la colonne analytique par la phase mobile

Tableau III-4 : Protocole de digestion et analyse en ligne du cytochrome c sur la colonne de trypsine StyrosZyme™.

Tout d'abord, le volume de transfert estimé par le calcul a été vérifié expérimentalement. Il est donc attendu qu'en dessous du volume de transfert optimal, correspondant au volume mort du système, tout le cytochrome *c* n'a pas le temps d'atteindre la colonne de trypsine. En revanche, au-dessus de ce volume, une partie du cytochrome *c* dépasse la colonne de digestion et est envoyée à la poubelle. Ainsi, différents volumes de transfert ont été testés entre 100 et 200 µL tout en gardant le débit constant à 100 µL.min^{-1}. Pour comparer les différentes conditions, l'outil de quantification développé précédemment a été utilisé. Après digestion de cytochrome *c* sur la StyrosZyme™ et analyse en ligne, les pics des deux peptides spécifiques *m/z* 736,1 et *m/z* 748,6 ont été intégrés et les résultats obtenus sont présentés sur la figure III-13. Ainsi, six volumes de transfert différents ont été testés

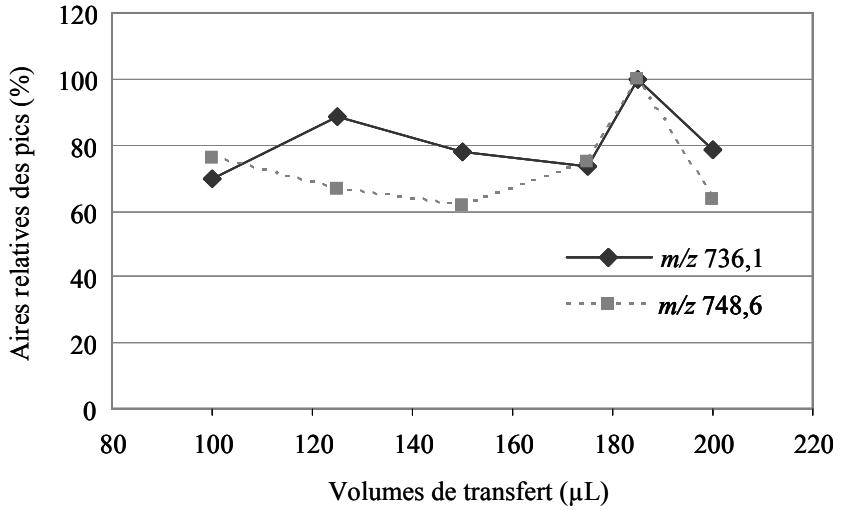


Figure III-13 : Aires relatives des pics des deux peptides spécifiques du cytochrome c de rapports m/z 736,1 et 748,6 obtenus après digestion en ligne sur la StyrosZyme™ durant 20 minutes en fonction des volumes de transfert appliqués entre la boucle d'injection et le réacteur enzymatique. Débit 100 µL.min^{-1}.

D'après la figure III-13, les aires des deux peptides spécifiques du cytochrome *c* ne montrent pas de tendance significative en fonction du volume de transfert. Le volume de transfert théorique, initialement choisi, a donc été conservé.

Le protocole de digestion couplé en ligne à l'analyse par LC-MS/MS a été répété 9 fois. Après transfert des données MS/MS, le cytochrome *c* est bien identifié grâce au logiciel MASCOT avec des recouvrements de séquence variant entre 54 % et 77 % similaires à la digestion en solution. Finalement, en prenant en compte ces 9 analyses, 27 rapports *m/z* correspondant à 13 peptides du cytochrome *c* ont été détectés. La liste des peptides obtenus est similaire à celle obtenue pour la digestion en solution (tableau III-2) à l'exception du peptide de masse 778,4 Da (séquence MIFAGIK) non reconnu par le logiciel MASCOT avec la StyrosZyme™. Ce peptide est en réalité détecté mais sous sa forme oxydée en fragments de rapports *m/z* 398,6 (2+) et *m/z* 795,4 (1+). En effet, ce peptide renferme un acide aminé méthionine très facilement oxydable.

(iii) Comparaison avec la digestion en solution de cytochrome c

Afin de comparer de façon plus approfondie les performances d'une digestion en ligne à celle en solution, les réponses des deux peptides spécifiques (*m/z* 736,1 et 748,6) obtenus après ces deux modes de digestion ont été comparées.

Nous disposions de deux colonnes de trypsine StyrosZyme™, une neuve nommée StyrosZyme (1) et une utilisée auparavant au laboratoire nommée StyrosZyme (2).

Dans un premier temps, la digestion en ligne de 5 µg de cytochrome *c* sur la colonne StyrosZyme™ (1) (n=3) a été comparée à celle obtenue après digestion en solution (E/S : 1/50, n=8) et les résultats sont illustrés sur la figure III-14.

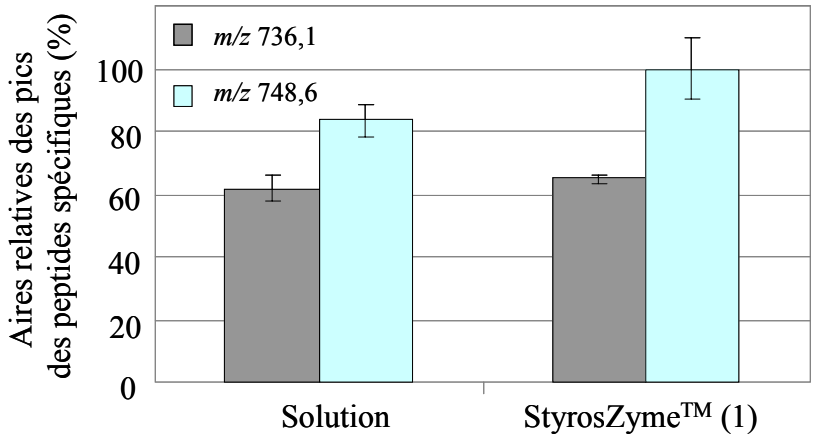


Figure III-14 : Aires relatives des deux peptides spécifiques du cytochrome c après digestion de 5 µg de cytochrome c (50 µL) en solution (E/S : 1/50) et en ligne sur la colonne commerciale de trypsine immobilisée StyrosZyme™ (1) (n= 8 pour la digestion en solution, n= 3 sur la StyrosZyme™ (1)).

On peut tout d'abord noter la répétabilité satisfaisante de la digestion couplée en ligne à l'analyse puisque des coefficients de variation de seulement 12 % ont été obtenus pour les deux peptides. Les réponses des deux peptides spécifiques après digestion en ligne sur la colonne StyrosZyme™ (1) sont similaires à celles obtenues après digestion en solution indiquant les très bonnes performances du protocole de digestion en ligne mis au point. En effet, les mêmes performances de digestion sont obtenues après digestion en solution durant 16 heures et après une digestion en ligne de 20 minutes sur support d'enzymes immobilisées confirmant le grand potentiel des enzymes immobilisées pour la digestion en ligne des protéines.

La colonne StyrosZyme (2) ne provenant pas du même lot que la colonne StrysosZyme (1), elles ont été comparées afin d'estimer la répétabilité de la synthèse. Les résultats sont présentés sur la figure III-15.

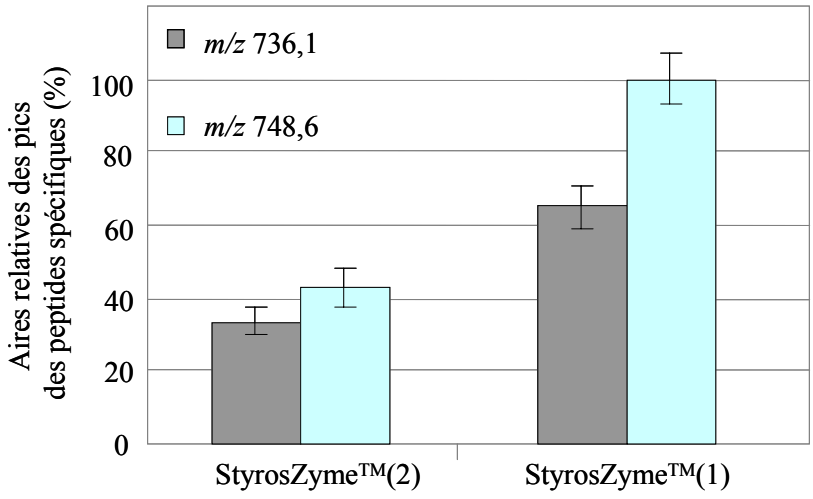


Figure III-15 : Aires relatives des deux peptides spécifiques du cytochrome c après digestion de 5 µg de cytochrome c (50 µL) sur les colonnes commerciales de trypsine immobilisée StyrosZyme™ (1) et StyrosZyme™ (2).

Une moins bonne efficacité de digestion sur la colonne StyrosZyme (2) a été clairement observée puisque les aires des pics des peptides spécifiques sont inférieures à celles obtenues avec la colonne StyrosZyme (1). Tout d'abord, on peut noter que malgré ces différences d'intensité observées, le nombre de peptide détecté par le logiciel MASCOT est le même pour les deux types de digestion. De même, les recouvrements de séquence sont en moyenne assez similaires pour la digestion en ligne sur les deux colonnes StyrosZyme™. La très grande variabilité des recouvrements de séquence obtenus comparés à la répétabilité de la méthode développée confirme que cette technique n'est pas totalement représentative de l'efficacité de la digestion enzymatique.

Les différences observées entre les deux colonnes StyrosZyme™ peuvent être liées à une mauvaise répétabilité de l'immobilisation de la trypsine pour la synthèse de ces IMERs commerciaux. En effet, pour des raisons de confidentialité, peu de renseignement nous ont été transmis sur la nature du greffage et sur la quantité de trypsine immobilisée. Toutefois, même si la nouvelle colonne utilisée ne provient pas du même lot que la première, une autre hypothèse consiste à expliquer les performances limitées de la StyrosZyme (2) auparavant utilisée par une dégradation des enzymes immobilisées dès le début de cette étude.

(iv) Stabilité de la colonne StyrosZyme™

Afin d'étudier la stabilité de l'IMER, la colonne StyrosZyme (2) a ensuite été utilisée pour une vingtaine de digestions en ligne du cytochrome *c* et, comme le montre la figure III-

16, on peut observer une chute rapide du signal des peptides spécifiques du cytochrome *c* au bout de 12 injections sur l'IMER.

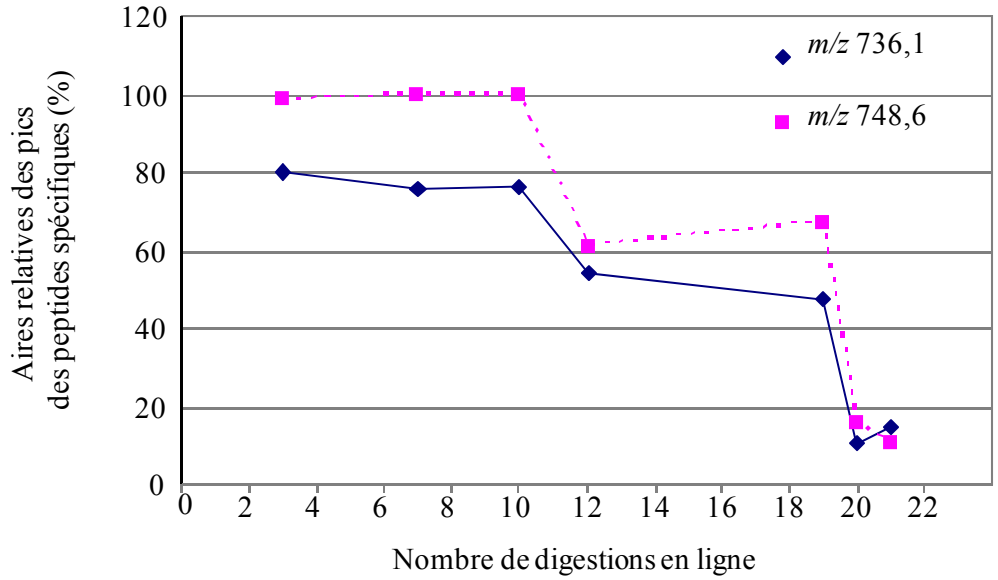


Figure III-16 : Aires relatives des deux peptides spécifiques du cytochrome c en fonction du nombre de digestions en ligne sur la colonne StyrosZyme™.

Les premières analyses présentées sur la figure ci-dessus correspondent aux digestions précédemment décrites sur la figure III-15 de la colonne StyrosZyme (2). Ces résultats mènent à penser que la colonne StyrosZyme (2) était dégradée lors de sa première utilisation pour cette étude. Toutefois, la durée de vie de la colonne StyrosZyme (2) est difficile à estimer puisque ce réacteur avait déjà été utilisé lors d'une précédente étude au laboratoire et le nombre de digestions effectuées est inconnu. Ainsi, seule la colonne StyrosZyme (1) a été utilisée à partir de ce stade.

En conclusion, une méthode efficace de digestion en ligne a été développée avec la colonne commerciale StyrosZyme™. L'inconvénient principal des colonnes commerciales d'enzymes immobilisées est leur prix élevé d'autant que la durée de vie limitée de ces colonnes a été observée. Pour ces raisons, nous nous sommes intéressés à l'immobilisation d'enzymes sur support solide de manière à ce que la quantité d'enzyme immobilisée et le support d'immobilisation soient contrôlés.

III.3.2. Synthèse et évaluation de réacteurs de trypsine

La méthode analytique et la digestion en ligne sur un support de trypsine commercial ayant été mises au point, l'objectif de l'étude est alors de synthétiser un réacteur de trypsine immobilisée.

III.3.2.1. Choix du support et principe du greffage covalent

De nombreux supports peuvent être utilisés pour l'immobilisation covalente des enzymes. L'étude bibliographique du chapitre II, nous amène à choisir des supports hydrophiles afin d'éviter les interactions non spécifiques hydrophobes entre la protéine à digérer et le support.

Dans le but de synthétiser un réacteur enzymatique, trois supports activés relativement hydrophiles ont été étudiés : un à base de silice activée glutaraldéhyde et deux autres à base de Sépharose fonctionnalisée par du CNBr ou du NHS. Les réactions illustrant l'immobilisation d'enzymes sur ces trois supports sont rappelées sur la figure III-17 et restent analogues à celles décrites au chapitre II pour l'immobilisation d'anticorps.

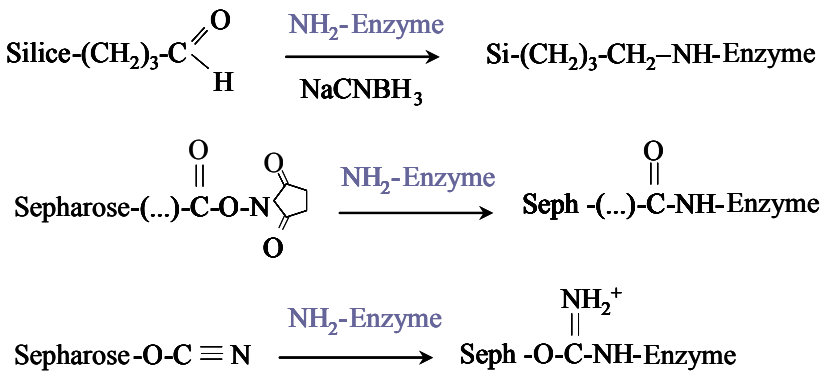


Figure III-17 : Greffage covalent d'une enzyme sur le support de silice activée par du glutaraldéhyde et sur les supports de Sépharose activés par du NHS et du CNBr.

Dans les trois cas, l'immobilisation a lieu entre une fonction amine de l'enzyme et la fonction réactive du support. Les protocoles d'immobilisation de la trypsine sur ces supports sont différents dans le cas de la silice et la Sépharose et sont présentés en annexe 6. Brièvement, les supports utilisés sont déjà activés. Après lavage de 25 mg de Sépharose ou de 30 mg de silice, l'enzyme est incubée dans un tampon de couplage durant une nuit à 4 °C.

Dans le cas de la silice glutaraldéhyde, la réaction aboutit en fait à une base de Schiff instable. L'ajout d'un hydrure comme le cyanoborohydrure de sodium ($NaCNBH_3$) permet la réduction de la fonction imine et donc la stabilisation de la liaison avec l'enzyme. Afin de comparer les supports d'immobilisation, 1 mg de trypsine dans le tampon de couplage a été utilisé pour l'immobilisation sur le même volume de support de support correspondant à 30 mg pour la silice et 25 mg pour la Sépharose. Une fois la trypsine immobilisée, les phases solides sont conditionnées dans des précolonnes de dimension 20 x 2 mm d.i. Les quantités de phase de 25 mg de Sépharose et de 30 mg de silice correspondent en fait aux quantités nécessaires pour remplir au mieux la précolonne en minimisant au maximum les volumes morts. Au final, trois IMERs synthétisés, nommés dans le tableau III-5, ont été comparés au support StyrosZyme™.

Support	***Fonctionnalisation***	***Taille de la précolonne***	***Nom***
Silice (30 mg)	Glutaraldéhyde (Glu)	20 x 2 mm I.D	Si-Glu
Sépharose (25mg)	Bromure de cyanogène (CNBr)	20 x 2 mm I.D	Seph-CNBr
Sépharose (25mg)	N-Hydrosuccinimide (NHS)	20 x 2 mm I.D	Seph-NHS
Polymère	Stryrene-divinylbenzene	50 x 2.1 mm I.D	StyrosZyme™

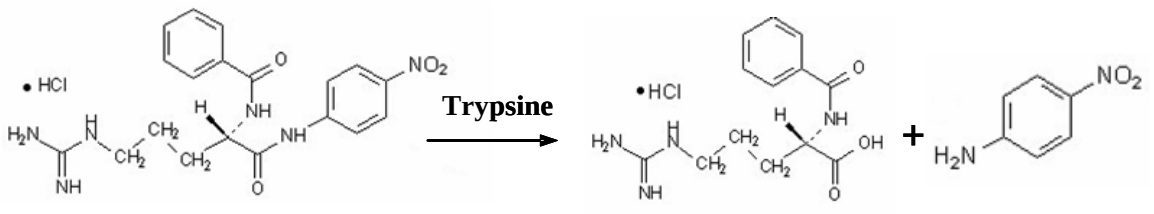
Tableau III-5 : Description des différents microréacteurs enzymatiques utilisés.

III.3.2.2. Principe d'évaluation des performances des réacteurs enzymatiques

(i) Choix d'un outil de quantification

Afin de caractériser les supports de trypsine immobilisée, un outil simple de caractérisation a été mis au point en UV. En effet, même si l'outil de quantification développé précédemment avec le cytochrome *c* s'avère performant, l'analyse par spectrométrie de masse reste longue et moins répétable qu'une simple détection UV, en particulier dans le cas du piège à ions.

A cet effet, un substrat chromogène spécifique de la trypsine, le BA*p*NA (N-α-Benzoyl-Arginine-*p*-NitroAnilide) est utilisé. Ainsi, le BA*p*NA, une fois hydrolysé par la trypsine, libère un composée jaune, le *p*-NA (*p*-nitroaniline) qui pourra être détecté en UV-visible. La figure III-18 présente la formation du produit *p*-NA après la digestion du BA*p*NA par la trypsine.



N-α-Benzoyl-Arginine p-Nitroanilide (BApNA) p-Nitroaniline (p-NA)

Figure III-18 : Schéma de la digestion du N-α-Benzoyl-Arginine-p-NitroAnilide (BApNA) par la trypsine.

Comme décrit précédemment, le BA*p*NA a été utilisé pour étudier les caractéristiques cinétiques de réacteurs enzymatiques ou pour mesurer la quantité d'enzymes immobilisées [19]. Dans notre étude, ce substrat a permis de comparer quantitativement les performances des différents réacteurs par la mesure d'un réel rendement de digestion beaucoup plus fiable que le recouvrement de séquence. En percolant une solution contenant n moles BA*p*NA (n_{BApNA}) sur les colonnes d'enzymes immobilisées, l'absorbance mesurée est directement proportionnelle à la quantité de *p*-NA libéré ($n_{p\text{-}NApr}$) et permet de remonter au rendement de la réaction appelé rendement de digestion (RD%): La première étape a donc consisté à mettre au point la méthode d'analyse.

$$RD(\%) = \frac{n_{p-NApr}}{n_{BApNA}} x100$$

(ii) Mise au point d'une méthode d'analyse du BApNA et du p-NA

Le BA*p*NA ayant une solubilité limitée dans les solutions aqueuses, une solution mère de BA*p*NA a été préparée dans du diméthylformamide (DMF), puis les solutions de plus faibles concentrations ont été préparées par dilution dans le tampon de digestion précédemment décrit (tampon Tris 50 mmol.L^{-1} pH 8, 10 mmol.L^{-1} $CaCl_2$). La chaîne analytique utilisée est la même que la chaîne décrite en annexe 2 à l'exception que le seul détecteur utilisé est un détecteur UV-visible à barrette de diodes. La colonne analytique utilisée est la même que précédemment, c'est-à-dire une colonne de silice greffée octadécyle de dimensions 150 x 3 mm d.i. En revanche, la phase mobile a été modifiée. En effet, afin d'optimiser la rétention du BA*p*NA par interactions hydrophobes, une phase mobile tamponnée à pH 7 a été utilisée pour que le BA*p*NA soit sous forme moléculaire. Pour illustration, la figure III-19 présente les chromatogrammes obtenus pour l'injection de 20 µL d'une solution de 0,05 mmol.L^{-1} de *p*-NA et de BA*p*NA ainsi que les spectres correspondant

montrant des maxima d'absorbance à 380 nm pour le *p*-NA et à 310 nm pour le BA*p*NA. On peut observer que les deux composés sont bien séparés avec des temps de rétention de 4,5 min et de 11,5 min pour le *p*-Na et pour le BA*p*NA respectivement.

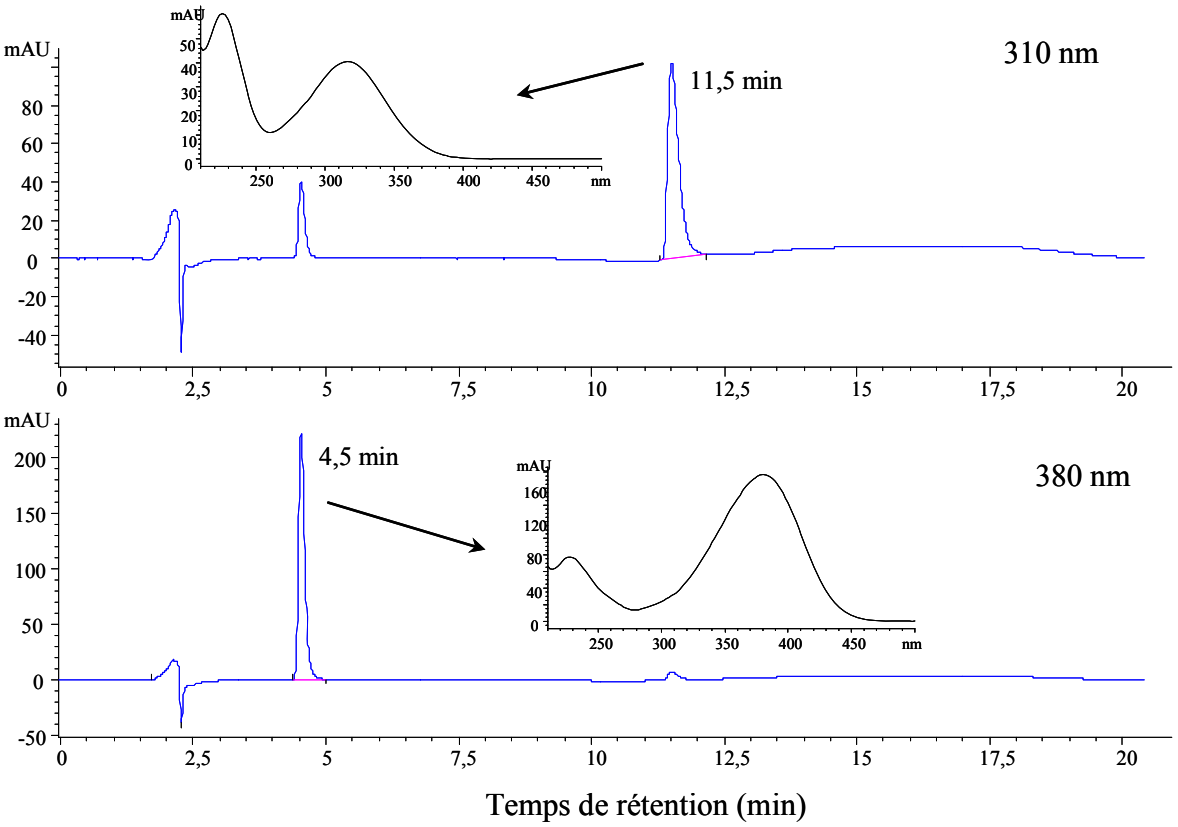


Figure III-19 : Chromatogrammes et spectres obtenus par détection UV à 310 nm et à 380 nm avec un détecteur à barrette de diodes après la séparation d'un mélange de p-NA et de BApNA à 0,05 mmol.L^{-1} (20 µL).

Des droites d'étalonnage du BA*p*NA et du *p*-NA ont été établies entre 20 pmol et 40 nmol avec des coefficients de régression linéaires de 0,999.

(iii) Mise au point de la digestion en ligne du BApNA sur les IMERs de trypsine

Pour le couplage du réacteur enzymatique avec l'analyse développée ci-dessus, le montage est le même que précédemment à l'exception du détecteur et est schématisé sur la figure III-20.

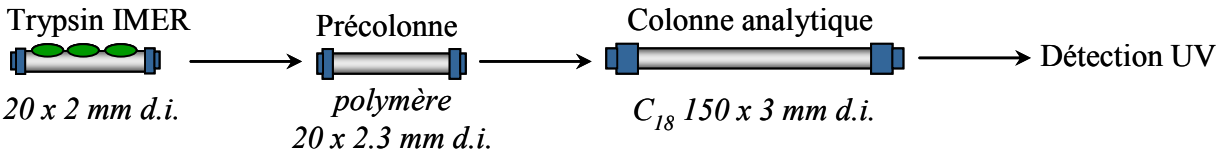


Figure III-20 : Principe du montage utilisé pour la digestion du BApNA sur l'IMER de trypsine.

Il est à noter que même si l'étape de dessalage n'est pas obligatoire compte tenu d'une détection par UV-visible, la précolonne de piégeage entre le réacteur enzymatique et la colonne analytique a été conservée. En effet, les supports à bases de Sépharose utilisés pour l'immobilisation de la trypsine ont une faible résistance mécanique ; ils ne résistent pas à des pressions supérieures à 3-4 bars. La précolonne de piégeage, générant peu de perte de charge, permet alors un couplage de l'IMER à base de Sépharose avec la colonne analytique. La précolonne utilisée précédemment était constituée d'un support de silice greffée C_{18}. En revanche, une précolonne à base d'un polymère de poly(styrène-divinylbenzène) (PRP-1, Hamilton) de dimension 20 x 2,3 mm d.i a été préférée par rapport à une précolonne C_{18} car elle est beaucoup plus résistante aux conditions de pH de la solution de digestion (pH 2).

Comme précédemment, la méthode d'analyse du *p*-NA et du BA*p*NA développée a tout d'abord été adaptée au montage afin de fixer les volumes de transfert entre le futur IMER et la colonne de piégeage. Des solutions de *p*-NA et de BA*p*NA ont été percolés à 100 µL.min^{-1} par le tampon de digestion de la boucle de 20 µL vers la précolonne de piégeage par différents volumes de tampon de digestion (entre 0,6 mL et 2 mL). Immédiatement après le transfert, la vanne 6 voies contenant la précolonne de piégeage commute et la phase mobile élue le *p*-NA et le BA*p*NA vers la colonne analytique où ils seront séparés par le gradient mis au point précédemment. La figure III-21 présente les aires relatives des deux composés BA*p*NA et *p*-NA après percolation de 0,6 à 2 mL de tampon de digestion.

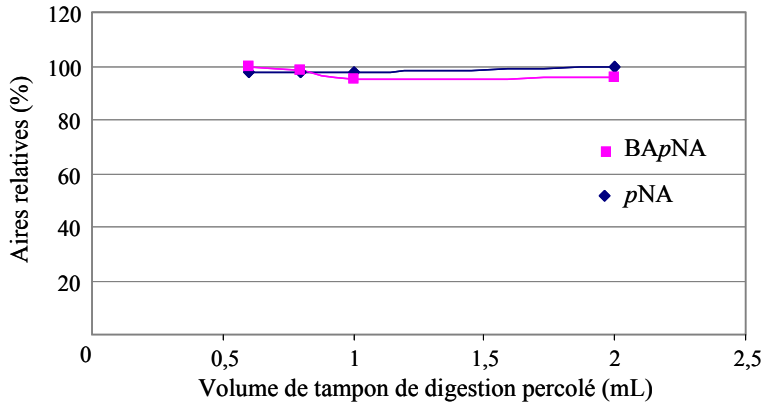


Figure III-21 : Aires relatives du BApNA et du p-NA en fonction du volume de tampon de digestion percolé.

Comme le montre la figure III-21, pour tous les volumes de transfert appliqués, les réponses pour ces deux composés sont identiques indiquant que 0,6 mL est suffisant pour atteindre la précolonne PRP-1 et que les deux composés sont toujours bien retenus après percolation de 2 mL de tampon de digestion. De plus, on peut noter qu'avec ce montage, toute la quantité de BA*p*NA ou de *p*-NA injectée est retrouvée confirmant la bonne linéarité de la méthode mise au point.

Cependant, une augmentation de la pression de la colonne analytique a été observée au fur et à mesure des analyses probablement due à la précipitation des sels du tampon de digestion en présence d'acétonitrile. Une étape de dessalage par percolation d'eau pure est donc tout de même réalisée afin de préserver la colonne analytique. Ainsi, en appliquant un volume de transfert de 600 µL, différents volumes d'eau pure percolée ont été testés pour le dessalage allant de 0,2 à 1 mL (500 $\mu L.min^{-1}$). De nouveau, aucune perte des composés sur la précolonne n'a été observée. En conclusion, lors du couplage avec le réacteur enzymatique, le transfert de l'analyte de la boucle (20 µL) vers la précolonne *via* l'IMER sera assuré par 800 µL de tampon de digestion puis 1 mL d'eau pure sera percolée pour dessaler l'échantillon. En effet, le volume de transfert choisis est de 800 µL au lieu de 600 µL puisque l'insertion de l'IMER (44 µL) et des connectiques (<20 µL) induira un volume mort plus important qui est largement compensé par les 200 µL supplémentaires.

III.3.2.3. Evaluation des réacteurs enzymatiques

(i) Principe et procédé d'évaluation

A l'aide du substrat spécifique BA*p*NA, les rendements de digestion obtenus sur les trois IMERs préparés au laboratoire ont été mesurés et les résultats obtenus ont été comparés à la digestion sur le support de trypsine commercial et à la digestion en solution.

Comme précédemment décrit, les réacteurs de trypsine synthétisés au laboratoire sont préparés à base de trypsine immobilisée de façon covalente sur un support de Sépharose activée CNBr, un autre activé NHS et un support de silice activée glutaraldéhyde.

L'intégration de ces réacteurs enzymatiques au montage précédemment décrit (figure III-12) va permettre de réaliser la digestion en ligne du BA*p*NA. De cette façon, le *p*-NA libéré ainsi que le BA*p*NA non digéré sont transférés sur la précolonne PRP-1 avant d'être élué vers la colonne analytique par la phase mobile. Enfin, la comparaison des réacteurs

enzymatiques est réalisée en calculant les rendements de digestion de chaque réacteur de trypsine.

La cinétique de digestion du BA*p*NA étant supposée beaucoup plus rapide que celle de protéines, de masse moléculaire beaucoup plus élevé, la digestion est effectuée en flux continu à 100 µL.min^{-1}. Ainsi, le protocole consiste à transférer la solution de substrat (20 µL) vers la précolonne PRP-1 en passant par le réacteur de trypsine par percolation de 800 µL de tampon de digestion à 100 µL.min^{-1} puis de 1 mL d'eau pure permettant le dessalage de l'échantillon avant la séparation chromatographique. Le protocole de digestion est décrit dans le tableau III-6.

	Solvants utilisés
Echantillon	20 µL de tampon Tris (50 mM, pH 8) dopé à 0,2 nmol de BA*p*NA
Digestion en ligne	- transfert de la solution de BA*p*NA vers la précolonne de digestion puis vers la colonne de piégeage par 800 µL de tampon de digestion (Tris 50 mmol.L^{-1}, pH 8 avec 10 mmol.L^{-1} de $CaCl_2$). Débit = 100 µL.min^{-1}
Dessalage	percolation de 1 mL d'eau pure (débit = 500 µL.min^{-1})
Séparation analytique	transfert du *p*-NA et du BA*p*NA non hydrolysé de la précolonne de dessalage vers la colonne analytique par la phase mobile : Tampon phosphate (pH 7)/MeCN. Gradient : de 35 à 85 % MeCN en 14 minutes, débit : 0,4 mL.min^{-1}.

Tableau III-6 : Protocole de digestion et analyse en ligne du BApNA sur les IMERs de trypsine préparés au laboratoire.

(ii) Essais préliminaires sur le support de trypsine à base de Sépharose CNBr

Les premiers essais ont été effectués en percolant une solution de 20 µL de BA*p*NA à 0,01 mmol.L^{-1} (0,2 nmol) sur le réacteur à base de Sépharose CNBr préparé à partir de 1 mg de trypsine. La figure III-22 présente les chromatogrammes obtenus à 310 nm et à 380 nm après digestion en ligne de 0,2 nmol de BA*p*NA sur cet IMER.

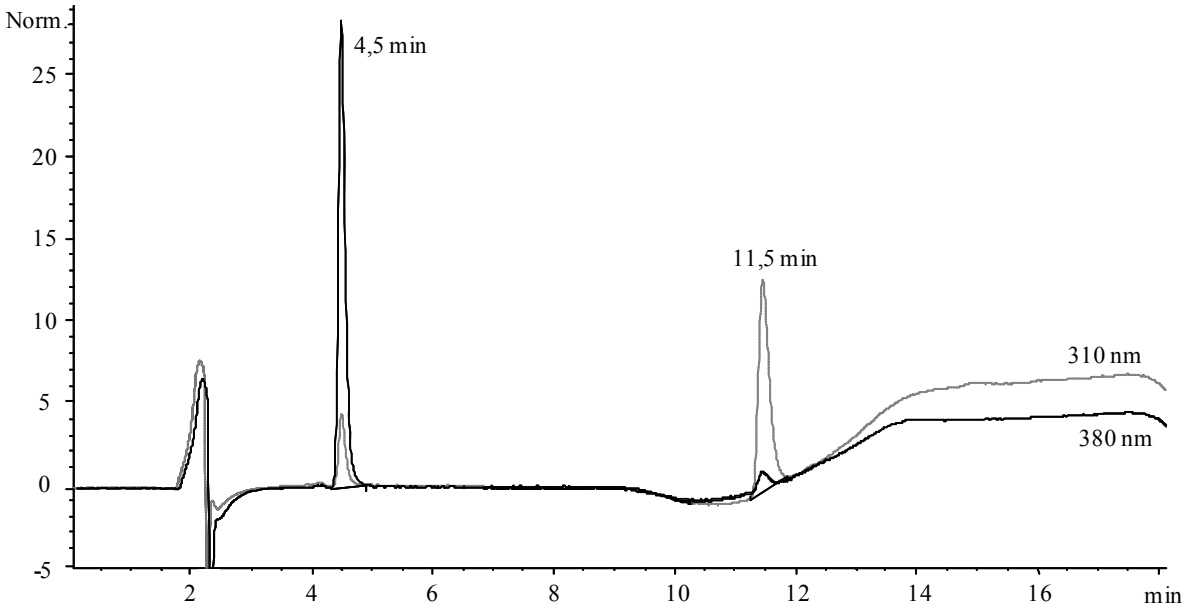


Figure III-22 : Chromatogrammes obtenus par détection UV à 310 nm et à 380 nm après la digestion en ligne de 0,2 nmol de BApNA sur l'IMER à base de Sépharose CNBr préparé avec 1 mg de trypsine.

On peut observer la présence de BA*p*NA non digéré, indiquant que le rendement n'est pas de 100 %. En effet, en appliquant 6 fois le protocole cité ci-dessus, des rendements de digestion d'environ 60 % avec un coefficient de variation de 3,5 % ont été obtenus. Le taux de récupération a été estimé en faisant le rapport de la quantité totale de *p*-NA et de BA*p*NA résiduel détecté sur la quantité de BA*p*NA initialement introduite. Le taux de récupération obtenu est proche de 100 % montrant qu'aucune interaction non spécifique n'a lieu entre le substrat ou le produit et le support du réacteur de trypsine.

Des essais pour améliorer ce rendement de digestion ont été effectués sur ce même réacteur enzymatique en diminuant le débit à 50 µL.min^{-1} ou, comme pour la digestion du cytochrome *c*, en laissant un temps de contact de 20 minutes entre le BA*p*NA et la trypsine immobilisée en « stop-flow ». L'augmentation du temps de contact entre le BA*p*NA et la trypsine immobilisée n'a pas amélioré le rendement de digestion. Si ce n'est pas, à priori, un problème cinétique, cette valeur de rendement peut être attribuée à une faible affinité entre le substrat et l'enzyme, liée au fait qu'un seul site de coupure soit présent dans le BA*p*NA. Le protocole de digestion en ligne initialement établi et décrit dans le tableau III-6 a donc été conservé pour comparer les trois IMERs préparés.

(iii) Comparaison des supports

a) Principe

Le protocole de digestion en ligne du BA*p*NA ainsi développé a été appliqué aux trois réacteurs de trypsine immobilisée (Séph-CNBr, Séph-NHS et Si-Glu). Une solution de 0,2 nmol de BA*p*NA a donc été digérée à trois répétitions sur chaque IMER selon le protocole décrit dans le tableau III-6 et les rendements de digestion obtenus ont été calculés. De plus, la proportion de substrat résiduel, c'est-à-dire la quantité de BA*p*NA non digérée, est mesurée ce qui permet de calculer le taux de récupération par rapport à la quantité de BA*p*NA initialement introduite. Des digestions de BA*p*NA en solution et sur la colonne StyrosZyme^{TM} ont également été réalisées.

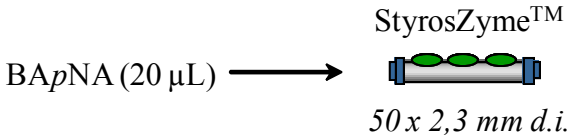
b) Digestion en solution

Le protocole de digestion en solution du BA*p*NA utilisé est similaire à celui décrit pour la digestion du cytochrome *c*, c'est-à-dire une digestion à 37 °C dans un tampon tris 50 mmol.L^{-1} pH 8 contenant 10 mmol.L^{-1} de $CaCl_2$ avec un rapport E / S = 1/50. Finalement, une fraction du digestat correspondant à 0,2 nmol (20 µL) de BA*p*NA initialement introduit est transférée directement vers la précolonne de dessalage avant d'être analysée par LC-UV.

c) Digestion sur le support commercial de trypsine

La colonne StyrosZyme^{TM} étant de plus grande dimension que les colonnes préparées au laboratoire (50 x 21 mm d.i.), un nouveau protocole a du être développé. En effet, en appliquant le protocole développé pour les IMERs préparés au laboratoire, ni le *p*-NA, ni le BA*p*NA ne sont détectés lors de l'analyse. Le produit et le substrat semblent être retenus sur le support de la colonne StyrosZyme^{TM} par des interactions non spécifiques hydrophobes. L'élution de ceux-ci peut être réalisée en percolant des solvants organiques tels que l'acétonitrile et le méthanol. Cependant, si le tampon de digestion contient de grande quantité en solvant organique, ceci peut conduire à des pertes d'analytes au niveau de la colonne de piégeage par l'action éluante des solvants organiques. Le protocole de digestion sur la StyrosZyme^{TM} a donc été réalisé en différé et a consisté à transférer la solution de BA*p*NA (20 µL, 0,2 nmol) par 800 µL du tampon de digestion puis à éluer le produit et le substrat non digéré par 1 mL de solution contenant 0, 20, 50 ou 70 % d'acétonitrile en récupérant l'éluat dans un flacon. Un grand volume est choisi volontairement afin d'assurer l'élution complète des composés. L'éluat est ensuite évaporé jusqu'à 400 µL et une fraction de cette solution est

directement injectée en LC-UV. La figure III-23 résume le protocole de digestion du BA*p*NA utilisé sur la StyrosZyme™.



1) Percolation par 800 µL de tampon Tris 50 mmol.L^{-1} (pH 8), 10 mmol.L^{-1} $CaCl_2$, 100 µL.min^{-1}
2) Elution par 1 mL d'une solution d'acétonitrile à 0, 20, 50 et 70 %
Récupération et évaporation de l'éluat puis analyse par LC-UV.

Figure III-23 : Protocole de digestion du BApNA sur la colonne de trypsine commerciale StyrosZyme™.

Les résultats obtenus montrent qu'avec 20 % d'acétonitrile, le produit *p*-NA est élué de la colonne StyrosZyme™ mais tout le substrat non digéré n'est pas récupéré. En revanche, l'addition de 50 % d'acétonitrile permet l'élution totale du produit de digestion et du substrat non digéré. Ce phénomène peut être expliqué par les propriétés hydrophobes du support d'immobilisation de la StyrosZyme™ à base de poly(styrène divinylbenzène) pouvant développer des interactions non spécifiques entre le substrat ou le produit et le support. Pour confirmer cette hypothèse, 0,2 nmol de BA*p*NA ont aussi été digérées avec 20 % et 50 % d'acétonitrile sur le support de trypsine à base de Sépharose activée CNBr. Les rendements de digestion obtenus sont exactement les mêmes que pour une digestion sans acétonitrile. Le support de Sépharose ne développe donc pas d'interactions hydrophobes.

L'adsorption hydrophobe non spécifique observée sur le support StyrosZyme™ à base de styrène-divinylbenzène est donc à prévoir sur le support Poroszyme® à base du même polymère organique. Même si 5 à 10 % de méthanol ou d'acétonitrile est en général recommandé pour réduire les interactions des peptides hydrophobes sur le support [8,20,21], aucune étude n'a étudié les interactions non spécifiques sur l'IMER Poroszyme®. Toutefois, comme mentionné au chapitre II de ce manuscrit, le développement d'interactions non spécifiques sur des IMERs à base de polymère organique a déjà été décrit et démontré sur des supports monolithiques à base de méthacrylate d'éthylènediméthacrylate (EDMA) [22,23].

Le développement de ces interactions non spécifiques avec les peptides les moins polaires peut être un réel inconvénient pour l'utilisation de la colonne StyrosZyme™ ou des IMERs à base de polymères organiques dans des systèmes en ligne. En effet, les grandes quantités d'acétonitrile nécessaires pour leur élution (50 %) peuvent limiter leur rétention efficace par interaction hydrophobe sur la colonne de piégeage. De plus, même si la trypsine

immobilisée a montré une bonne tolérance aux solvants organiques tels que l'acétonitrile ou le méthanol, les enzymes, comme la plupart des protéines, ont tendance à être dénaturées, ce qui limite la durée de vie de l'IMER.

d) Comparaison des performances

La figure III-24 présente les rendements de digestion (RD%) obtenus pour la digestion de 0,2 nmol de BA*p*NA sur les trois réacteurs de trypsine préparés au laboratoire, sur le réacteur de trypsine commercial StyrosZyme™ et sont comparés au rendement de digestion en solution.

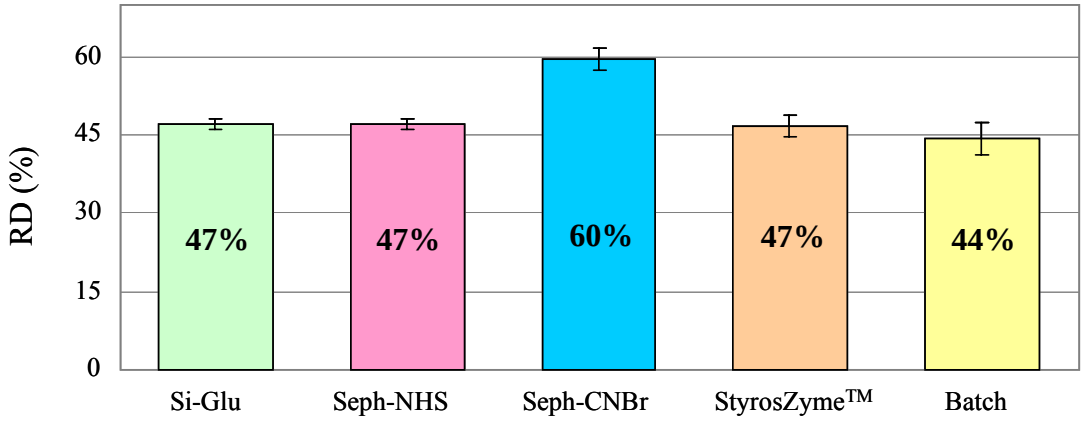


Figure III-24 : Diagramme représentant les rendements de digestion de 0,2 nmol de BApNA sur les trois supports préparés avec 1 mg de trypsine, sur la colonne StyrosZyme™ et pour une digestion en solution avec un rapport E/S = 1/50, (n=3).

Pour les trois IMERs préparés au laboratoire ainsi que pour la StyrosZyme™ (1), la procédure de digestion du BA*p*NA est très répétable puisque les coefficients de variation obtenus sont inférieurs à 4 % ce qui confirme le choix d'une détection UV par rapport à une détection MS afin de caractériser ces supports. Pour les expériences de digestion en solution, un coefficient de variation légèrement supérieur de 7 % a été obtenu. Des rendements de digestion similaires de 47 % et 44 % ont été obtenus pour les IMERs Seph-NHS, Si-Glu et StyrosZyme™ ainsi que pour la digestion en solution. Le taux de récupération a été estimé à 100 % pour tous les supports démontrant l'efficacité des procédures développées. Le support à base de Sépharose activée CNBr présente un rendement de digestion supérieur de 60 % et une répétabilité de 4 % (n=3). Ainsi, le support à base de Sépharose activée CNBr présente les meilleures performances.

Par comparaison avec la littérature, les rendements de digestion du BA*p*NA obtenus sont tout à fait satisfaisants. En effet, la digestion du BA*p*NA durant 8 minutes à 37 °C sur un

IMER à base d'un monolithe de silice de dimension (25 x 4,6 mm d.i.) bien supérieure à celle des IMERs étudiés a donné un rendement de digestion de 20 % [24]. Le support d'immobilisation étant hydrophile, l'adsorption non spécifique du produit et du substrat résiduel est limitée et ne peut probablement pas expliquer ce faible rendement. Cependant, l'effet d'un modificateur polaire comme l'acétonitrile n'a pas été étudié et le taux de récupération du produit et du substrat résiduel n'est pas mentionné. Une autre étude a utilisé le BAEE comme substrat pour mesurer le rendement de digestion sur un IMER de trypsine en format capillaire (61,5 cm x 40 µm d.i.) à base de poly(GMA-EDMA) et d'acrylamide [25]. Un rendement de 52 % est obtenu pour un débit de 449 $nL.min^{-1}$ correspondant à un temps de parcours du substrat dans le réacteur enzymatique de moins de 3 minutes. Le support d'immobilisation est préparé à partir du monomère hydrophile acrylamide prévenant des interactions non spécifiques. Toutefois, là encore, aucune information n'est donnée sur le taux de récupération.

L'hypothèse d'une faible affinité entre l'enzyme de digestion et un substrat de faible masse moléculaire semble donc se confirmer.

(iv) Capacité des IMERs développés

Afin de compléter la caractérisation des IMERs, leurs « capacités » ont été déterminées. Dans ce contexte, elle correspond à la quantité maximale de substrat qui peut être digérée sur le réacteur de trypsine sans diminution du rendement de digestion dans des conditions données, notamment dans les mêmes conditions cinétiques.

Pour cela, des quantités croissantes de BA*p*NA comprises entre 0,01 et 40 nmol (4,35 ng et 17,4 µg) ont été percolées sur chaque IMER préparé à partir de 1 mg de trypsine immobilisée sur les 3 types de support. Après application du protocole décrit dans le tableau III-6, la quantité de *p*-NA retrouvée en fonction de la quantité de BA*p*NA est reportée sur la figure II-25.

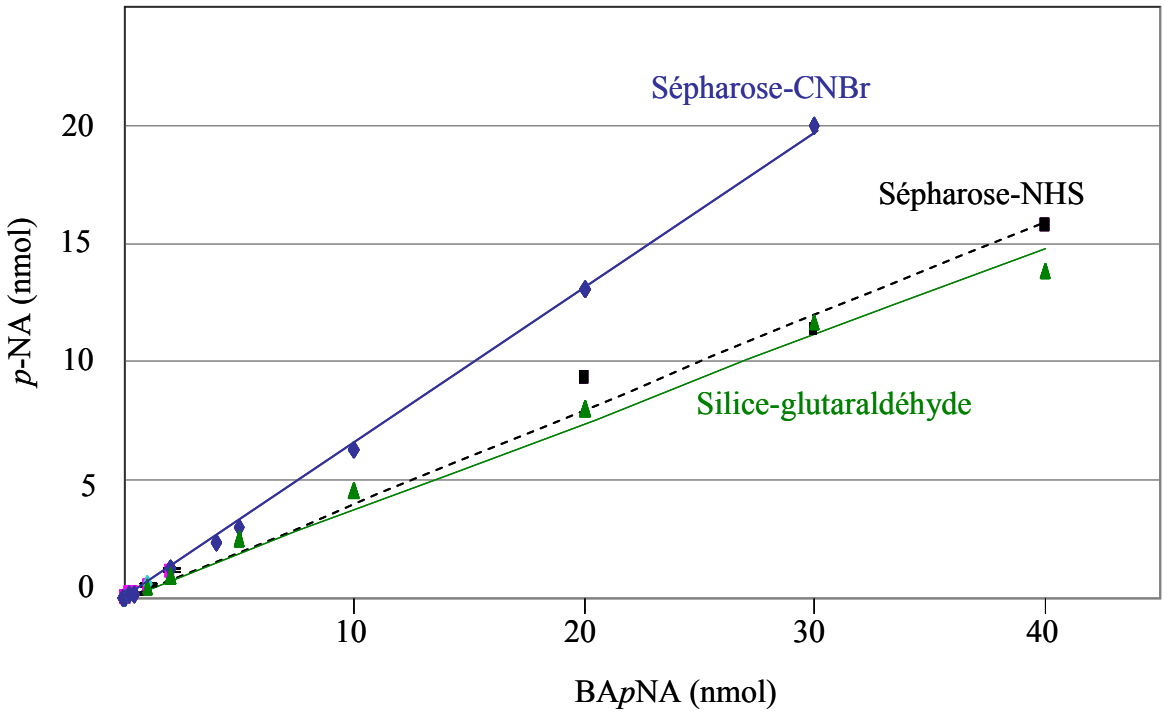


Figure III-25 : Quantité de p-NA retrouvée après digestion de quantités croissantes de BApNA (entre 0,01 et 40 nmol) sur les trois supports préparés avec 1 mg de trypsine dans la solution de greffage.

Avec seulement 1 mg de trypsine dans la solution de greffage, la saturation de sites n'est toujours pas atteinte même après 30 nmol (13,1 µg) de BA*p*NA percolées. En effet, une relation linéaire est observée pour les trois supports et les pentes de ces supports correspondent aux rendements de digestion précédemment estimés qui sont de l'ordre de 60 % pour la Sépharose activée CNBr et de l'ordre de 47 % pour les deux autres supports. En conclusion, ces supports présentent une capacité très importante ce qui permet d'envisager la miniaturisation des réacteurs enzymatiques à condition de pouvoir adapter les conditions de percolation à un plus faible format.

(v) Influence de la quantité de trypsine immobilisée

Afin d'estimer une valeur de capacité, une seconde série d'expériences a été réalisée cette fois avec des IMERs préparés à partir de 10 fois moins de trypsine dans la solution de greffage, c'est-à-dire 0,1 mg. Les courbes obtenues après digestion du BA*p*NA pour des quantités comprises entre 0,01 et 40 nmol sont présentées sur la figure II-26.

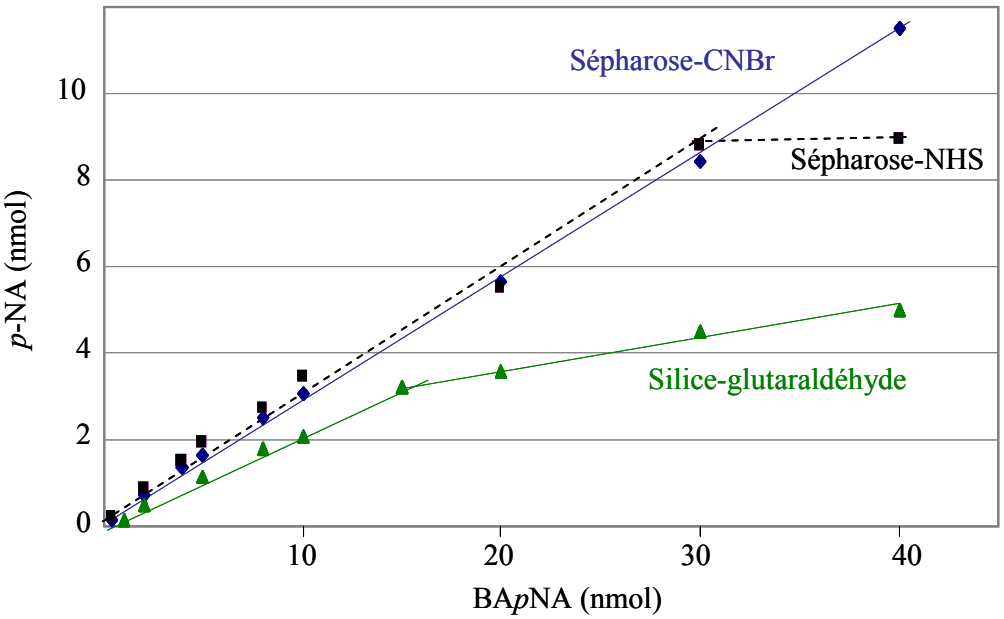


Figure III-26 : Quantité de p-NA retrouvée après digestion de quantités croissantes de BApNA (entre 0,01 et 40 nmol) sur les trois supports préparés avec 0,1 mg de trypsine dans la solution de greffage.

Pour les deux supports de silice activée glutaraldéhyde et de Sépharose activée CNBr, les courbes présentent une partie linéaire et un plateau. La partie linéaire correspond, comme précédemment, à la gamme de concentration pour laquelle le rendement de digestion est constant. Le plateau correspond à la capacité de l'IMER c'est-à-dire à la saturation des sites de digestion dans ces conditions cinétiques. Elle peut être estimée à 17 nmol de BA*p*NA percolé pour le support à base de silice (0.23 $mg.g^{-1}$ de silice) et à 30 nmol de BA*p*NA pour le support de Sépharose activé NHS (0.52 $mg.g^{-1}$ de Sépharose). En revanche, dans le cas de l'IMER à base de Sépharose activée CNBr greffé par 0,1 mg de trypsine dans la solution de couplage, seule une partie linéaire est observée, ce qui implique que la capacité n'est toujours pas atteinte pour 40 nmol de BA*p*NA percolé (0.68 $mg.g^{-1}$ de Sépharose).

On peut observer que les pentes des parties linéaires observées pour les trois IMERs sont plus faibles que pour les IMERs préparés à partir de 1 mg de trypsine, indiquant que le rendement de digestion est plus faible. Il est de 29, 30 et 22 % contre 60 % et 47 % et 47 % précédemment pour les IMERs à base de Sépharose CNBr, Sépharose NHS et silice glutaraldéhyde. Ces faibles rendements de digestion peuvent être attribués à une plus faible quantité de trypsine réellement immobilisée et donc une diminution de la vitesse de la réaction. Ces résultats montrent que, comme en solution, une certaine quantité d'enzyme est nécessaire pour assurer un rendement de digestion optimal.

Finalement, ces résultats confirment que le support à base de Sépharose activée CNBr présente les meilleures performances. Ces performances peuvent être attribuées à une

meilleure accessibilité des sites de coupure sur cet IMER, peut être due à une plus grande quantité de trypsine immobilisée. Afin de vérifier cette hypothèse, la suite de ce travail a donc porté donc sur l'estimation de la quantité de trypsine réellement immobilisée et sur son optimisation.

(vi) Optimisation de la quantité de trypsine immobilisée

Un paramètre essentiel pour l'optimisation d'un réacteur d'enzyme immobilisée est la densité de greffage, c'est-à-dire la quantité d'enzymes immobilisées par mg de support. En effet, plus le nombre d'enzymes immobilisées est grand, plus le ratio E/S est élevé et plus la digestion est efficace. La densité de greffage a donc été estimée pour les trois IMERs préparés au laboratoire en vue d'une corrélation avec les rendements de digestion observés.

a) Comparaison des supports d'immobilisation

La quantité de trypsine réellement immobilisée sur chaque support est obtenue en mesurant la différence de concentration de trypsine dans la solution de greffage avant et après immobilisation. La trypsine absorbant à 280 nm, dans un premier temps, les droites d'étalonnage ont été établies dans le tampon de couplage ($NaHCO_3$ 0.1 mol L^{-1}, NaCl 0.5 mol L^{-1}, pH 8.3 pour la Sépharose et PBS pour la silice) en mesurant l'absorbance de solutions pures de trypsine entre 0,1 et 5 $mg.mL^{-1}$ par spectrophotométrie. Les gammes linéaires obtenues sont comprises entre 0,1 et 2 $mg.mL^{-1}$. Puis, après immobilisation de la trypsine sur les supports activés, les concentrations en trypsine ont été mesurées, la diminution d'absorbance à 280 nm du surnageant est alors proportionnelle à la diminution de la quantité de trypsine en solution due à son immobilisation sur le support.

Dans le cas de la Sépharose activée NHS, à la longueur d'onde utilisée pour la détection de la trypsine (280 nm), l'absorbance du surnageant obtenue après immobilisation s'est avérée supérieure à celle avant l'immobilisation, rendant impossible la détermination du taux de greffage sur ce support par cette méthode. Ce phénomène peut s'expliquer par la présence du N-hydroxysuccinimide qui est relargué lors de la formation de la liaison covalente entre la trypsine et les fonctions réactives du support. En effet, celui-ci absorbe vers 280 nm, son maximum d'absorbance étant à 260 nm dans de l'hydroxyde d'ammonium [26]. Compte tenu de cette observation, on peut penser que le taux de greffage de 83 %, mesuré dans une étude précédente après greffage d'une solution à 20 $mg.mL^{-1}$ d'une solution de trypsine sur un support de Sépharose activée NHS était surestimé [27].

Le taux de greffage a toutefois pu être déterminé dans le cas de la silice activée glutaraldéhyde greffée par 1 mg de trypsine dans la solution de couplage : seulement 0,17 mg de trypsine ont réellement été immobilisés sur les 30 mg de silice, ce qui correspond à une densité de 5,7 µg de trypsine par mg de silice. Dans le cas du support de Sépharose CNBr, la quantité de trypsine réellement immobilisée est de 0,26 mg sur les 25 mg de Sépharose CNBr, ce qui correspond à une densité de greffage de 10 µg de trypsine par mg de Sépharose CNBr. La densité de greffage obtenue pour ce support est donc presque deux fois plus grande que dans le cas de la silice. Les résultats obtenus pour les trois supports sont résumés dans le tableau III-7.

Support	Quantité de trypsine immobilisée	Densité de greffage	Taux de greffage
Séph-NHS (25mg)	nd	nd	nd
Séph-CNBr (25 mg)	0,26 mg	10 mg /g	26 %
Silice-Glu (30 mg)	0,17 mg	5,7 mg /g	17 %

Tableau III-7 : Quantité de trypsine immobilisée, densité et taux de greffage après immobilisation de 1 mg de trypsine sur trois supports différents .nd : non déterminé.

Ces résultats peuvent expliquer les meilleurs rendements de digestion observés avec le support de Sépharose activée CNBr. On peut aussi noter la bonne répétabilité de la quantité de trypsine immobilisée sur ce support puisqu'après trois greffages de 1 mg de trypsine sur 25 mg de Sépharose CNBr, le taux de greffage mesuré ne varie qu'avec un coefficient de 9 %.

Aucune étude n'avait mesuré jusqu'à maintenant le taux de greffage de la trypsine sur les supports de Sépharose activée CNBr et de silice activée glutaraldéhyde. Toutefois, le taux de greffage de la trypsine a été calculé pour d'autres supports particulaires tels que la silice activée époxyde et un taux de greffage similaire à celui observé dans la présente étude a été obtenu (25 %) [10]. De plus, la densité de greffage est elle aussi du même ordre de grandeur avec 16,8 mg de trypsine par mg de support. Par ailleurs, une autre étude a mesuré la quantité de trypsine immobilisée sur un IMER de trypsine (50 x 8 mm d.i.) à base de particules polymérique de GMA-EDMA et seulement 4,5 mg de trypsine par gramme de support ont pu être immobilisés [28].

A ce stade de l'étude, la synthèse de l'IMER s'avère bien maîtrisée ainsi que le procédé de digestion du BA*p*NA.

b) Optimisation de la densité de greffage

Afin d'optimiser les performances de l'IMER à base de Sépharose activée CNBr, l'influence de la quantité de trypsine immobilisée sur le support a été étudiée. Pour cela différentes quantités de trypsine (de 0,1 à 5 mg) dans 1 mL de la solution de greffage ont été immobilisées sur 25 mg de support de Sépharose activée CNBr selon le protocole précédemment utilisé (annexe 6).

Dans un premier temps, la quantité de trypsine réellement immobilisée sur les IMERs a été calculée selon la méthode décrite ci-dessus. Ainsi, la figure II-27 représente les quantités de trypsine réellement immobilisées sur chaque support en fonction de la quantité de trypsine introduite dans 1 mL de la solution de couplage.

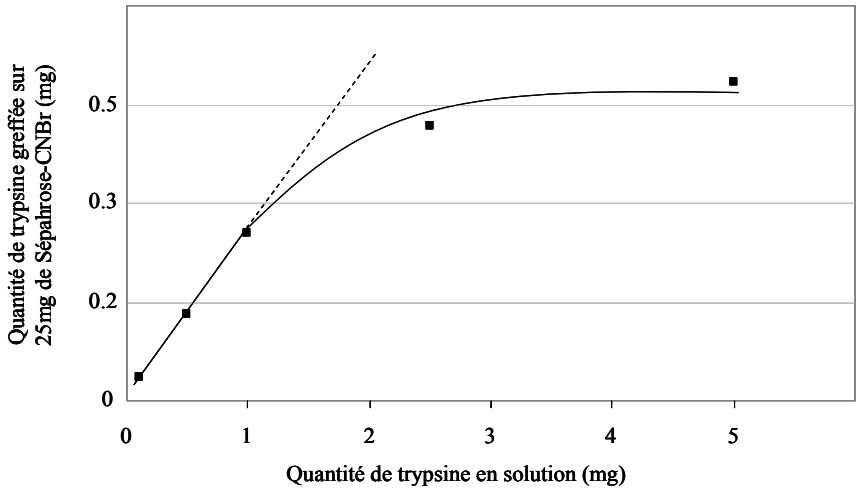


Figure III-27 : Quantité de trypsine immobilisée sur 25 mg de Sépharose activée CNBr en fonction de la quantité de trypsine présente dans la solution de couplage (0,1 ; 0,5 ; 1 ; 2,5 and 5 mg de trypsine dans 1 mL de solution de greffage).

Comme attendu, une augmentation de la quantité de trypsine dans la solution de greffage implique une augmentation de la quantité de trypsine immobilisée sur le support. Une partie linéaire est observée correspondant à un taux de greffage constant de 26 % entre 0,1 et 1 mg de trypsine dans la solution de couplage. Pour des quantités supérieures à 1 mg de trypsine dans la solution de greffage, le taux de greffage diminue et la quantité de trypsine immobilisée atteint un plateau correspondant à 0,5 mg de trypsine immobilisée. Ceci peut être expliqué par la saturation des sites de greffage de support de Sépharose activée CNBr. En conclusion, la quantité maximale d'enzymes qui peut être immobilisée sur cet IMER est proche de 0,5 mg de trypsine sur 25 mg de support correspondant à une densité de greffage de 20 mg de trypsine par gramme de Sépharose CNBr. Cette densité de greffage est deux fois supérieure à celle obtenue dans le cas d'un greffage par 1 mg de trypsine sur le support. Une

augmentation du rendement de digestion pourrait donc être attendue si des quantités d'enzymes supérieures à 1 mg dans la solution de greffage sont utilisées. En revanche, la diminution du rendement de digestion précédemment observée avec l'IMER de trypsine synthétisé par 0,1 mg de trypsine peut alors être définitivement s'expliquer par la faible quantité d'enzyme immobilisée. Des IMERs synthétisés avec différentes quantités de trypsine ont donc été sélectionnés pour étudier plus en détail l'influence de la quantité de trypsine immobilisée.

c) Influence de la densité de greffage sur le rendement de digestion

L'influence de la quantité de trypsine immobilisée sur le rendement de digestion a été étudiée en mesurant les quantités de *p*-NA libérées après avoir percolé différentes quantités de BA*p*NA sur les quatre IMERs de Sépharose CNBr préparés à partir de 0,1 ; 0,5 ; 1 et 5 mg de trypsine. La procédure de digestion est celle décrite précédemment dans le tableau III-6. Les résultats obtenus sont présentés sur la figure III-28.

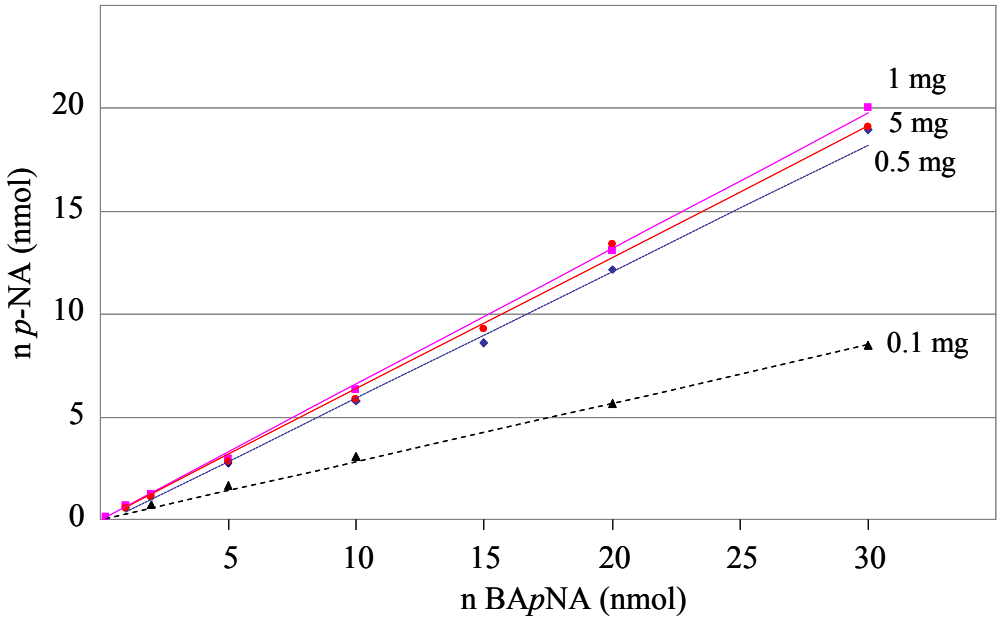


Figure III-28 : Quantités de p-NA obtenues après la digestion de différentes quantités de BApNA sur 4 IMERs à base de Sépharose activée CNBr préparés par différentes quantités de trypsine dans la solution de greffage (0,1 ; 0,5 ; 1 et 5 mg).

Pour les quatre IMERs, des droites sont obtenues pour la digestion de 0,01 à 30 nmol de BA*p*NA indiquant un rendement de digestion constant sur cette gamme de concentration. Pour les IMERs préparés à partir de 0,5 ; 1 et 5 mg de trypsine dans la solution de greffage, une même pente est obtenue correspondant à un rendement de digestion de 60 %. Le comportement de ces trois IMERs est donc le même alors que les densités de greffage sont

différentes (figure III-27). Ces résultats montrent donc que l'augmentation de la densité de greffage induit une augmentation du rendement de digestion jusqu'à une certaine limite. En théorie, plus il y a d'enzymes, plus l'efficacité de digestion est élevée. Cependant, lorsque l'enzyme est immobilisée, le processus de digestion est plus complexe qu'en solution. En effet, pour que la réaction enzymatique ait lieu, le substrat doit diffuser jusqu'à l'enzyme immobilisée. Ainsi, dans un premier temps et comme en solution, en augmentant la quantité d'enzyme immobilisée, la vitesse de la réaction enzymatique est de plus en rapide et le substrat est consommé de plus en plus vite. Toutefois, à partir d'une certaine quantité d'enzyme immobilisée, la réaction devient limitée par la diffusion du substrat, ce qui se traduit au final par un rendement de digestion constant. Une densité trop importante d'enzymes pourrait aussi générer une gêne stérique entre les enzymes qui diminuerait l'accessibilité des sites actifs pour les protéines, mais cette hypothèse est difficilement applicable pour le BA*p*NA. Une autre hypothèse est la tendance de la trypsine à s'autodigérer qui est accentuée plus la concentration en trypsine est importante. Par ailleurs, le rendement de digestion obtenu sur l'IMER greffé par 0,1 mg de trypsine (28 %) est bien plus faible que pour les IMERs greffés par 0,5 à 5 mg de trypsine. Dans ce cas, la quantité d'enzyme immobilisée sur cet IMER ne permet pas d'obtenir un rapport E/S suffisamment élevé pour digérer ces quantités de BA*p*NA percolées. Ce comportement a déjà été mentionné dans la littérature sur un IMER en capillaire (530 µm d.i.) dont le support est un monolithe polymérique [29]. En effet, des concentrations croissantes de trypsine entre 0,2 et 5 $mg.mL^{-1}$ ont été immobilisées et l'activité enzymatique de chaque IMER a été calculée avec le substrat BA*p*NA. Pour des concentrations croissantes de trypsine entre 0,2 et 0,75 $mg.mL^{-1}$, l'activité augmente et ne peut être augmentée pour des concentrations supérieures. Cette étude a montré l'effet bénéfique de l'ajout de benzamidine sur l'activité enzymatique pour des plus grandes concentrations en trypsine indiquant que l'autolyse de la trypsine est en partie responsable de la limite d'activité aux plus grandes concentrations de trypsine.

En conclusion, le support de Sépharose CNBr immobilisé par 1 mg de trypsine développé présente le meilleur compromis, il a donc été utilisé pour la digestion en ligne du cytochrome *c*. Il sera appelé IMER Séph-T (1) dans la suite de cette étude.

III.3.2.4. Digestion en ligne du cytochrome *c* sur l'IMER de trypsine

Les premiers résultats ont permis de démontrer l'immobilisation de trypsine sur trois supports différents puisque la digestion du BA*p*NA a bien été observée pour les trois IMERs.

La méthode mise au point pour la digestion du BA*p*NA a permis de mettre en avant le support de Sépharose CNBr comme support de choix pour l'immobilisation de la trypsine. A ce stade de l'étude, il était indispensable de confirmer ces résultats par la digestion d'une protéine modèle, le cytochrome *c*. En effet, le substrat BA*p*NA est bien plus petit qu'une protéine et la cinétique de digestion des protéines peut s'avérer beaucoup plus lente. Comme on l'a vu précédemment dans le cas de la StyrosZyme^{TM}, un temps de digestion de 20 minutes est nécessaire pour la digestion du cytochrome *c*.

(i) Optimisation du protocole de digestion

Les conditions de digestion du cytochrome *c* sur l'IMER de trypsine préparé au laboratoire sont similaires à celles décrites pour la digestion en ligne sur la colonne StyrosZyme^{TM} à l'exception du volume d'injection et par conséquent du volume de transfert sur l'IMER.

En effet, les IMERs préparés au laboratoire ont été conditionnés dans des précolonnes de dimension 20 x 2 mm d.i et possèdent donc un volume mort estimé à 44 µL. Le volume d'injection de 50 µL précédemment utilisé pour la digestion sur la StyrosZyme^{TM} étant supérieur au volume mort des IMERs préparés au laboratoire, il n'est pas adapté au protocole de digestion précédemment mis au point. En effet, si en transférant le contenu de la boucle d'injection, celui-ci dépasse le volume de l'IMER, tout ce qui n'est pas en contact des enzymes immobilisées ne sera pas soumis à la digestion qui a lieu lorsque le flux est arrêté au niveau du réacteur enzymatique. Le volume d'injection choisi pour la digestion des IMERs a alors été fixé à 20 µL, c'est-à-dire 2,5 fois inférieur au volume précédent, ce qui correspond environ au rapport des volumes morts de la colonne StyrosZyme^{TM} (120 µL) et des IMERs (44 µL) préparés au laboratoire.

Le volume de transfert du cytochrome *c* entre la boucle et l'IMER est alors ajusté à 75 µL. Ce volume de transfert a été vérifié sur l'IMER Séph-T (1). Pour cela, 2 µg de cytochrome *c* (20 µL) ont été transférés par le tampon de digestion à 100 µL.min^{-1}en faisant varier le volume de transfert entre 50, 75 et 100 µL. Les peptides sont ensuite digérés en « stop-flow » durant 20 minutes sur l'IMER puis ils sont transférés par 500 µL de tampon de digestion sur la colonne de piégeage. Après dessalage par 1 mL d'eau pure, les peptides sont élués et séparés sur la colonne analytique par la phase mobile (annexe 2). Après analyse par spectrométrie de masse, les réponses relatives des deux peptides spécifiques sont reportées sur la figure III-29. Ces résultats confirment que 75 µL est le volume optimal de transfert puisque

les aires des deux peptides spécifiques sont les plus importantes pour ce volume par rapport aux aires obtenues pour 50 et 100 µL de transfert.

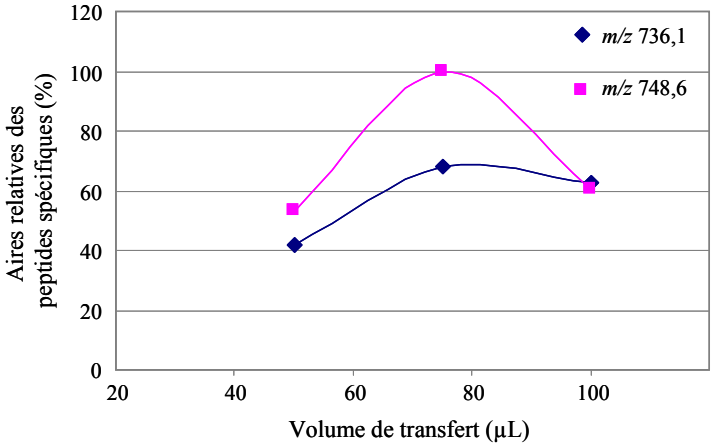


Figure III-29 : Aires relatives des deux peptides spécifiques du cytochrome c de rapports m/z 736,1 et 748,6 obtenues après digestions en ligne de 2 µg de la protéine (20 µL) sur l'IMER Seph-T (1) en faisant varier le volume de transfert entre 50, 75 et 100 µL, (n=1).

Ce volume de transfert ayant été fixé, la durée de digestion a été étudiée. Pour cela, 2 µg de cytochrome *c* ont été digérés sur ce support en « stop-flow » avec différents temps de digestion : 5, 10 et 20 minutes afin de vérifier s'il n'était pas possible de diminuer ce temps de digestion préalablement fixé à 20 minutes. La figure III-30 présente les aires relatives des deux peptides spécifiques du cytochrome *c* obtenues en fonction de la durée de digestion.

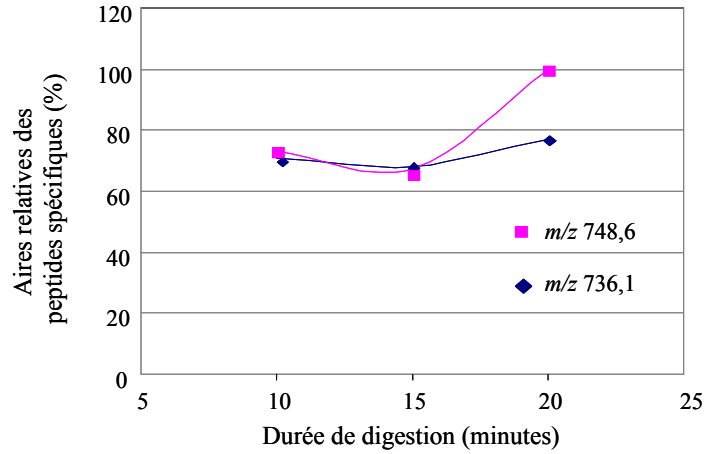


Figure III-30 : Aires relatives des deux peptides spécifiques du cytochrome c de rapports m/z 736,1 et 748,6 obtenues après digestions en ligne de 2 µg de la protéine (20 µL) sur l'IMER Seph-T (1) en faisant varier la durée de digestion entre 5, 10 et 20 minutes, (n=1).

Même si les aires des pics de ces deux peptides ne chutent pas drastiquement entre 20 et 5 minutes, elles ont tendance à diminuer. Finalement 20 minutes seront conservées comme durée de digestion.

Finalement, le protocole de digestion mis au point pour la digestion de 2 µg de cytochrome *c* sur l'IMER de Sépharose CNBr préparé au laboratoire est résumé dans le tableau III-8.

	Solvants utilisés
Echantillon	20 µL de tampon Tris (50 mM, pH 8) dopé à 2 µg de cytochrome *c*
Digestion en ligne	- transfert de la solution de cytochrome *c* vers la précolonne de digestion par 75 µL de tampon de digestion (Tris 50 mmol.L^{-1}, pH 8 avec 10 mmol.L^{-1} de $CaCl_2$) débit = 100 µL.min^{-1}) - arrêt du flux pendant 20 min - percolation de 500 µL de tampon de digestion vers la précolonne de dessalage (débit = 500 µL.min^{-1})
Dessalage	percolation de 1 mL d'eau pure (débit = 500 µL.min^{-1})
Séparation analytique	transfert des peptides de la précolonne de dessalage vers la colonne analytique par la phase mobile

Tableau III-8 : Protocole de digestion et analyse en ligne du cytochrome c sur les IMERs de trypsine préparés au laboratoire.

(ii) Evaluation des performances de l'IMER

Après application du protocole de digestion en ligne décrit ci-dessus, la digestion en ligne de 5 µg de cytochrome *c* sur l'IMER Séph-T (1) a permis l'identification de la protéine par le logiciel MASCOT et des recouvrements de séquence entre 30 à 50 % ont été obtenus. Ces recouvrements de séquence sont inférieurs à ceux obtenus pour une digestion en solution (entre 61 et 77 %) ou par digestion sur la StyrosZyme^{TM} (entre 54 et 77 %). Cependant, après comparaison détaillée des courants ioniques totaux obtenus après digestion en solution et après digestion sur l'IMER de trypsine, tous les peptides reconnus par MASCOT après digestion en solution (tableau III-2) ont aussi été observés sur les chromatogrammes correspondant à la digestion sur l'IMER et au mêmes temps de rétention, indiquant une digestion efficace du cytochrome *c* sur l'IMER Séph-T (1).

Afin d'évaluer les performances de cet IMER, les aires des deux pics des peptides spécifiques du cytochrome *c* obtenues après la digestion de 5 µg de cytochrome *c* ont été comparées à celles obtenues après digestion de la même quantité de cytochrome *c* en solution, sur le réacteur de trypsine StyrosZyme^{TM} (procédure décrite dans le tableau III-4) ou encore sur le réacteur de Sépharose CNBr greffé par 0,1 mg de trypsine dans la solution de couplage,

l'IMER Séph-T (0,1). La figure III-31 présente les aires relatives des pics correspondant aux peptides de rapports *m/z* 736,1 et *m/z* 748,6 obtenus après digestion de 5 µg de cytochrome *c*.

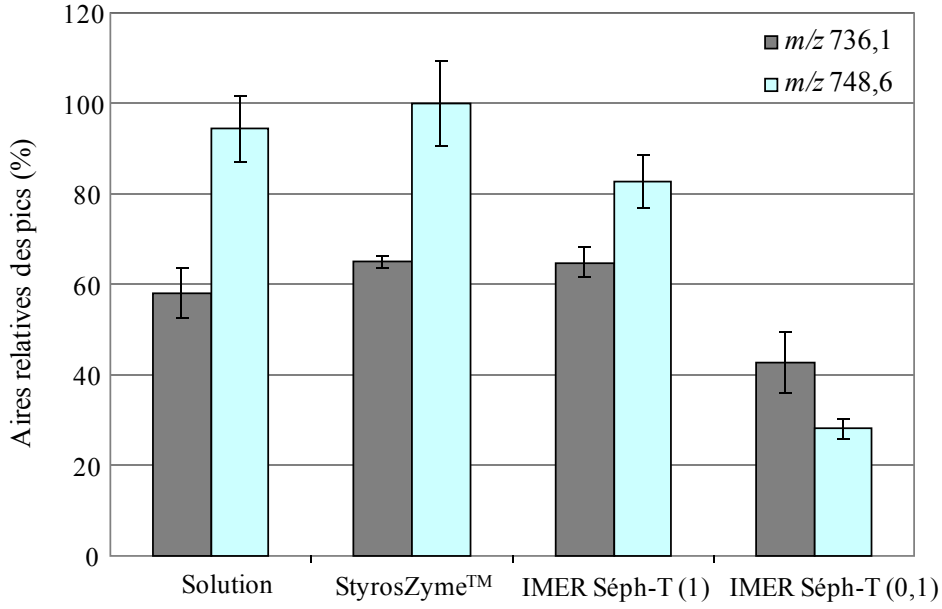


Figure III-31 : Aires relatives des pics correspondant aux peptides de rapports m/z 736,1 et m/z 748,6 obtenus après digestion de 5 µg de cytochrome c en solution (E/S : 1/50) durant 16h, en ligne durant 20 minutes sur la colonne StyrosZyme™ et sur les IMERs à base de Sépharose CNBr greffées par 0,1 et 1 mg de trypsine. Les digestions et analyses sont répétées trois fois.

La meilleure répétabilité a été obtenue avec l'IMER Séph-T (1) avec des coefficients de variations inférieurs à 7 % pour les deux peptides. Les réponses des deux peptides obtenus après digestion sur la colonne de Sépharose CNBr greffée par 1 mg de trypsine sont très similaires de celles obtenues après la digestion en solution et les digestions en ligne sur la StyrosZyme™. Ces trois modes de digestion présentent donc des performances très similaires en termes d'efficacité avec un avantage pour la digestion sur support solide car elle ne requiert que 20 minutes contre plusieurs heures pour la digestion en solution. De plus l'IMER préparé au laboratoire représente un gain important en termes de coût.

En revanche, dans le cas de l'IMER préparé à partir de 0,1 mg de trypsine dans la solution de couplage (Séph-T (0,1)), les réponses obtenues pour la digestion de 5 µg de cytochrome *c* sont bien inférieures à celles obtenues pour le support greffé par 1 mg de trypsine, conformément aux résultats obtenus avec le BA*p*NA et dues à une trop faible quantité de trypsine immobilisée. Cependant, on peut observer l'inversion des intensités relatives entre le peptide de rapport *m/z* 736,1 et celui de rapport *m/z* 748,6, ce qui reste inexpliqué.

Face à ces résultats prometteurs obtenus sur l'IMER Séph-T (1), la caractérisation de l'IMER a été poursuivie en vérifiant la répétabilité de la synthèse.

(iii) Répétabilité de la préparation et stabilité de l'IMER

Un autre réacteur à base de Sépharose CNBr a donc été préparé par immobilisation d'1 mg de trypsine selon la procédure décrite en annexe 6 afin de le comparer au précédent. Ce réacteur est appelé IMER Séph-T (1)bis. Ainsi, après digestion en ligne de 5 µg de cytochrome *c*, les aires des deux pics des peptides spécifiques obtenues avec cet IMER Séph-T (1)bis sont comparées aux aires obtenues précédemment (IMER Séph-T (1)) et les résultats sont présentés sur la figure III-32.

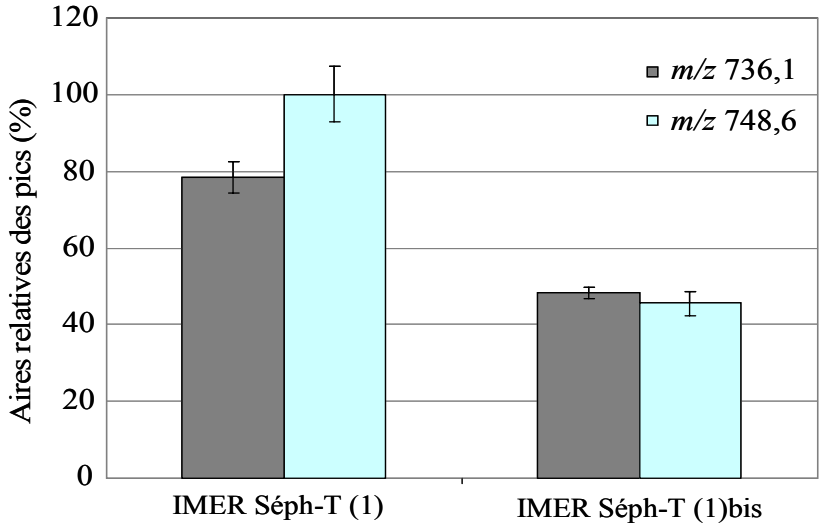


Figure III-32 : Estimation de la répétabilité de la synthèse. Aires relatives des deux pics des peptides spécifiques du cytochrome c (m/z 736,1 et 748,6) obtenus après digestion en ligne de 5 µg de cytochrome c réalisée sur deux IMERs à base de Sépharose CNBr préparés à partir de 1 mg de trypsine.

Les résultats obtenus sur ces deux IMERs sont très différents en termes d'intensité d'une part et d'intensité relative entre les deux peptides d'autre part. La répétabilité des résultats n'est donc pas satisfaisante, pourtant la répétabilité du protocole de greffage était correcte. La faible répétabilité observée peut être expliquée par une mauvaise homogénéité de remplissage de la précolonne par la phase greffée ou à un problème lors de la seconde synthèse. A cet effet, un greffage de trypsine sur une double quantité de Sépharose pourrait être effectué afin de remplir deux colonnes à partir de la même synthèse. Par ailleurs, il serait intéressant de comparer les résultats d'au moins trois synthèses indépendantes. Une autre hypothèse est que la mauvaise répétabilité est liée à l'analyse par spectrométrie de masse elle-

même. En effet, les résultats présentés ont été effectués à 3 mois d'intervalles entre les deux IMERs. Toutefois, ces deux IMERs n'ont pas pu être comparés le même jour puisque le premier IMER Seph-T (1) était déjà dégradé lors de la deuxième synthèse. Toutefois, les étapes avant d'atteindre l'objectif final de cette étude étant encore nombreuses, il a été choisi de poursuivre l'étude.

Concernant la stabilité de l'IMER, l'IMER Seph-T (1) a été utilisé de façon régulière pendant 10 mois et les aires des deux pics des peptides spécifiques ont été constantes indiquant une très bonne stabilité du réacteur enzymatique tout au long de cette période. Toutefois, au bout de ces 10 mois, les intensités des peptides spécifiques ont diminué d'environ 17 % dans le cas du peptide de rapport *m/z* 736,1 et de 60 % dans le cas du peptide de rapport *m/z* 748,6 indiquant que le réacteur de trypsine Seph-T(1) n'était plus efficace. Même si, la durée de vie des IMERs n'a pas beaucoup été étudiée dans la littérature, en particulier pour les IMERs en formats conventionnels, des durées de vie similaires ont été obtenues. Une étude a par exemple montré qu'un recouvrement de séquence constant était obtenu durant 9 mois d'utilisation d'un IMER à base d'un monolithe de silice commercial [10]. Puis, une baisse de l'activité de 14 % durant les 3 mois suivants a été observée.

Le premier IMER de trypsine développé ayant montré une baisse de performances, l'IMER Séph-T (1)bis sera utilisé dans la suite de cette étude.

(iv) Linéarité et sensibilité de la méthode

Afin d'évaluer la linéarité de la méthode d'analyse en ligne, différentes quantités de cytochrome *c* (entre 0,2 et 10 µg, i.e. de 17 pmol à 0,85 nmol) ont été digérées sur l'IMER Séph-T (1)bis. Les aires des pics correspondant aux deux peptides spécifiques de cytochrome *c* sont reportées sur la figure III-33.

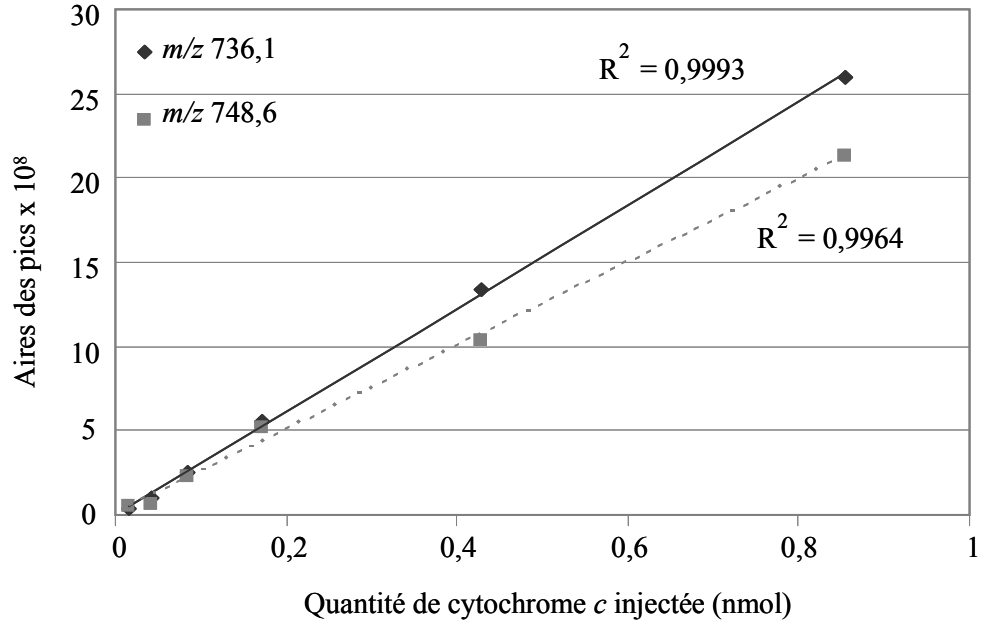


Figure III-33 : Aires des pics des peptides de rapports m/z 748,6 et m/z 736,1 en fonction de la quantité de cytochrome c digérée sur l'IMER Seph-T (1)bis.

Pour cet IMER, les résultats montrent des courbes linéaires entre 17 pmol et 0,85 nmol de cytochrome *c* injecté (entre 0,2 et 10 µg) avec des coefficients de régression linéaire de 0 ,9964 pour le rapport *m/z* 748,6 et 0,9993 pour le rapport *m/z* 736,1. L'analyse quantitative du cytochrome *c* digéré en ligne par la trypsine est donc possible dans cette gamme de concentration. Ces résultats démontrent la pertinence de l'outil de quantification développé. Pour établir rigoureusement une droite d'étalonnage, il faudrait étendre la gamme de quantité de cytochrome *c* à au moins deux ordres de grandeur. A 17 pmol, le rapport S/N des peptides de rapport *m/z* 736,1 et *m/z* 748,6 sont de 65 et de 7 respectivement. En estimant la limite de détection avec un S/N = 3, la LDD de l'analyse mise au point est de 0,79 pmol (0,5 $\mu g.mL^{-1}$) pour le peptide *m/z* 736,1 et de 7,3 pmol (4,3 $\mu g.mL^{-1}$) pour le peptide *m/z* 748,6. La limite d'identification par le logiciel MASCOT est de 17 pmol (10 $\mu g.mL^{-1}$). A cette concentration de cytochrome *c*, MASCOT identifie la protéine avec un recouvrement de séquence de 24 %. En effet, la limite de détection est le plus souvent associée à la limite de reconnaissance par le logiciel bioinformatique ou alors à un recouvrement de séquence minimum [9,24,30,31]. Toutefois, comme le montre la figure III-34, même s'il y a une relation entre la quantité de protéine digérée et le recouvrement de séquence obtenu, elle n'est pas linéaire et ne permet pas de quantifier la protéine.

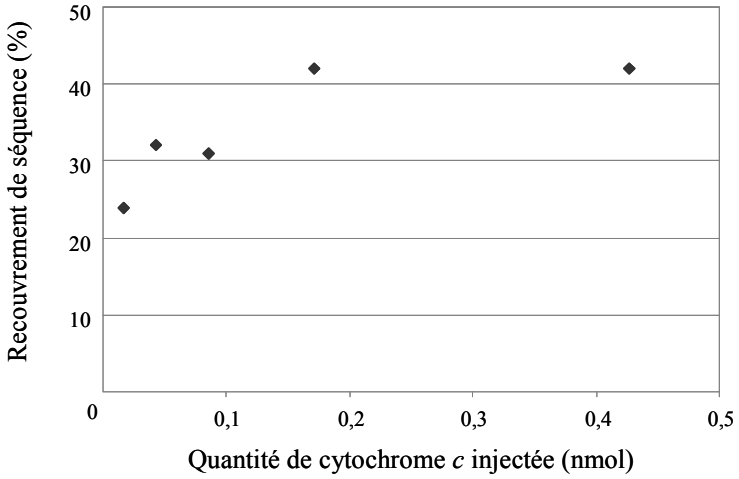


Figure III-34 : Recouvrements de séquence obtenus par MASCOT en fonction de la quantité de cytochrome c digérée sur l'IMER Séph-T (1)bis.

La limite de détection obtenue dans cette étude est relativement élevée par rapport aux concentrations des marqueurs potentiels dans le plasma de l'ordre du $ng.mL^{-1}$. Toutefois, l'objectif principal de cette première étude était de démontrer la faisabilité de la mise au point complexe d'une digestion en ligne sur un support d'enzymes immobilisées. Afin d'améliorer la sensibilité, une étape préalable d'enrichissement permettrait de traiter un plus gros volume d'échantillon et sera développée dans le prochain chapitre. Il est également possible d'utiliser un spectromètre de masse plus performant. L'acquisition récente au laboratoire d'un triple quadripôle nouvelle génération permettra, dans une prochaine étude, d'atteindre de meilleures sensibilités. Il est aussi possible de miniaturiser l'analyse, en utilisant une colonne HPLC de diamètre plus faible. Ce dernier point sera développé dans la suite de ce manuscrit.

III.4. Synthèse et caractérisation du réacteur de pepsine

Compte tenu des résultats encourageants obtenus pour le support de trypsine immobilisée, cette approche a été appliquée au développement d'un microréacteur de pepsine. Dans la littérature, les réacteurs de pepsine immobilisée ont surtout été développés en vue du couplage avec l'électrophorèse capillaire, ce qui permet de travailler en milieu acide pour éviter l'adsorption non spécifique des protéines basiques sur les parois du capillaire de la CE [32,33].

Les résultats précédemment décrits pour la trypsine ont montré que le support de Sépharose CNBr présentait les meilleures performances. A cet effet, la pepsine a directement été immobilisée sur ce support.

III.4.1. Préparation de l'IMER

Le protocole d'immobilisation a du être adapté aux conditions acides de la pepsine. En effet, la pepsine se dénature de manière irréversible au-dessus de pH 6-7 [34] et présente une activité optimale à pH 2. L'immobilisation a alors été effectuée à pH 5,8, pH auquel la pepsine est moins active afin de limiter son autodigestion lors du greffage. Le protocole d'immobilisation est décrit en annexe 7. Dans un premier temps, 1 mg de pepsine a été immobilisé sur 25 mg de Sépharose CNBr et conditionné dans une précolonne de 20 x 2 mm d.i. pour former l'IMER nommé IMER Séph-P (1). Ce support a directement été évalué avec le cytochrome *c* comme protéine modèle.

III.4.2. Développement de la procédure de digestion

III.4.2.1. Digestion du cytochrome *c*

Le montage expérimental pour la digestion en ligne du cytochrome *c* sur l'IMER de pepsine est le même que celui présenté sur la figure III-20. En effet, comme précédemment mentionné, l'usage d'une précolonne intermédiaire entre l'IMER et la colonne analytique ont été conservés pour permettre de transférer les peptides vers la précolonne de piégeage où ils seront retenus sans générer de pression trop importante sur le support de Sépharose peu stable mécaniquement.

Le cytochrome *c* a directement été utilisé pour transférer la méthode développée pour la trypsine. Ainsi, le principe de digestion du cytochrome *c* utilisé sur l'IMER de pepsine reste similaire à celui de la trypsine, excepté le tampon de digestion qui est une solution d'acide formique à pH 2 comme mentionné pour la digestion en solution. Par conséquent, l'étape de dessalage n'est pas nécessaire avant l'analyse par spectrométrie de masse. Cette procédure est résumée dans le tableau III-9. La méthode d'analyse LC-MS/MS utilisée pour la digestion du cytochrome *c* par la pepsine a été précédemment décrite pour la digestion en solution et est présentée en annexe 2.

	Solvants utilisés
Echantillon	20 µL de tampon Tris (50 mM, pH 8) dopé à 5 µg de cytochrome *c*
Digestion en ligne	- transfert de la solution de cytochrome *c* vers la précolonne de digestion par 75 µL de tampon de digestion (HCOOH pH 2) débit = 100 $\mu L.min^{-1}$) - arrêt du flux pendant 20 min - percolation de 500 µL de tampon de digestion vers la précolonne de piégeage (débit = 500 $\mu L.min^{-1}$)
Séparation analytique	transfert des peptides de la précolonne de piégeage vers la colonne analytique par la phase mobile

Tableau III-9 : Conditions de digestion en ligne du cytochrome c sur un IMER de pepsine.

Après digestion et analyse en ligne de 5 µg de cytochrome *c* sur l'IMER Séph-P (1), les spectres de collision sont traités par le logiciel MASCOT qui reconnaît la protéine avec des recouvrements de séquence entre 20 et 47 %. Les recouvrements de séquence sont d'ailleurs similaires à ceux obtenus après digestion en solution à la pepsine de la même quantité de cytochrome *c*, ce qui confirme les bonnes performances de l'IMER. En cumulant les différentes analyses de digestion en ligne de 5 µg de cytochrome *c*, les rapports *m/z* reconnus par MASCOT correspondent aux 5 peptides décrits dans le tableau III-3 dans le cas de la digestion en solution. Les temps de rétention des peptides sont d'ailleurs identiques et aucun autre peptide du cytochrome *c* n'a été reconnu. Ces résultats sont également similaires à ceux obtenus dans la littérature. En effet, après digestion en ligne du cytochrome *c* sur un IMER de pepsine en capillaire à base d'un monolithe poly(GMA-EDMA) et l'analyse par CE-MS, le logiciel MASCOT a permis de reconnaître la protéine avec un recouvrement de séquence de 48 % et les peptides détectés sont les mêmes que ceux de notre étude à l'exception du peptide de masse 2111 Da et de séquence TYTDANKWKGITWKRRTL non observé dans l'étude citée [33]. Toutefois, aucune comparaison à la digestion en solution n'avait été effectuée.

III.4.2.2. Comparaison à la digestion en solution

L'outil de quantification développé dans le cas de la digestion par la pepsine en solution a ensuite été utilisé pour l'IMER de pepsine. Ainsi, les deux peptides de masse 1386,8 et 1017,5, choisis précédemment comme peptides spécifiques du cytochrome *c* après digestion par la pepsine, ont été étudiés. La méthode consiste à extraire les ions de rapports

m/z correspondant aux différents états de charge de ces peptides (Tableau III-3), les pics ainsi obtenus sont intégrés et sommés pour chacun des peptides spécifiques.

Dans un premier temps, les peptides spécifiques ont été utilisés pour comparer la digestion sur l'IMER à la digestion en solution. La figure III-35 présente donc les réponses obtenues après digestion de 5 µg de cytochrome *c* en solution et sur l'IMER Séph-P (1).

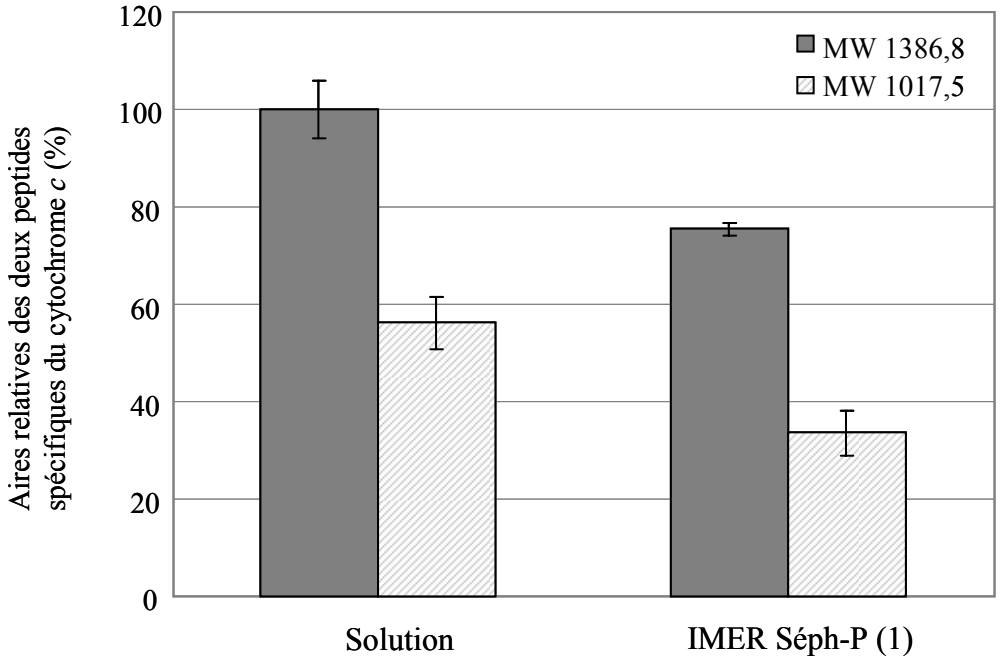


Figure III-35 : Réponses relatives des deux peptides spécifiques du cytochrome c après digestion en solution et digestion en ligne sur l'IMER Séph-P (1) de 5 µg de cytochrome c (n=3).

Dans un premier temps, on peut noter la bonne répétabilité de l'analyse et de la digestion en ligne puisque des coefficients de variation de l'ordre de 8 % en moyenne pour les deux peptides sont obtenus après digestion en ligne sur l'IMER. Enfin, même si les intensités des peptides spécifiques après digestion en ligne sur l'IMER sont légèrement inférieures à celles obtenues après digestion en solution, l'efficacité de digestion du cytochrome *c* de l'IMER développé reste satisfaisante. Le rendement de la digestion sur l'IMER peut être estimé à environ 54-75 % de la digestion en solution.

III.4.2.3. Comparaison des performances avec l'IMER de trypsine

Il est difficile de comparer la digestion trypsique à la digestion par la pepsine car les peptides du cytochrome *c* obtenus sont différents. Toutefois, dans le cas de l'IMER de trypsine, un rendement de digestion assez similaire à la digestion en solution avait été obtenu

par comparaison des aires des deux peptides spécifiques de rapports *m/z* 736,1 et 748,6. Cette différence avec la digestion par la pepsine peut s'expliquer par l'immobilisation de la pepsine elle-même. Des phénomènes comme l'accessibilité de l'enzyme ou encore le taux de greffage peuvent intervenir. Ce dernier point sera étudié par la suite. Une autre hypothèse concerne le protocole de digestion mis au point. En effet, lors du transfert du cytochrome *c* sur l'IMER de pepsine, la protéine est contenue dans 20 µL de solution tamponnée à pH 8. L'IMER de pepsine ayant un volume mort de 44 µL, ces 20 µL représente un volume important, le pH de la solution de digestion sur l'IMER de pepsine est donc supérieur à pH 2. Pour confirmer cette hypothèse, le cytochrome *c* a été directement préparé dans de l'acide formique (pH 2) avant d'être digéré en ligne sur l'IMER de pepsine. Les résultats ont été comparés à ceux obtenus après digestion en ligne de la même quantité de cytochrome *c* préparé dans du tampon Tris (pH 8) et sont présentés sur la figure III-36.

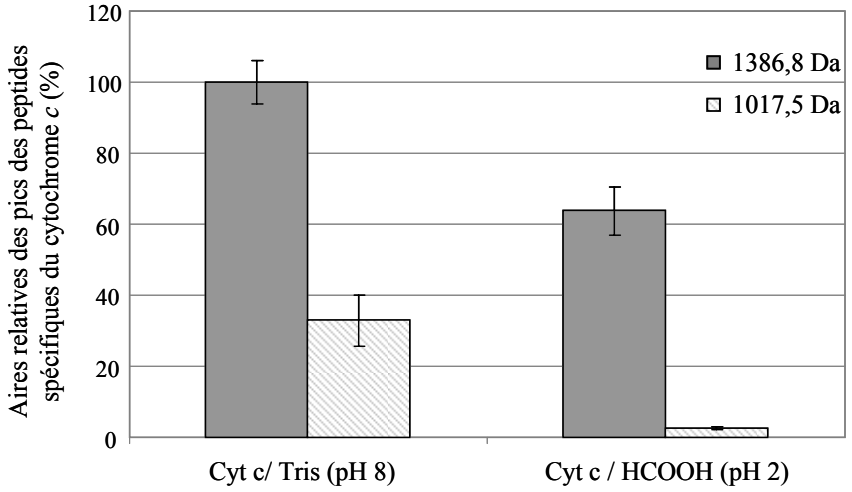


Figure III-36 : Aires relatives des deux peptides spécifiques du cytochrome c de masse 1386,8 et 1017,5 Da obtenus après digestion en ligne sur l'IMER de pepsine de 5 µg de cytochrome c préparé dans du tampon Tris (pH 8) ou dans l'acide formique (pH 2).

Comme le montre la figure III-36, les réponses ne sont pas améliorées en ajustant le pH de la digestion à 2 comme pour la digestion en solution. Au contraire, les réponses chutent. Ceci pourrait s'expliquer par la dénaturation du cytochrome *c* en milieu acide. Toutefois, cette hypothèse est contradictoire avec la digestion en solution où, là aussi, le cytochrome *c* est préparé en milieu acide. En conclusion, le protocole précédent avec la préparation du cytochrome *c* dans le tampon Tris a été conservée.

III.4.2.4. Linéarité de la réponse

En utilisant l'outil de quantification développé, la linéarité de la réponse après digestion en ligne du cytochrome *c* sur les IMERs de pepsine a été étudiée. Pour cela, différentes quantités de cytochrome *c,* entre 8,5 pmol et 3,5 nmol (entre 0,1 et 40 µg), ont été digérées en ligne sur l'IMER Séph-P (1). La figure III-37 présente les aires des pics correspondant aux peptides de masse 1375,7 et 1017,5 Da en fonction de la quantité de cytochrome *c* percolée sur l'IMER.

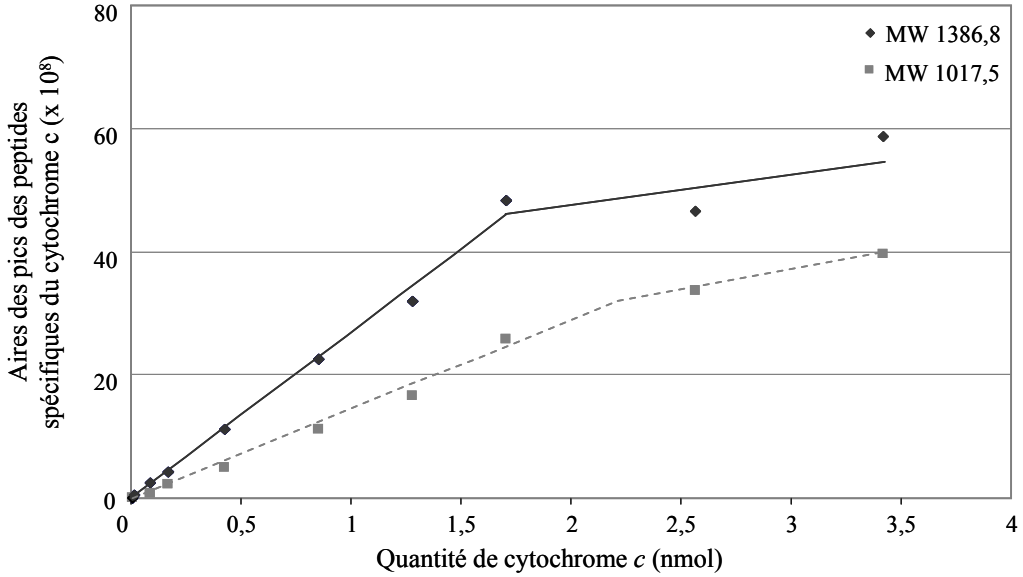


Figure III-37 : Aires des pics des peptides de masse 1386,8 et 1017,5 Da en fonction de la quantité de cytochrome c (entre 8,5 pmol et 3,5 nmol) digérée sur l'IMER Séph-P (1).

Les courbes obtenues pour chacun des deux peptides montrent une partie linéaire dans la gamme allant de 8,5 pmol à 1,7 nmol de cytochrome *c* avec un coefficient de régression linéaire de 0,9945 et 0,9981 pour les peptides de masses 1386,8 et 1017,5 Da respectivement. Ainsi, la quantification du cytochrome *c* est possible dans cette gamme. Les courbes atteignent un plateau pour des quantités de cytochrome *c* supérieures à 1,7 nmol et 2,2 nmol de cytochrome *c* pour les peptides de masses 1386,8 et 1017,5 Da respectivement. Afin de s'assurer que cette rupture de pente n'était pas due à une saturation de signal en MS, des digestions en solution de différentes quantités de cytochrome *c* variant entre 0,47 et 3,5 nmol suivies d'analyses par LC-MS ont montré, dans le cas du peptide de masse 1017,5 Da, une augmentation linéaire des aires obtenues en fonction de la quantité de cytochrome *c*. Ce résultat indique ainsi que le plateau observé est plutôt lié à une saturation des sites de digestion dans les conditions appliquées. La rupture de pente traduirait la quantité maximale

que l'IMER peut digérer, elle peut être en fait assimilée à la capacité de l'IMER de pepsine estimée à 796 $\mu g.g^{-1}$ de support dans ces conditions d'utilisation.

La limite de quantification de l'analyse est déterminée en observant les rapports S/N de ces deux peptides à 8,5 pmol (0,1 µg). La limite de détection, étant estimée pour S/N = 3 ; est de 2,6 pmol (30 ng) pour le peptide de masse 1017,5 Da et de 1,1 pmol (12 ng) pour le peptide de masse 1386,8 Da.

III.4.3. Caractérisation de l'IMER de pepsine

III.4.3.1. Répétabilité de la synthèse

Afin de vérifier la répétabilité de la synthèse du réacteur de pepsine, deux autres IMERs ont été préparés suivant deux synthèses indépendantes. Pour cela, 1 mg de pepsine a été immobilisé sur 25 mg de Sépharose CNBr selon le même protocole précédemment décrit en annexe 7. Chacun des deux nouveaux IMERs a été conditionné dans une colonne de dimensions 20 x 2 mm d.i. Les deux IMERs ainsi obtenus ont été nommés IMER Séph-P (1) bis et IMER Séph-P (1) ter. Afin de les comparer avec l'IMER Séph-P (1), 5 µg de cytochrome *c* (20 µL) a été digéré à trois répétitions selon le protocole décrit dans le tableau III-9. Les résultats obtenus pour les trois IMERs à base de Sépharose CNBr activée et préparés à partir de 1 mg de pepsine dans la solution de couplage sont présentés sur la figure III-38.

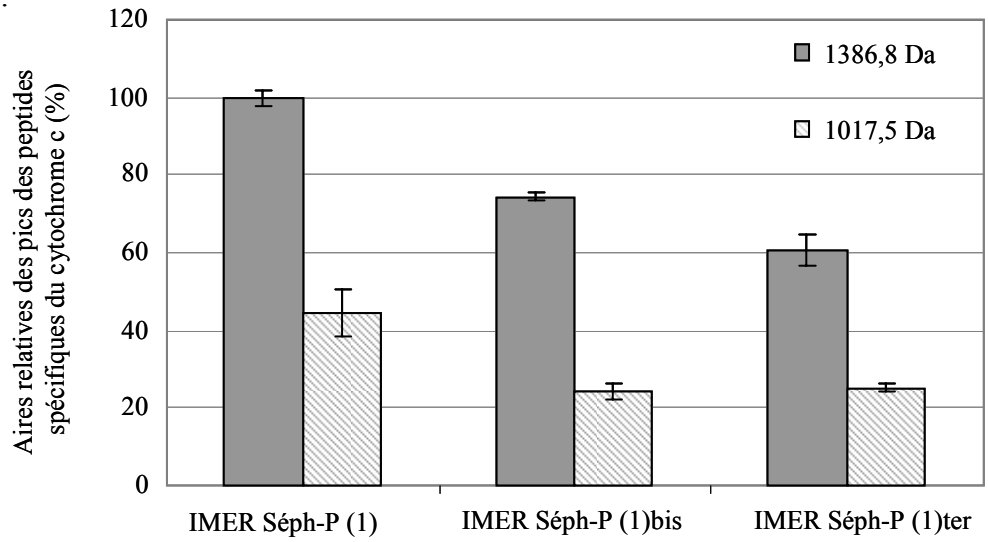


Figure III-38 : Aires relatives des pics des deux peptides spécifiques de masse 1386,8 et 1017,5 Da obtenus après 3 digestions en ligne de 5 µg de cytochrome c sur chacun des IMERs à base de Sépharose CNBr et greffés par 1mg de trypsine lors de 3 synthèses différentes.

Les intensités relatives entre les deux peptides sont similaires pour les trois IMERs. Cependant, comme mentionné dans le cas des IMERs de trypsine, les aires obtenues pour les deux peptides sont différentes selon l'IMER utilisé. En effet, pour le peptide de masse 1386,8 Da, une différence maximale d'environ 40 % est obtenue entre l'IMER Séph-P (1) et l'IMER Séph-P (1) ter. En revanche, contrairement aux IMERs de trypsine, les résultats présentés sur la figue III-38 ont été obtenus le même jour, indiquant que la faible répétabilité observée n'est pas liée à l'analyse par spectrométrie de masse. Comme précédemment décrit pour les IMERs de trypsine, le remplissage des précolonnes avec le gel de Sépharose est délicat en raison de la faible quantité de phase préparée et peut mener à des différences d'homogénéité entre deux remplissages, d'autant que dans le cas des IMERs de pepsine, les préparations des IMERs ont été confiées à 3 manipulateurs différents. Là encore, une étude plus approfondie est à réaliser en immobilisant de la pepsine sur une plus grande quantité de phase afin de préparer plusieurs IMERs et de comparer les réponses obtenues.

Toutefois, on peut noter la très bonne répétabilité de la digestion en ligne et de l'analyse quel que soit l'IMER utilisé avec des coefficients de variation de seulement 7 % en moyenne. De plus, l'IMER Séph-P (1) a été utilisé de façon continue durant 4 mois sans observer de perte de signal significative pour les deux ions spécifiques. L'IMER développé présente donc une très bonne stabilité en particulier par comparaison avec la littérature. En effet, la stabilité d'un IMER de pepsine en format capillaire à base de poly(GMA-EDMA) a été étudiée en digérant une solution de myoglobine, une détérioration a été observée au bout de la 25ème injection [35].

III.4.3.2. Influence de la densité de greffage sur la digestion du cytochrome *c*

La trypsine et la pepsine n'ayant pas la même masse moléculaire et étant de taille différente, le taux de greffage de la pepsine sur le support peut être différent de celui obtenu pour la trypsine pour des raisons stériques. En effet, la pepsine est une enzyme de masse molaire de 35 kDa alors que la trypsine a une masse de 24 kDa. Cependant, la structure tridimensionnelle de la pepsine est plus compacte que celle de la trypsine puisque le rayon de la pepsine est de 22 Å [36] alors que celui de la trypsine est de 38 Å. On peut donc espérer greffer une plus grande quantité de pepsine que de trypsine sur une même quantité de Sépharose activée CNBr. Toutefois, la pepsine ayant une structure plus repliée, les fonctions

réactives pouvant se lier au support activé peuvent être moins accessibles. En conséquence, le taux de greffage de la pepsine sur la Sépharose CNBr a été étudié.

(i) Evaluation du taux de greffage

Différentes quantités de pepsine ont été immobilisées sur 25 mg de Sépharose activée CNBr en utilisant des solutions de couplage contenant 0,25 ; 0,5 ; 0,75 ; 1 ; 2 ; 3 ou 5 mg de pepsine dans 1 mL de tampon. Comme pour la trypsine, la quantité de pepsine immobilisée sur le support a été estimée par des mesures spectrophotomètriques (280 nm) de la solution de couplage et du surnageant avant et après le greffage. La figure III-39 présente la quantité de pepsine immobilisée en fonction de la quantité de pepsine initialement introduite dans la solution de greffage.

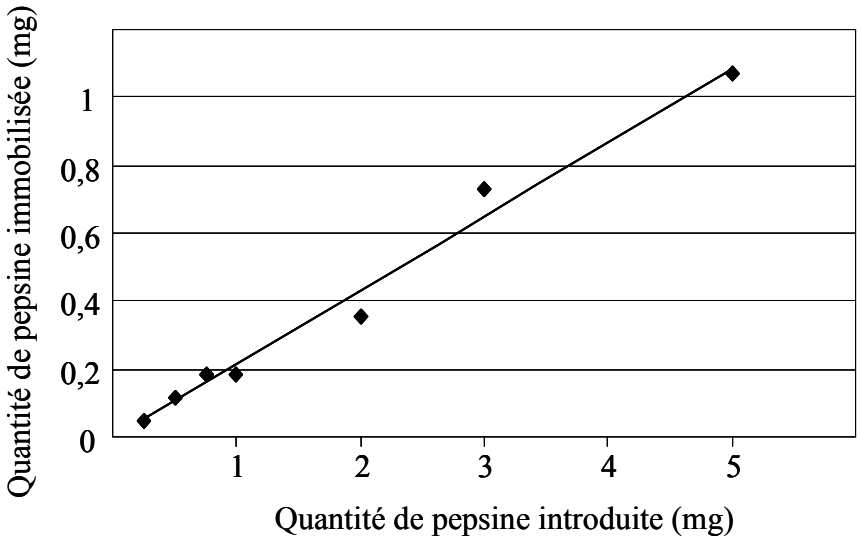


Figure III-39 : Quantités de pepsine immobilisée sur 25 mg de Sépharose activée CNBr en fonction de la quantité de pepsine introduite dans la solution de couplage.

Comme attendu, une augmentation de la quantité d'enzyme dans la solution de couplage induit une augmentation de la quantité de pepsine immobilisée sur le support. Dans toute la gamme étudiée (0,25 à 5 mg de pepsine dans la solution de greffage), la réponse est linéaire et la pente de la droite correspond à un rendement d'immobilisation constant estimé à 20 % dans le cas de la pepsine.

Dans le cas de la trypsine, la quantité maximale pouvant être réellement immobilisée était d'environ 0,5 mg (figure III-27) alors que dans le cas de la pepsine, plus de 1 mg d'enzymes peuvent être immobilisées sur les 25 mg de support. Ceci indique que les sites de greffage ne sont toujours pas saturés avec 1 mg de pepsine. Ce résultat est en accord d'un

point de vue stérique avec la structure tridimensionnelle de la pepsine qui est plus compacte que celle de la trypsine. Cependant, le taux de greffage obtenu est légèrement inférieur à celui obtenu avec la trypsine (26 %). Ceci peut être expliqué par la disponibilité des sites impliqués dans la réaction de greffage. En effet, la pepsine ayant une structure tridimensionnelle plus compacte, les sites de liaison avec le support fonctionnalisé sont moins accessibles, ce qui peut aussi expliquer le taux de greffage plus faible obtenu pour la pepsine. De plus, l'immobilisation des enzymes sur le support activé CNBr se fait *via* les amines primaires des résidus lysine de l'enzyme et il a été démontré que plus la protéine à immobiliser contenait de résidu lysine, plus le degré d'immobilisation était important [37]. La trypsine bovine contient 18 résidus lysine parmi les 240 acides aminés de la séquence tandis que la pepsine porcine contient 11 résidus lysine parmi les 385 acides aminés de sa séquence. Le plus grand nombre de groupement lysine pour la trypsine peut donc expliquer un taux de greffage plus élevé que pour la pepsine dans des conditions similaires.

Enfin, aucune comparaison avec la littérature n'est possible, puisque le taux de greffage de la pepsine n'a jamais été estimé sur ce type de support ni sur aucun autre support tel que des monolithes.

(ii) Influence de la quantité de pepsine immobilisée

Afin d'évaluer l'influence de la quantité de pepsine immobilisée sur la digestion, un autre IMER préparé à partir de 5 mg de pepsine a été conditionné dans une précolonne de dimension 20 x 2 mm d.i. Cet IMER, nommé Seph P-(5), a été comparé à l'IMER Seph-P (1) préparé avec 1 mg de pepsine dans la solution de greffage. Ainsi, 5 µg de cytochrome *c* ont été digérés à trois répétitions sur les deux réacteurs enzymatiques selon le protocole décrit dans le tableau III-9. L'outil de quantification développé a été utilisé pour comparer les deux IMERs Séph P-(1) et Séph P-(5). Les résultats sont présentés sur la figure III-40.

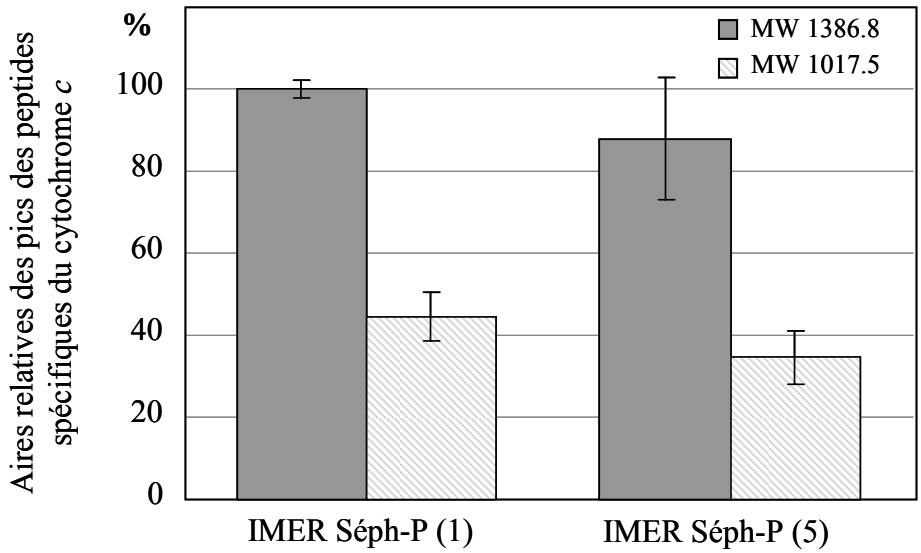


Figure III-40 : Aires relatives des deux peptides spécifiques de la digestion à la pepsine du cytochrome c après digestion en ligne de 5 µg (20 µL) de cytochrome c sur les IMERs de Sépharose CNBr greffés par 1 et 5 mg de pepsine dans 1 mL de la solution de couplage.

Tout d'abord, on peut noter, la bonne répétabilité de la digestion en ligne sur l'IMER Séph-P (1) avec un coefficient de variation de 8 % en moyenne pour les deux peptides du cytochrome *c* alors qu'un coefficient de variation de 18 % a été observé pour l'autre IMER. Les deux IMERs présentés sur la figure n'ont pas la même quantité de pepsine réellement immobilisée. En effet, d'après la courbe établie précédemment en figure III-39, 0,2 mg de pepsine ont été immobilisés sur l'IMER Séph-P (1) et 1 mg sur l'IMER Séph-P (5). Lors de la digestion de la même quantité de protéine sur chacun de ces deux IMERs, le ratio E/S est donc 5 fois plus élevé pour l'IMER Séph-P (5). En théorie, la digestion devrait être plus efficace. Même si ces deux IMERs ont été préparés par le même manipulateur, on peut conclure que compte tenu de la différence de 40 % observée précédemment pour l'aire du pic d'un peptide spécifique du cytochrome *c* entre deux synthèses indépendantes d'IMERs, les réponses observées sur la figure III-40 sont similaires pour les deux IMERs préparés à partir de 1 et 5 mg de pepsine. Pour cette même raison, il est difficile de comparer ces deux IMERs. Toutefois, ces résultats pourraient indiquer que, comme pour la trypsine, il existe un rapport E/S optimal sur l'IMER, au-dessus duquel l'efficacité de digestion ne peut être améliorée. Enfin, même si le greffage de la pepsine est réalisé à un pH où elle est moins active (≈ pH 6), il est possible qu'elle s'autodigère.

En conclusion, l'IMER de pepsine préparé par 1 mg de pepsine suffit à digérer de façon efficace le cytochrome *c* et sera utilisé dans la suite de cette étude.

Comme pour l'IMER de trypsine, une étude supplémentaire est à mener sur la répétabilité de la synthèse.

III.4.4. Application à un mélange

Dans la littérature, la plupart des digestions en ligne de protéines ciblées réalisées sur des IMERs sont appliquées à des échantillons purs [6,7,10,11,15,23,24,28,30,31,38]. En effet, malgré la spécificité de la spectrométrie de masse, l'analyse des protéines dans des échantillons biologiques et en particulier le plasma est un réel challenge pour la quantification des protéines minoritaires. Le plasma contenant un grand nombre de protéines, leur digestion sur le réacteur enzymatique conduit à un mélange extrêmement complexe de peptides qui peuvent fausser l'analyse d'une protéine ciblée.

Pour illustrer ce phénomène, une solution aqueuse tamponnée (pH 8) contenant trois protéines a été percolée sur l'IMER Séph-P (1). L'albumine étant la protéine majoritaire du plasma, elle a été introduite à une concentration 10 fois plus importante que le cytochrome *c*, à savoir 1 mg.mL^{-1} contre 0,1 mg.mL^{-1} de cytochrome *c*. La myoglobine a également été ajoutée à 0,1 mg.mL^{-1} comme autre protéine interférente du cytochrome *c*. La digestion en ligne a été réalisée comme précédemment. La figure III-41 présente les courants ioniques totaux obtenus après digestion en ligne de ce mélange et après digestion en ligne d'une eau tamponnée contenant uniquement le cytochrome *c* à 0,1 mg.mL^{-1}sur l'IMER Seph-P (1).

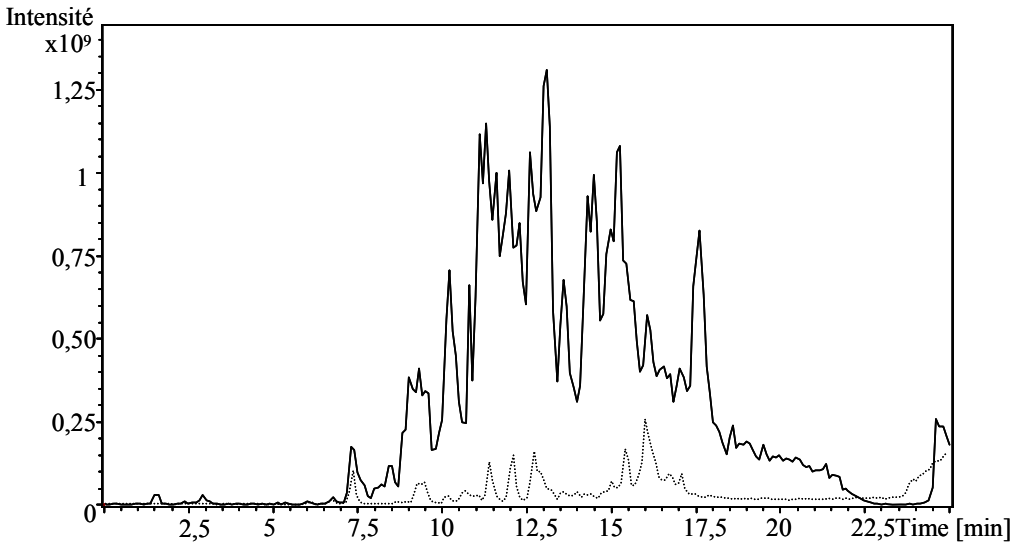


Figure III-41 Chromatogrammes des courants ioniques totaux obtenus après digestion en ligne de 20 µl d'un mélange contenant 1 mg.mL^{-1} d'albumine et de myoglobine et 0,1 mg.mL^{-1} de cytochrome c et après digestion en ligne d'un échantillon de tampon dopé par 0,1 mg.mL^{-1} de cytochrome c.

On peut observer, qu'avec la présence de deux protéines supplémentaires, le chromatogramme obtenu est bien plus complexe que celui du cytochrome *c* pur. Après transfert des données MS/MS sur le logiciel MASCOT, seule la myoglobine est reconnue avec un recouvrement de séquence de 21 %. Cet exemple permet de mettre en évidence la complexité de mise en œuvre d'un tel IMER en matrice réelle car le nombre de protéines présentes dans le plasma est largement supérieur à 3. De plus, la concentration de l'albumine est en réalité de l'ordre de 45 à 50 $mg.mL^{-1}$ alors que les protéines marqueurs sont recherchées à des concentrations de l'ordre du $ng.mL^{-1}$. Des composés de la matrice peuvent donc être *co*-élués et entrer en compétition lors de l'ionisation dans la source du spectromètre de masse aboutissant à un phénomène de "suppression d'ions". Ce phénomène induit des problèmes évidents pour la quantification. Il apparaît alors nécessaire de procéder à une étape de traitement d'échantillon sélectif pour une application à des échantillons réels visant à éliminer les interférents avant l'étape de digestion enzymatique.

III.5. Conclusion

L'étude réalisée dans ce chapitre a permis de caractériser des supports d'enzymes immobilisées pour la digestion en ligne de protéines ciblées.

Une première étude a concerné la mise au point de la digestion en ligne du cytochrome *c* sur un support commercial de trypsine immobilisée et a permis de confirmer les nombreux avantages des supports à enzymes immobilisées notamment en termes de temps de digestion.

La trypsine a ensuite été immobilisée sur différents supports. Un outil simple et rapide a été mis au point pour caractériser ces supports, optimiser leur utilisation et choisir l'IMER optimal. De plus, cette étude a permis de mettre en évidence des interactions non spécifiques développées par le support de trypsine commercial à base de PS-DVB, non observées sur les IMERs préparés au laboratoire.

L'IMER optimisé a ensuite été appliqué à la digestion en ligne du cytochrome *c* et un outil de quantification de la protéine basé sur les réponses de deux peptides spécifiques de la protéine a été mis en œuvre. L'IMER de trypsine a montré une bonne efficacité de digestion puisque les réponses obtenues sont similaires à celles obtenues avec le support commercial StyrosZyme™ et après digestion en solution. D'autre part, le protocole de digestion en ligne développé est répétable.

Ces résultats prometteurs ont permis de mettre au point la digestion du cytochrome *c* sur un réacteur de pepsine immobilisée. De la même façon que pour la digestion trypsique, un outil de quantification simple à mettre en œuvre a été développé. Ainsi, l'IMER de pepsine a lui aussi montré une bonne efficacité de digestion. De plus, les IMERs de trypsine et de pepsine développés ont montré une très bonne stabilité. Cependant, cette étude a aussi mis en évidence la répétabilité limitée de la préparation de ces IMERs.

Enfin, la digestion en ligne d'un mélange de trois protéines a permis d'aborder le problème des analyses en échantillon réels et la nécessité d'introduire une méthode d'extraction sélective de la protéine ciblée. La suite de cette étude porte donc sur la synthèse de supports d'extraction sélectifs et de leur couplage en ligne avec la digestion sur support d'enzyme immobilisée.

III.6. Références

[1] http://www.expasy.org/,

[2] B. Alberts, D. Bray, J. Lewis, M. Raff, K. Roberts, J.D. Watson, Biologie moléculaire de la cellule.

[3] M. De Person, Rapport post-doctoral, LECA/ESPCI. *Développement d'une digestion enzymatique couplée en ligne à l'analyse par chromatographie en phase liquide associée à la spectrométre de masse en tandem*, 2006.

[4] W.K. Russell, Z.-Y. Park, D.H. Russell, *Anal. Chem.* 73 (2001) 2682.

[5] P. Roepstorff, J. Fohlman, *Biomed. Mass. Spectrom.* 11 (1984).

[6] S. Canarelli, I. Fisch, R. Freitag, *J. Chromatogr., B* 775 (2002) 27.

[7] J. Carol, M.C.J.K. Gorseling, C.F. de Jong, H. Lingeman, C.E. Kientz, B.L.M. van Baar, H. Irth, *Anal. Biochem.* 346 (2005) 150.

[8] J. Gobom, E. Nordhoff, R. Ekman, P. Roepstorff, *Int. J. Mass Spectrom.* 169-170 (1997) 153.

[9] E. Calleri, C. Temporini, E. Perani, A.D. Palma, D. Lubda, G. Mellerio, A. Sala, M. Galliano, G. Caccialanza, G. Massolini, *J. Proteome Res.* 4 (2005) 481.

[10] C. Temporini, E. Perani, F. Mancini, M. Bartolini, E. Calleri, D. Lubda, G. Felix, V. Andrisano, G. Massolini, *J. Chromatogr., A* 1120 (2006) 121.

[11] R. Nicoli, N. Gaud, C. Stella, S. Rudaz, J.L. Veuthey, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 48 (2008) 398.

[12] P.V. Bondarenko, D. Chelius, T.A. Shaler, *Anal. Chem.* 74 (2002) 4741.

[13] P. Huang, D.B. Wall, S. Parus, D.M. Lubman, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* 11 (2000) 127.

[14] J. Vukovic, H. Loftheim, B. Winther, J.L.E. Reubsaet, *J. Chromatogr., A* 1195 (2008) 34.

[15] J. Carol-Visser, M. van der Schans, A. Fidder, A.G. Hulst, B.L.M. van Baar, H. Irth, D. Noort, *J. Chromatogr., B* 870 (2008) 91.

[16] B. Keil, *Springer-Verlag, Berlin/Heidelberg/NewYork* (1992) pp. 335.

[17] G. Marie, L. Serani, O. Laprevote, *Anal. Chem.* 72 (2000) 5423.

[18] F. Chapuis, Université Paris VI. *Immunoadsorbants et polymères à empreintes moléculaires pour l'extraction sélective de composés de matrices environnementales et biologiques : synthèse et caractérisation en vue de leur intégration au système total d'analyse*, novembre 2004.

[19] N. Minc, Université de Paris VI. *Microfluidique et billes magnétiques auto-organisées pour les analyses biologiques*, septembre 2005.

[20] G. Vecchione, B. Casetta, R. Santacroce, M. Margaglione, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 15 (2001) 1383.

[21] J. Samskog, D. Bylund, S.P. Jacobsson, K.E. Markides, *J. Chromatogr., A* 998 (2003) 83.

[22] J. Krenkova, Z. Bilkova, F. Foret, *J. Sep. Sci.* 28 (2005) 1675.

[23] J. Krenkova, N.A. Lacher, F. Svec, *Anal. Chem.* 81 (2009) 2004.

[24] E. Calleri, C. Temporini, E. Perani, C. Stella, S. Rudaz, D. Lubda, G. Mellerio, J.L. Veuthey, G. Caccialanza, G. Massolini, *J. Chromatogr., A* 1045 (2004) 99.

[25] J. Duan, Z. Liang, C. Yang, J. Zhang, L. Zhang, W.Zhang, Y.Zhang, *Proteomics* 6 (2006) 412.

[26] T. Miron, M. Wilchek, *Anal. Biochem.* 126 (1982) 433.

[27] J.R. Freije, P.P.M.F.A. Mulder, W. Werkman, L. Rieux, H.A.G. Niederlander, E. Verpoorte, R. Bischoff, *J. Proteome Res.* 4 (2005) 1805.

[28] M. Petro, F. Svec, J.M.J. Fréchet, *Biotechnol. Bioeng.* 49 (1996) 355.

[29] A.K. Palm, M.V. Novotny, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 18 (2004) 1374.

[30] R. Nicoli, S. Rudaz, C. Stella, J.L. Veuthey, *J. Chromatogr., A* 1216 (2009) 2695.

[31] S. Feng, M. Ye, X. Jiang, W. Jin, H. Zou, *J. Proteome Res.* 5 (2006) 422.

[32] M. Kato, K. Sakai-Kato, H.M. Jin, K. Kubota, H. Miyano, T. Toyo'oka, M.T. Dulay, R.N. Zare, *Anal. Chem.* 76 (2004) 1896.

[33] R.M. Schoenherr, M. Ye, M. Vannatta, N.J. Dovichi, *Anal. Chem.* 79 (2007) 2230.

[34] X. Lin, J.A. Loy, F. Sussman, J. Tang, *Protein Sci.* 2 (1993) 1383.

[35] L. Geiser, S. Eeltink, F. Svec, J.M.J. Fréchet, *J. Chromatogr., A* 1188 (2008) 88.

[36] H. Edelhoch, *The Journal of Physical Chemistry* 63 (1959) 1535.

[37] M. Wilchek, T. Miron, *J. Biochem. Biophys. Methods* 55 (2003) 67.

[38] Y.L.F. Hsieh, H. Wang, C. Elicone, J. Mark, S.A. Martin, F. Regnier, *Anal. Chem.* 68 (1996) 455.

CHAPITRE IV : ANALYSE EN LIGNE D'UNE PROTEINE CIBLEE DANS DU PLASMA

IV.1. Stratégie analytique

L'objectif de cette étude est de mettre au point l'analyse totale en ligne de la protéine modèle, le cytochrome *c*. Dans le chapitre précédent, la faisabilité de la digestion en ligne couplée à l'analyse par LC-MS/MS a été démontrée sur des supports de trypsine et de pepsine immobilisées. Pour l'analyse d'échantillons réels, la nécessité d'utiliser un outil sélectif d'extraction a impliqué le développement d'un immunoadsorbant (IS) couplé au réacteur enzymatique afin d'éliminer un grand nombre d'interférents contenus dans les fluides biologiques. Le principe global de l'approche analytique envisagée est schématisé sur la figure IV-1.

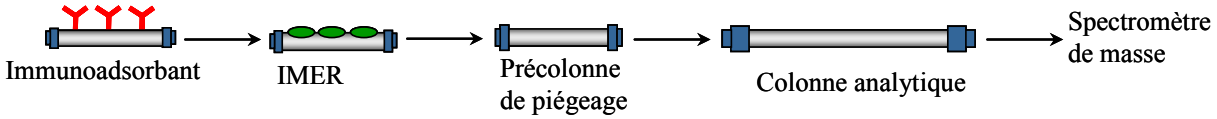


Figure IV-1 : Principe de l'analyse totale d'une protéine ciblée à partir d'un échantillon complexe mettant en œuvre une immunoextraction, une digestion enzymatique, une étape de préconcentration des peptides sur la précolonne de piégeage et une analyse chromatographique associée à une détection par spectrométrie de masse.

Le couplage direct entre l'étape d'immunoextraction et la digestion enzymatique sur support d'enzymes immobilisées implique que le cytochrome *c* soit transféré de l'IS vers l'IMER lors de l'étape d'élution de l'immunoadsorbant. Le solvant d'élution doit donc permettre conjointement une digestion efficace de la protéine sur le réacteur enzymatique. Comme décrit au chapitre II, l'élution des macromolécules est assurée par des solutions aqueuses très acides. Or, l'enzyme de digestion la plus utilisée pour l'analyse des protéines, la trypsine, est très faiblement active voire inactive à pH acide. Par conséquent, le couplage direct entre l'IS et un IMER de trypsine est problématique. Dans la littérature, une seule étude a réussi à mettre au point un tel couplage pour l'analyse quantitative d'une protéine ciblée dans un échantillon réel (BSA dans l'urine) en ajustant le pH *via* une pompe additionnelle avant la digestion enzymatique. Cependant, un faible rendement relatif à l'analyse globale en ligne (IS-IMER-LC/MS) (4%) a été obtenu [1]. Une alternative proposée dans la présente

étude est d'utiliser une enzyme dont le pH optimal d'activité est acide, ce qui est le cas de la pepsine.

Dans la suite de ce chapitre, la synthèse et la caractérisation d'un immunoadsorbant anti-cytochrome *c* seront décrites puis le couplage de l'immunoadsorbant avec l'IMER de pepsine sera mis au point avant l'application à l'analyse d'un échantillon complexe tel que le plasma.

IV.2. Immunoextraction du cytochrome *c*

IV.2.1. Synthèse de l'immunoadsorbant

Les protéines sont des macromolécules amphotères pouvant présenter un caractère relativement hydrophobe. Des interactions non spécifiques hydrophobes ou électrostatiques peuvent donc avoir lieu entre les protéines et le support utilisé pour l'immobilisation des anticorps. Comme lors de la conception de l'IMER, il est alors indispensable de sélectionner un support de greffage qui limite le risque d'interactions non spécifiques. De nombreuses études menées au laboratoire ont porté sur l'immobilisation d'anticorps ciblés contre des petites molécules sur des supports tels que la silice activée glutaraldéhyde et la Sépharose activée CNBr. La comparaison de ces supports avait montré le développement de fortes interactions non spécifiques sur la silice activée glutaraldéhyde non observées sur le support à base de Sépharose CNBr pour des composés à caractère acide [2]. En effet, le support de silice activé glutaraldéhyde est constitué d'un revêtement de polyéthyleneimine (PEI) menant à des charges positives résiduelles sur le support. En plus de ces interactions électrostatiques possibles avec le support, ce polymère dit « hydrophile » en raison du grand nombre de fonctions amine dans sa structure, semble également apte à développer des interactions hydrophobes compte tenu de la présence de chaînes carbonées. Des interactions non spécifiques de nature hydrophobe avaient d'ailleurs été auparavant mises en évidence au laboratoire sur un IS à base d'anticorps anti-fluorène lors de son application à des HAP de forte hydrophobie [3]. Un autre paramètre important pour le choix du support d'immobilisation est sa compatibilité aux conditions d'élution acides dans le cas des protéines. Or, la silice présente une gamme de stabilité au pH limitée, contrairement à la Sépharose. Pour ces raisons et malgré sa faible résistance mécanique, le support à base de Sépharose CNBr a été choisi comme support d'immobilisation des anticorps anti-cytochrome *c*.

Afin de mettre au point une analyse en ligne, le support d'immunoextraction a été conditionné dans des précolonnes de dimensions 20 x 1 mm d.i et 20 x 2 mm d.i. Ces deux colonnes peuvent être remplies par 7,5 et 30 mg de phase respectivement. Les ISs résultants ont été nommés IS 1 et IS 2 respectivement. Afin de garantir un bon remplissage de la précolonne sans volume mort, 35 mg de Sépharose activée CNBr ont été utilisés pour la synthèse de l'immunoadsorbant. Compte tenu du coût des anticorps, de faibles quantités d'anticorps (100 µg) ont été greffées sur le support, correspondant à 0,29 mg d'anticorps sur 100 mg de phase. Cette quantité est faible par rapport aux quantités généralement utilisées au laboratoire (1 mg d'anticorps pour 100 mg de phase). Concernant la concentration en anticorps dans la solution de greffage, elle est de 1 $mg.mL^{-1}$. En effet, s'il a été démontré qu'il existait une quantité optimale d'anticorps qu'il était possible de greffer sur un support pour des raisons de gênes stériques [4], il a aussi été démontré que la concentration en anticorps de la solution de greffage avait une importance sur les rendements de greffage. Une précédente étude menée au laboratoire avait d'ailleurs permis de vérifier la faisabilité d'un tel greffage à 1 $mg.mL^{-1}$ dans les mêmes proportions d'anticorps et de support que cette étude (0,33 mg d'anticorps monoclonaux sur 100 mg de phase) [2]. Dans l'optique de la miniaturisation du système, il est essentiel de s'assurer de l'obtention d'un taux de greffage optimal garantissant une capacité suffisante compte tenu de la sensibilité attendue de l'analyse.

Le protocole d'immobilisation de 100 µg d'anticorps monoclonaux anti-cytochrome *c* sur 35 mg de Sépharose CNBr pour la synthèse des ISs utilisés dans cette étude est décrit en annexe 8. Deux synthèses indépendantes ont été réalisées pour l'élaboration des IS 1 et IS 2, elles permettront d'ailleurs d'estimer la répétabilité de la synthèse. De plus, la synthèse d'un immunoadsorbant de dimension inférieure (IS 1 : 1 mm d.i.) est un premier pas pour la miniaturisation du système analytique.

IV.2.2. Caractérisation de l'immunoadsorbant

IV.2.2.1. Principe

Le cytochrome *c* présente un spectre d'absorption UV-visible, illustré en figure IV-2, avec un maximum d'absorbance à 400 nm. Cette propriété a été exploitée afin d'évaluer la rétention du cytochrome *c* sur l'immunoadsorbant lors de la mise au point de la procédure d'extraction.

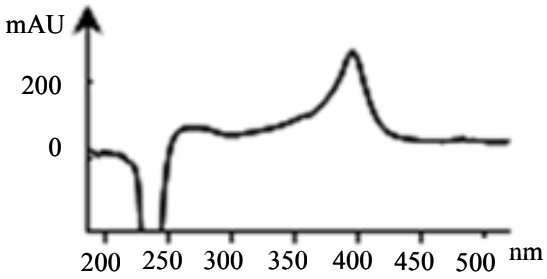


Figure IV-2 : Spectre d'absorption UV du cytochrome c obtenu par injection directe d'1 µg de cytochrome c dans le détecteur UV au moyen d'acide formique pH 2.

Pour ce faire, l'IS a été directement connecté à un détecteur UV, la percolation du cytochrome *c* étant assurée par une pompe de préconcentration (figure IV-3). Afin d'obtenir un pic présentant une meilleure efficacité pour la détection du cytochrome *c*, il aurait fallut connecter une colonne analytique en sortie de l'IS. Toutefois, cela n'a pas été possible en raison de la faible résistance mécanique du support d'immobilisation de l'IS.

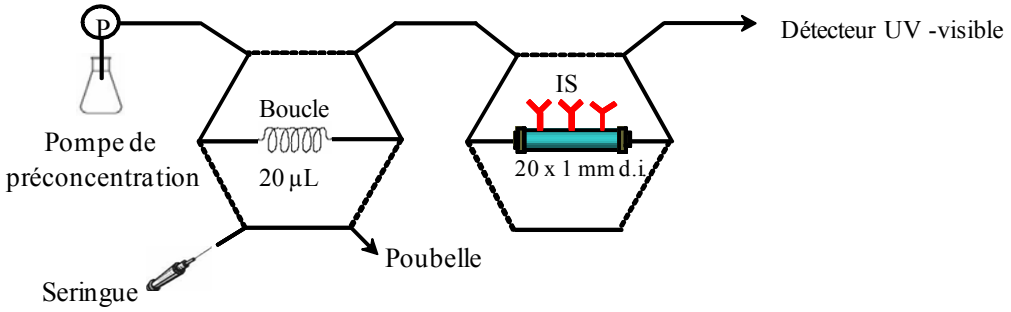


Figure IV-3 : Schéma du couplage direct entre l'immunoadsorbant et le détecteur UV-visible pour la mise au point de la procédure d'immunoextraction.

Dans un premier temps, la droite d'étalonnage du cytochrome *c* a été établie en injectant des quantités croissantes de cytochrome *c* directement vers le détecteur. La figure IV-4 présente les aires des pics obtenus à 400 nm après injection de cytochrome *c* entre 0,5 et 4 µg (40 et 340 pmol) véhiculé par une solution d'acide formique (pH 2) à 20 µL.min^{-1}.

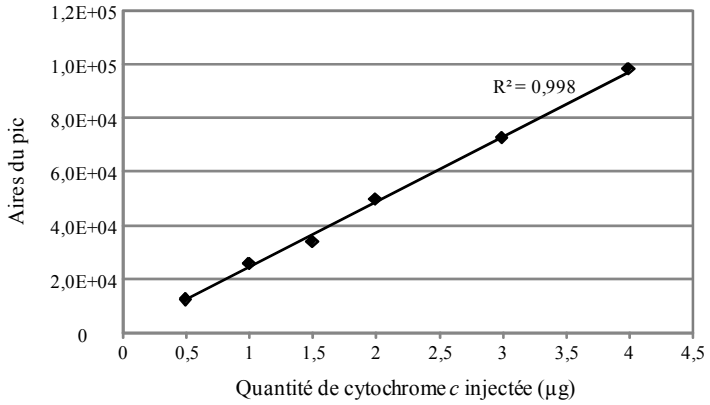


Figure IV-4 : Aires des pics obtenus à 400 nm après injection de cytochrome c entre 0,5 et 4 µg (40 et 340 pmol) véhiculé par une solution d'acide formique (pH 2) à 20 µL.min^{-1} vers le détecteur UV.

La figure IV-4 montre qu'une relation linéaire est obtenue pour des quantités de cytochrome *c* comprises entre 0,5 et 4 µg. Des extractions quantitatives du cytochrome *c* peuvent donc être réalisées dans cette gamme de concentration.

IV.2.2.2. Développement d'un protocole d'extraction du cytochrome *c*

(i) Rappels des résultats préliminaires

Des études préliminaires ont été menées au laboratoire. Ainsi, un protocole d'immunoextraction a été précédemment développé sur un IS synthétisé à partir de 100 µg d'anticorps monoclonaux anti-cytochrome *c* immobilisés sur 30 mg de silice activée glutaraldéhyde [5]. En premier lieu, le volume de fin de fixation du cytochrome *c* sur l'IS a été étudié et a permis de vérifier que 5 mL de tampon phosphate salin (PBS) pouvait être percolés sur l'immunoadsorbant sans observer de perte de la protéine. De plus, le volume de fin de fixation dans l'eau pure a été estimé à plus de 15 mL. En conséquence, des étapes de percolation de l'échantillon et de lavage à l'eau pure ont pu être envisagées sans aucune perte du cytochrome *c*. Dans un second temps, différentes conditions de désorption ont été testées et il a été montré que des solutions salines (tampon Tris pH 8) et des ions chaotropes (NaCl ou $LiClO_4$ à 2 mol.L^{-1}) ne permettaient pas l'élution efficace de la protéine. Seule une solution acide avec un pH de l'ordre de 2-3 a permis l'élution du cytochrome *c*. Enfin, la sélectivité de l'IS a été évaluée avec l'albumine de sérum bovin (BSA) en tant que protéine interférente. Ainsi, une étape de lavage par 1 mL de NaCl à 2 mol.L^{-1} a été mise au point afin d'éliminer totalement la protéine interférente non spécifiquement retenue sur l'IS. Finalement, le

protocole d'immunoextraction développé lors de cette précédente étude est présenté dans le tableau IV-1.

Etape	**solvant utilisé**
Remplissage boucle	20 µL d'une solution de Tris-HCl à pH 8 dopée à 500 ng de cytochrome *c* et 5 µg de BSA
Percolation	2 mL d'eau pure
Lavage	1 mL de solution de NaCl à 2 $mol.L^{-1}$ 1 mL d'eau
Elution	1 mL d'une solution de CH_3COOH à pH 2,5 avec 3% d'acétonitrile

Tableau IV-1 : Protocole d'extraction sélectif du cytochrome c sur l'immunoadsorbant anti-cytochrome c à base de silice activée glutaraldéhyde (100 µg d'anticorps sur 30 mg de silice activée) [5].

Cette étude a permis de montrer la faisabilité de l'immunoextraction pour le cytochrome *c* par l'élaboration d'un protocole sélectif avec un support de silice [5]. Cependant, une étude beaucoup plus approfondie afin d'évaluer le rendement d'extraction, la capacité de l'IS et également les risques d'interactions non spécifiques avec le support doit être réalisée.

(ii) Protocole d'immunoextraction utilisé dans cette étude

Dans cette étude, comme deux immunoadsorbants (IS 1 et IS 2) ont été conditionnés dans des précolonnes de 1 mm et 2 mm de diamètre interne respectivement, par immobilisation d'anticorps anti-cytochrome *c* sur un support de Sépharose activée CNBr, le protocole d'extraction développé précédemment a été adapté à la présente étude.

L'IS 2 étant de même dimension que l'IS développé dans la précédente étude, le protocole d'immunoextraction est donc très semblable. Toutefois, l'étape de percolation a été légèrement modifiée. En effet, afin de mimer les conditions physiologiques, la solution de percolation qui était initialement de l'eau pure a été remplacée par du tampon PBS. Compte tenu des volumes morts entre la boucle d'injection (20 µL) et l'IS 2 (44 µL), 1 mL de tampon suffit largement à la percolation de la protéine sur l'IS. Durant cette étape, aucune perte de rétention du cytochrome *c* n'a été observée en sortie de l'IS 2 au niveau de détecteur UV. En ce concerne l'étape de lavage, les volumes ont été conservés par rapport au précédent protocole. Un lavage par 1 mL de NaCl à 2 $mol.L^{-1}$ a donc été réalisé. Puis, 1 mL d'eau pure a

été percolé afin d'éliminer les sels de l'immunoadsorbant. De nouveau, par contrôle avec le détecteur UV, aucune élution de cytochrome *c* a été observée.

En ce qui concerne l'IS 1, les volumes et les débits du protocole d'immunoextraction ont été adaptés. En effet, dans le cas de l'IS 1, le volume mort de la colonne (11 µL) est 4 fois inférieur à celui de l'IS 2 (44 µL) car le diamètre de la précolonne est deux fois plus petit. Les volumes choisis ont donc été 4 fois inférieurs à ceux précédemment utilisés. Ainsi, les 20 µL de la solution de tampon Tris dopée par 1 µg de cytochrome *c* ont été transférés par 250 µL de tampon PBS à 50 $\mu L.min^{-1}$. De la même façon, le lavage a été réalisé par 250 µL de NaCl à 2 $mol.L^{-1}$ suivi de 250 µL d'eau pure. Il a été également vérifié que ces deux étapes de lavage ne modifiaient pas la rétention du cytochrome *c* sur l'IS.

Les protocoles ont aussi été modifiés de façon à ce que le solvant d'élution soit compatible avec la digestion enzymatique à la pepsine. Le solvant d'élution choisi a donc été de l'acide formique à pH 2. Les protocoles d'extraction utilisés sur l'IS 1 et sur l'IS 2 sont résumés dans le tableau IV-2.

		IS 1 (20 x 1 mm d.i.)	**IS 2** (20 x 2 mm d.i.)
étape	**solvant utilisé**	**Volumes et débits**	
échantillon	Tampon Tris (pH 8) : 1 µg de cytochrome *c*, 20 µg d'albumine et 2 µg de myoglobine	20 µL	20 µL
percolation	PBS	250 µL à 50$\mu L.min^{-1}$	1 mL à 200 $\mu L.min^{-1}$
lavage	NaCl 2 à $mol.L^{-1}$	250 µL à 50$\mu L.min^{-1}$	1 mL à 200 $\mu L.min^{-1}$
	H_20	250 µL à 50$\mu L.min^{-1}$	1 mL à 200 $\mu L.min^{-1}$
élution	HCOOH pH 2	20 $\mu L.min^{-1}$	100 $\mu L.min^{-1}$

Tableau IV-2 : Protocoles d'extraction sélectifs du cytochrome c sur l'IS 1 et sur l'IS 2.

La figure IV-5 présente les chromatogrammes obtenus après l'élution du cytochrome *c* de l'IS 1 et de l'IS 2 par une solution d'acide formique à pH 2 à 20 $\mu L.min^{-1}$ et 100 $\mu L.min^{-1}$ respectivement.

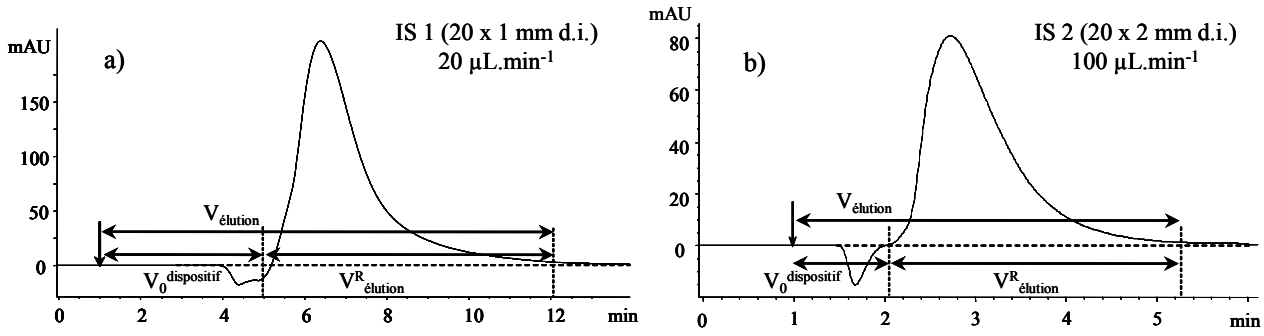


Figure IV-5 : Chromatogrammes enregistrés au cours de l'élution par de l'acide formique à pH 2 à 20 µL.min^{-1} sur l'IS 1 (a) et à 100 µL.min^{-1} sur l'IS 2 (b) après la percolation d'1 µg de cytochrome c (20 µL). Absorbance : 400 nm. Les flèches indiquent le début de l'élution.

La figure IV-5 montre bien que le cytochrome *c* est élué avec la solution d'acide formique à pH 2 sur les deux ISs. Le volume d'élution apparent ($V_{élution}$) est de 220 µL et de 420 µL pour les IS 1 et IS 2 respectivement. Après le début de l'étape d'élution, c'est-à-dire à 1 minute sur les chromatogrammes, le cytochrome *c* apparaît au niveau du détecteur au bout de 4 minutes pour l'IS 1 qui correspondent à 80 µL d'acide formique et au bout d'un peu plus d'une minute pour l'IS 2 qui correspondent à 110 µL d'acide formique. Ces volumes correspondent au volume mort du dispositif contenant les connectiques jusqu'au détecteur UV (70 µL) et les ISs (11 µL pour l'IS 1 et 44 µL pour l'IS 2), ils sont notés $V_0^{dispositif}$ sur les chromatogrammes. Le volume d'élution réel ($V^R_{élution}$) est donc de 140 µL pour l'IS 1 et de 310 µL pour l'IS 2. Ces volumes ont été obtenus en éluant le cytochrome *c* dans le même sens que la percolation et il a été vérifié que les mêmes résultats étaient obtenus en mode rétro-balayage. De plus, le solvant d'élution utilisé dans la précédente étude a été testé (CH_3COOH, pH 2,5 + 3% d'acétonitrile) et aucune diminution du volume d'élution n'a été observée, témoignant de la force éluante satisfaisante de l'acide formique qui a pour avantage d'être compatible avec la digestion par la pepsine.

(iii) Evaluation de la sélectivité du protocole

L'apport en sélectivité d'un immunoadsorbant est le paramètre clé justifiant l'utilisation d'un tel support pour l'étape de traitement de l'échantillon. Il était ainsi essentiel de s'assurer de la bonne sélectivité du protocole d'extraction. Pour cela, deux protéines, l'albumine et la myoglobine, ont été ajoutées comme protéines interférentes à la solution de cytochrome *c* percolée. En tenant compte de sa grande concentration dans le plasma,

l'albumine a été introduite à une teneur 20 fois plus élevée (1 $mg.mL^{-1}$) que le cytochrome *c* (50 $\mu g.mL^{-1}$). Concernant la myoglobine, elle a été introduite en quantité deux fois plus importante que le cytochrome *c* à savoir 0,1 $mg.mL^{-1}$. Au même titre que le cytochrome *c*, la détection de ces deux protéines a été réalisée par UV. Les spectres d'absorption de l'albumine et de la myoglobine sont présentés en figure IV-6 ; ils présentent des maxima d'absorbance à 280 nm et 400 nm respectivement.

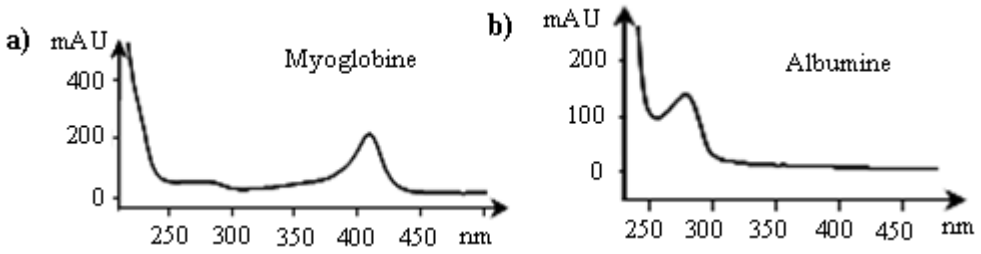


Figure IV-6 : Spectres d'absorption UV de la myoglobine (a) et de l'albumine (b) obtenus par injection directe de 20 µL dans le détecteur UV dans une solution de PBS et de NaCl à 2 $mol.L^{-1}$ respectivement. Débit : 50 $\mu L.min^{-1}$.

Au cours de la percolation du mélange des 3 protéines par 250 µL de PBS sur l'IS 1, la myoglobine a été immédiatement éluée comme la montre la figure IV-7 a). Ce premier résultat illustre la grande spécificité de l'interaction antigène-anticorps. Toutefois, l'albumine est retenue sur l'IS lors de l'étape de percolation, ce qui révèle la présence d'interactions non spécifiques. Une étape de lavage est donc nécessaire pour éliminer la protéine interférente. Ainsi, comme déjà mentionné, une solution de NaCl à 2 $mol.L^{-1}$ a permis de réduire les interactions non spécifiques entre l'IS et l'albumine tout en conservant la rétention du cytochrome *c*. L'élution de l'albumine lors de l'étape de lavage est illustrée sur la figure IV-7 b).

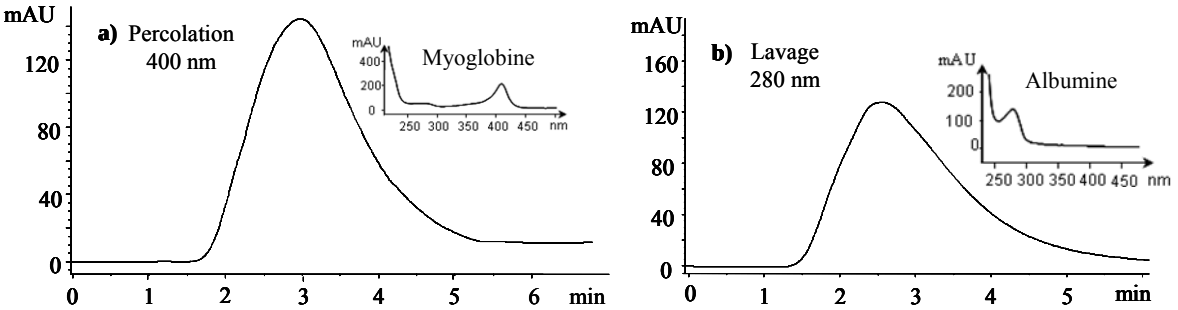


Figure IV-7 : Chromatogrammes enregistrés au cours des étapes de percolation (a) et de lavage (b) après injections de myoglobine et d'albumine (20 µL) sur l'IS 1. Détection à 400 nm (a) et à 280 nm (b). Débit : 50 $\mu L.min^{-1}$.

Le même mélange de protéine a été percolé sur l'IS 2 (20 x 2 mm d.i.) et, après application du protocole d'immunoextraction décrit précédemment (tableau IV-2), des résultats similaires ont été obtenus. Des interactions sélectives sont donc bien mises en jeu entre les ISs développés et le cytochrome *c*.

En conclusion, les performances du protocole développé en termes de sélectivité ont été démontrées. Afin d'évaluer les performances en termes de rétention, le rendement d'extraction et la capacité doivent être à présent évalués.

IV.2.2.3. Capacité des immunoadsorbants

Lors d'une extraction, il est important de s'assurer que la quantité de composé percolée ne soit pas supérieure à la capacité du support, ce qui mènerait à une perte du composé cible dès l'étape de percolation. La capacité est directement liée au nombre et à la nature des anticorps greffés ainsi qu'à leur accessibilité. En effet, il est couramment admis que la capacité réelle d'un IS est largement inférieure à la capacité théorique pouvant être calculée à partir de la quantité d'anticorps immobilisés [6]. Pour ces raisons, la capacité réelle a été mesurée expérimentalement.

Pour estimer la capacité de l'IS 1, des quantités croissantes de cytochrome *c* comprises entre 0,5 et 4 µg (40 pmol à 340 pmol) ont été percolées suivant le protocole décrit dans le tableau IV-2. La quantification du cytochrome *c* dans la fraction d'élution a été réalisée en UV comme précédemment. La figure IV-8 présente la quantité de cytochrome *c* retenue sélectivement sur l'IS 1 en fonction de la quantité de cytochrome *c* percolée.

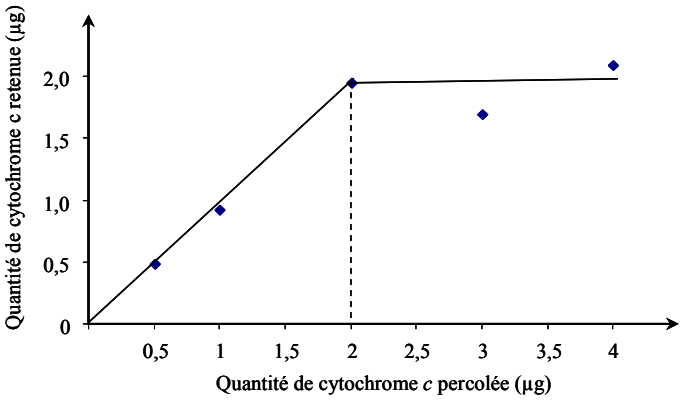


Figure IV-8 : Courbe de capacité obtenue après percolation de quantités croissantes de cytochrome c sur l'IS 1 préparé à partir de 25 µg d'anticorps anti-cytochrome c.

La courbe de capacité obtenue présente une partie linéaire définissant la gamme de quantité de cytochrome *c* pouvant être extraite sélectivement par l'IS. La pente de la droite

indique directement le rendement d'extraction constant du cytochrome *c* estimé à 95 %. Ce résultat est proche des 90 % obtenus avec l'immunoadsorbant anti-BSA à base d'un support commercial d'agarose immobilisé par des anticorps anti-BSA conditionné en précolonne de 15 x 3 mm d.i. (74 µL) [1]. En conclusion, le rendement d'extraction obtenu démontre les très bonnes performances de l'IS développé dans cette étude.

Pour de plus grandes quantités de cytochrome *c*, la courbe atteint un plateau traduisant la saturation des sites de fixation accessibles sur l'immunoadsorbant. La capacité expérimentale est estimée au niveau de la rupture de pente et correspond à 2 µg (0,17 nmol) de cytochrome *c*. On peut estimer la capacité théorique à partir de la quantité d'anticorps (100 µg) en considérant deux sites de fixation par anticorps. Des études précédentes menées au laboratoire sur des immunoadsorbants développés pour des petites molécules ont montré que la valeur de la capacité réelle pouvait être expliquée par un taux de greffage de l'ordre de 80 % et un taux d'accessibilité de 50 % des sites de fixation des anticorps après greffage en raison du caractère aléatoire de celui-ci [6]. Pour cette étude, la capacité théorique est de 4 µg et la capacité réelle est estimée à 2 µg (0,17 nmol). On retrouve donc le facteur de 50 % entre les deux valeurs que l'on peut encore attribuer à 50 % d'accessibilité des anticorps, ce qui sous-entend néanmoins un taux de greffage de 100 %. En conclusion, la capacité réelle obtenue est supérieure à la valeur attendue compte tenu des observations faites sur les immunoadsorbants développés contre les petites molécules. Ces résultats indiquent donc un greffage efficace des anticorps.

Dans la littérature, l'IS anti-BSA développé présente une capacité largement supérieure (1215 nmol, 81 µg) [1]. Cependant, cet IS est difficilement comparable avec celui développé dans notre étude car le support d'agarose greffé par des anticorps anti-BSA est un support commercial et aucune information sur la quantité d'anticorps greffée n'a été donnée. Toutefois, une capacité de 2 µg est largement suffisante pour l'analyse de protéines très minoritaires dans les échantillons biologiques. Ainsi, en utilisant l'IS 1, l'analyse totale d'une protéine ciblée n'est pas limitée par la capacité.

Pour confirmer ces résultats, la capacité de l'IS 2 a été également estimée. Les IS 1 et 2 ayant été synthétisés indépendamment mais selon le même protocole de greffage, le même taux de greffage est attendu entre les deux synthèses. Toutefois, la quantité d'immunoadsorbant utilisée pour remplir la colonne de l'IS 2 est 4 fois supérieure par rapport à l'IS 1. Par conséquent, si le taux de greffage est identique, une capacité 4 fois supérieure est attendue pour l'IS 2 par rapport à l'IS 1.

Afin d'estimer la capacité de l'IS 2, des quantités croissantes de cytochrome *c* comprises entre 1 et 20 µg (85 pmol à 1,7 nmol) ont été percolées par 1 mL de PBS sur l'IS 2 directement connecté au détecteur UV comme précédemment. Après application du protocole décrit sur le tableau IV-2, les aires de pics sont reportés en fonction de la quantité de cytochrome *c* injectée. La courbe expérimentale obtenue est présentée sur la figure IV-9.

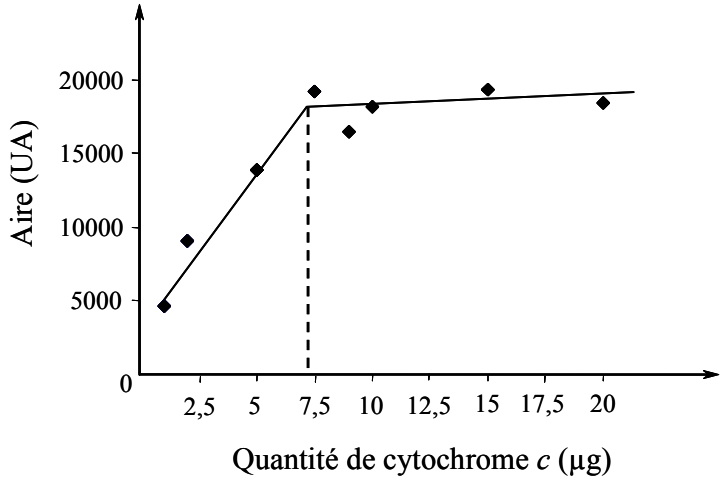


Figure IV-9 : Courbe de capacité obtenue après percolation de quantités croissantes de cytochrome c sur l'IS 2 préparé à partir de 100 µg d'anticorps anti-cytochrome c. UA : unité arbitraire.

Ainsi, la capacité, estimée au niveau de la rupture de pente, est de l'ordre de 7 µg (0,65 nmol) de cytochrome *c* au lieu des 8 µg attendus compte tenu de l'augmentation du volume de la précolonne. Ce résultat ne diffère que de 12,5 % avec la capacité attendue. Les synthèses des IS 1 et IS 2 étant indépendantes, la mesure des capacités a démontré la très bonne répétabilité du greffage des anticorps sur le support.

IV.2.3. Conclusion

Deux immunoadsorbants anti-cytochrome *c* ont été synthétisés et caractérisés en termes de sélectivité et de capacité. Les capacités obtenues avec une faible densité de greffage sont largement suffisantes pour l'analyse de protéines minoritaires et permettent d'envisager la miniaturisation de l'immunoadsorbant. Le grand potentiel des immunoadsorbants pour l'extraction sélective d'une protéine ciblée a été démontré et permet d'envisager l'extraction d'une protéine ciblée dans des échantillons biologiques complexes tels que le plasma. La digestion sur support d'enzymes immobilisées ayant été précédemment mise au point, il est alors nécessaire de coupler l'étape d'immunoextraction à la digestion enzymatique.

IV.3. Analyse en ligne d'une protéine par immunoextraction

Comme mentionné en début de chapitre, cette étude propose le couplage entre l'étape d'immunoextraction et la digestion enzymatique sur un support d'enzymes immobilisées. Pour un couplage optimal entre l'IS et l'IMER, le réacteur de pepsine IMER Seph-P (1) sera utilisé et appelé IMER de pepsine dans la suite de ce manuscrit.

IV.3.1. Présentation du montage

D'un point de vue pratique, le montage expérimental consiste à ajouter une vanne de commutation 6 voies contenant un immunoadsorbant entre la boucle d'injection et le réacteur enzymatique. La figure IV-10 présente le montage expérimental utilisé.

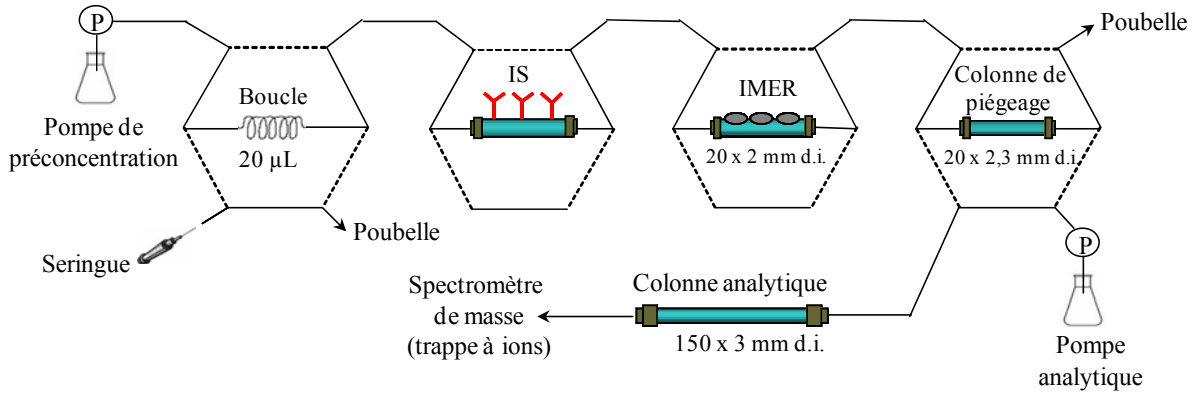


Figure IV-10 : Présentation du montage en ligne pour l'analyse d'une protéine ciblée après immunoextraction et digestion en ligne.

IV.3.2. Optimisation du couplage

Le protocole de digestion mis au point au chapitre précédent est réalisé en « stop-flow », c'est-à-dire que la digestion est réalisée en arrêtant le débit sur le réacteur enzymatique. Pour cette raison et comme déjà mentionné, un soin particulier doit être pris pour mettre au point la procédure d'analyse en ligne et en particulier les volumes de transfert.

En effet, les volumes d'élution du cytochrome *c* des IS 1 et IS 2 étant de 140 µL et 310 µL respectivement, ils sont largement supérieurs au volume mort de l'IMER estimé à 44 µL. Les volumes d'élution obtenus ne sont qu'une estimation en raison du volume mort du système de détection qui a certainement conduit à une surestimation de ces volumes d'élution. Toutefois, il est clair que cette différence est problématique lors du couplage entre l'IS et

l'IMER. Pour cette raison, dans un premier temps le couplage avec l'IMER de pepsine a été réalisé avec l'IS dont le volume d'élution est le plus faible, l'IS 1.

IV.3.2.1. Couplage de l'IS 1 avec l'IMER de pepsine

Pour la mise au point du couplage entre l'IS et l'IMER, l'objectif est que la majorité du cytochrome *c* soit éluée de l'IS et bien transférée sur l'IMER de pepsine de volume mort de 44 µL. Le volume de transfert a été choisi en prenant en compte les volumes morts des précolonnes (11 µL pour l'IS 1), le volume mort des connectiques (50 µL) et le volume d'élution de l'IS 1 précédemment estimé (140 µL). Finalement, un volume de transfert de 120 µL entre l'IS et l'IMER a été choisi comme compromis entre le volume mort du système (105 µL) et le volume d'élution de l'IS 1 (140 µL). Toutefois, comme déjà mentionné, si le volume d'élution est réellement supérieur au volume mort de l'IMER (44 µL), une partie du cytochrome *c* sera en dehors de l'IMER pendant les 20 minutes de digestion en « stop-flow ».

Ainsi, après application des étapes de percolation et de lavage du protocole d'immunoextraction précédemment décrit, la vanne contenant l'IMER de pepsine est commutée de façon à connecter en ligne l'IS 1 et l'IMER de pepsine. Le cytochrome *c* est alors élué puis transféré sur l'IMER par 120 µL d'acide formique (pH 2) à 20 $\mu L.min^{-1}$. Puis, le protocole de digestion développé au chapitre III est appliqué. Brièvement, le débit est arrêté durant 20 minutes sur l'IMER pour que la protéine soit digérée. Puis, la vanne contenant la précolonne de piégeage est commutée et les peptides sont transférés sur la précolonne de piégeage (PRP-1) par 500 µL d'acide formique à 100 $\mu L.min^{-1}$. Finalement, les peptides sont élués par la phase mobile vers la colonne analytique où ils sont séparés puis analysés par spectrométrie de masse comme décrit en annexe 2. Le tableau IV-3 décrit le protocole d'analyse totale *via* l'IS 1.

étape	solvant utilisé
échantillon	20 µL d'une solution de Tris à pH 8 dopée à 1 µg de cytochrome *c*
immunoextraction	- percolation de 250 µL de PBS *via* la boucle d'injection (débit : 50 $\mu L.min^{-1}$) - percolation de 250 µL de NaCl à 2 $mol.L^{-1}$, 250 µL d'eau pure (débit : 50 $\mu L.min^{-1}$) - percolation de 120 µL d'HCOOH (pH 2) à 20 $\mu L.min^{-1}$
digestion en ligne	L'IMER de pepsine a été conditionné préalablement avec de l'acide formique (pH 2) - arrêt du flux pendant 20 min - percolation de 500 µL d'HCOOH (pH 2) vers la précolonne de piégeage (débit : 100 $\mu L.min^{-1}$)
séparation analytique	transfert des peptides de la précolonne vers la colonne analytique par la phase mobile par un gradient de 2 à 40 % de MeCN en 20 minutes puis analyse MS/MS.

Tableau IV-3 : Protocole d'analyse en ligne du cytochrome c par IS 1-IMER-LC-MS/MS

Ainsi, la digestion d'1 µg de cytochrome *c* (85 pmol) a été effectuée à trois répétitions sur l'IMER de pepsine couplé à l'IS 1. Cette quantité a été choisie afin de ne pas dépasser la capacité de l'IS 1 qui est de 2 µg (171 pmol). Tout d'abord, le cytochrome *c* a été reconnu par MASCOT avec un recouvrement de séquence de 47 %, identique à la valeur obtenue sans IS. Ce premier résultat indique la faisabilité du couplage et confirme la bonne rétention de la protéine sur l'IS. Afin d'évaluer les performances de la méthode, la même quantité de cytochrome *c* (1 µg, 20 µL) a été analysée après digestion en ligne sur l'IMER de pepsine sans immunoextraction préliminaire à trois répétitions. La figure IV-11 présente les aires des pics des deux peptides spécifiques du cytochrome *c* obtenus de masses 1386,8 et 1017,5 Da.

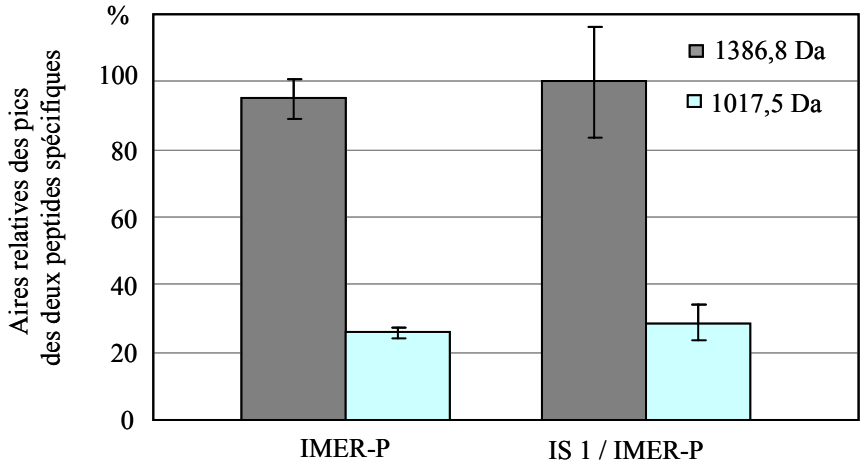


Figure IV-11 : Aires relatives cumulées des pics des rapports m/z correspondant aux deux peptides spécifiques du cytochrome c de masses 1386,8 et 1017,5 Da après digestion en ligne de 1 µg de cytochrome c sur l'IMER de pepsine (IMER-P) directement ou après extraction sur l'IS 1. Le transfert entre l'IS1 et l'IMER est assuré par 120 µL d'acide formique (pH 2) à 20 $\mu L.min^{-1}$ (n=3).

Notons tout d'abord la répétabilité des analyses avec des coefficients de variations inférieurs à 17 % pour les deux peptides. Les aires des pics obtenues après le couplage sont similaires à celles obtenues sans immunoadsorbant, ce qui confirme un rendement d'extraction proche de 100 % pour l'IS 1. De plus, les résultats sont très similaires avec ou sans IS 1 couplé à la digestion en ligne sur l'IMER de pepsine.

Il est tout de même important de noter les principales différences de protocole entre les deux analyses. En effet, le temps de digestion est modifié lors du couplage puisqu'en appliquant un débit de 20 $\mu L.min^{-1}$ lors du transfert vers l'IMER, le temps de digestion est augmenté de quasiment 6 minutes par rapport à une digestion en ligne sans immunoextraction préliminaire. D'autre part, avant l'élution, l'IS est rincé à l'eau alors que lors de la digestion sans immunoextraction, le cytochrome *c* est percolé dans une solution tamponnée Le pH de digestion est donc plus proche de 2 dans le cas du couplage par rapport à la digestion en ligne seule. Ces deux paramètres sont en faveur d'une digestion plus efficace lorsque l'IS est couplé à l'IMER, ce qui compense avec le volume d'élution élevé. Cependant, compte tenu des résultats similaires obtenus avec et sans IS, le volume d'élution de l'IS a probablement été surestimé.

Le rendement de l'analyse en ligne totale peut aussi être calculé par rapport à la digestion en solution de la même quantité de cytochrome *c*. Au chapitre précédent, il a été démontré que le rendement de la digestion sur l'IMER de pepsine n'était pas total par rapport à la digestion en solution ; il a été estimé entre 54 et 75 % pour les peptides de masses 1017,5 et 1386,8 Da respectivement. L'analyse totale en ligne par couplage de l'IS 1 avec l'IMER de pepsine a donc un rendement du même ordre (en moyenne 65 %) par rapport à la digestion en solution de 1 µg de cytochrome *c*. Ce rendement de digestion est imputable à l'étape de digestion elle-même puisqu'on a précédemment démontré les bons rendements d'immunoextraction et de couplage. Néanmoins, ces résultats démontrent la très bonne faisabilité de l'analyse totale en ligne mise au point par comparaison au couplage entre un immunoadsorbant anti-BSA et un IMER de trypsine commercial qui avait donné un rendement de couplage de seulement 4 % par rapport à la digestion en solution de 75 pmol de BSA (5 µg) [1]. Dans l'étude citée, le rendement d'immunoextraction étant de 90 %, le très faible rendement total de 4 % est donc probablement lié au couplage entre l'IS et le réacteur enzymatique qui a échoué.

En conclusion, les résultats obtenus démontrent le fort potentiel de cette méthode. En effet, le couplage entre l'immunoextraction et la digestion enzymatique a été un succès. De

plus, l'analyse totale du cytochrome *c* par immunoextraction couplée à une digestion en ligne suivie d'une analyse par LC-MS/MS a pu être réalisée en seulement 90 minutes.

Les plus grandes dimensions de l'IS de 2 mm de diamètre interne pouvant être un atout pour limiter la perte de charge du système analytique, en dépit des risques liés à un plus grand volume d'élution, le potentiel du couplage de l'IS 2 à l'IMER a donc été étudié.

IV.3.2.2. Couplage de l'IS 2 avec l'IMER de pepsine

Au vu des résultats obtenus avec l'IS 1, le volume de transfert choisis entre l'IS 2 et l'IMER de pepsine a été de 150 µL. Le montage n'ayant pas été modifié, la différence avec le volume précédemment utilisé correspond à la différence de volume mort entre l'IS 1 et l'IS 2 qui est d'environ 30 µL. Le protocole d'analyse totale avec l'IS 2 est similaire à celui développé pour l'IS 1. Brièvement, le protocole d'immunoextraction est celui développé précédemment sur l'IS 2 (tableau IV-2). Puis, après élution du cytochrome *c* par 150 µL d'acide formique sur l'IMER de pepsine, la protéine est digérée durant 20 minutes en « stop-flow ». Comme pour le couplage précédent, les peptides ainsi générés sont transférés sur la colonne de piégeage par 500 µL d'acide formique. Les conditions d'analyse par LC-MS/MS sont les mêmes que celles décrites pour le couplage avec l'IS 1 (annexe 2).

La digestion de 1 µg de cytochrome *c* (85 pmol) a été effectuée à trois répétitions sur l'IMER de pepsine couplé à l'IS 2 selon le protocole décrit ci-dessus. Le cytochrome *c* a bien été reconnu par la logiciel MASCOT avec un recouvrement de séquence de 38 % indiquant que le couplage est performant. Les résultats du couplage en ligne ont ensuite été comparés aux résultats précédemment obtenus après couplage avec l'IS 1 et après digestion en ligne sur l'IMER de pepsine sans étape d'immunoextraction de la même quantité de cytochrome *c* (1 µg). La figure IV-12 présente les aires des pics des différents rapports *m/z* correspondant aux deux peptides spécifiques du cytochrome *c* de masses 1386,8 et 1017,5 Da.

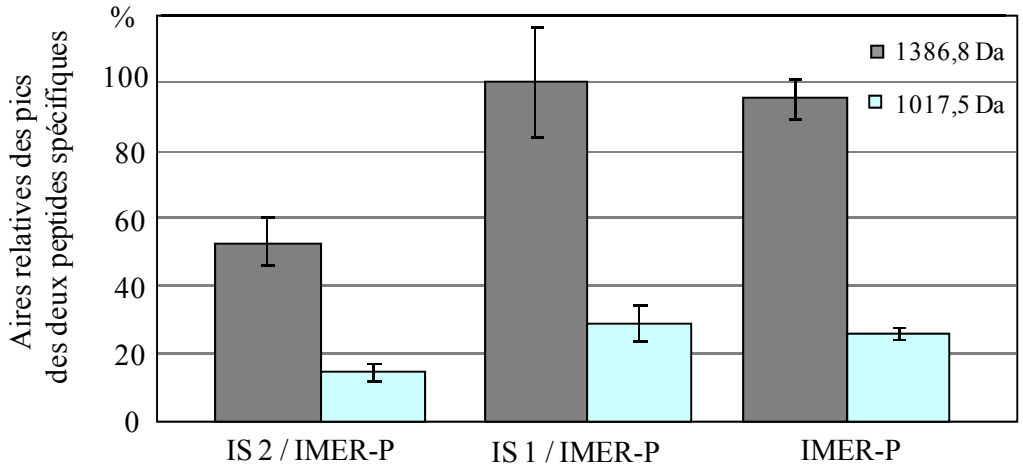


Figure IV-12 : Aires relatives des pics des peptides spécifiques du cytochrome c de masses 1386,8 et 1017,5 Da après digestion en ligne de 1 µg de cytochrome c sur l'IMER-P sans et avec immunoextraction par les IS 1 et IS 2 (n=3).

Notons tout d'abord la répétabilité des analyses avec des coefficients de variations inférieurs à 17 % pour les deux peptides. On peut observer que, comme attendu, l'analyse totale du cytochrome *c via* l'IS 2 donne des réponses bien inférieures à celles obtenues sur l'IMER de pepsine sans immunoadsorbant. Ce résultat peut s'expliquer par le volume de transfert trop important utilisé pour le couplage. En effet, le volume d'élution du cytochrome *c* de l'immunoadsorbant IS 2 estimé précédemment est de 310 µL. Même si ce volume est certainement surestimé en raison de l'élargissement du front d'élution dans le système, le volume de transfert appliqué entre l'IS 2 et l'IMER (150 µL) n'a pas du être suffisant pour assurer l'élution complète de la protéine. De plus, le volume d'élution est largement supérieur au volume mort de l'IMER estimé à 44 µL. Or, la digestion étant effectuée par arrêt du débit sur l'IMER, seule une fraction de la protéine éluée de l'IS 2 pourra être digérée pendant les 20 minutes. Le couplage avec l'IS 2 dans les conditions utilisées n'est donc pas optimal.

En comparant le couplage de l'IS 2 avec celui de l'IS 1, les résultats indiquent que, par rapport à l'IS 2, une plus grande partie du cytochrome *c* en sortie de l'IS 1 est digérée sur l'IMER de pepsine. Dans la configuration utilisée, le volume d'élution a donc bien un effet primordial sur la digestion enzymatique.

Afin de palier cette limitation, il est possible d'éluer la protéine vers l'IMER en appliquant un débit continu entre l'élution, la digestion et le transfert sur la colonne de piégeage. Cependant, comme précédemment mentionné, un temps de contact de 20 minutes entre les enzymes immobilisées et la protéine nécessite un débit bien trop faible (1 $\mu L.min^{-1}$) pour être appliqué avec les pompes dont nous disposons pour cette partie de l'étude.

Un transfert de la protéine sur l'IMER avec un débit plus faible de 10 µL.min^{-1} a tout de même été testé avant de laisser digérer la protéine pendant 20 minutes en arrêtant le débit sur l'IMER de pepsine. Pour cela, une solution de 5 µg de cytochrome *c* (0,43 nmol) a été analysée par couplage de l'IS 2 avec l'IMER de pepsine selon le protocole précédemment décrit à l'exception du débit d'élution et donc de transfert sur l'IMER qui est de 10 µL.min^{-1} au lieu de 100 µL.min^{-1}. Là encore, le cytochrome *c* est bien reconnu par la logiciel MASCOT avec un recouvrement de séquence de 30 %. Afin d'évaluer les performances de cette méthode, la même quantité de cytochrome *c* (5 µg) a été analysée par couplage de l'IS 2 et de l'IMER de pepsine avec un débit de transfert de 100 µL.min^{-1}. A l'aide de la mesure des aires des deux peptides caractéristiques du cytochrome *c*, les résultats obtenus avec l'IS 2 à ces débits de transfert ont été comparés à la digestion en ligne de 5 µg de cytochrome *c* sur l'IMER de pepsine sans étape d'immunoextraction préliminaire. Les résultats sont présentés sur la figure IV-13.

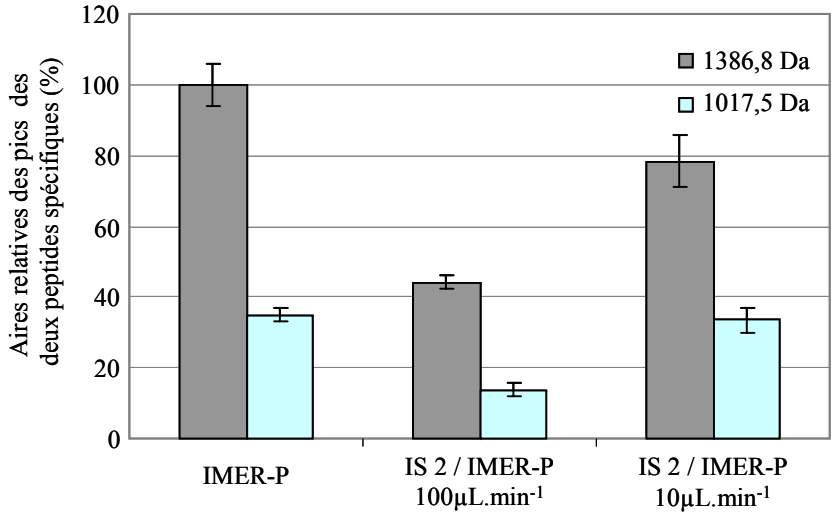


Figure IV-13 : Aires relatives cumulées des pics correspondant aux deux peptides du cytochrome c de masses 1386,8 et 1017,5 Da après digestion en ligne de 5 µg de cytochrome c sur l'IMER-P directement ou après extraction sur l'IS 2. Transfert entre IS 2 et IMER : 150 µL HCOOH à 100 µL.min^{-1} ou 10 µL.min^{-1} (n=3).

Notons tout d'abord les coefficients de variations obtenus inférieurs à 13 % pour les deux peptides spécifiques du cytochrome *c* indiquant la bonne répétabilité de l'analyse. De plus, les résultats obtenus montrent qu'en diminuant le débit de transfert de 100 µL.min^{-1} à 10 µL.min^{-1}, les aires des deux peptides spécifiques du cytochrome *c* augmentent d'un facteur 2. Avec une telle diminution du débit, le temps de digestion a été augmenté d'environ 8 minutes et peut expliquer un tel résultat. Cette amélioration peut être aussi liée à une réduction du volume d'élution en diminuant le débit et donc une plus grande partie de la protéine est digérée sur l'IMER. Toutefois, cette alternative augmente le temps d'analyse et ne permet

toujours pas d'atteindre la même efficacité de digestion de l'IMER de pepsine sans immunoextraction. L'IS 1 sera donc choisi pour le couplage avec l'IMER de pepsine pour la suite de l'étude.

IV.3.3. Analyse en ligne du cytochrome c dans le plasma

Afin de confirmer la sélectivité du système développé en milieu réel, le protocole a été appliqué à l'analyse du cytochrome *c* dans un échantillon complexe tel que le plasma.

Un échantillon de plasma a tout d'abord été dilué dans du tampon Tris (1/5, v/v). Après centrifugation, le surnageant est filtré avant d'être dopé par 50 $ng.\mu L^{-1}$ de cytochrome *c*. Une fraction de cet échantillon (20 µL) contenant 1 µg (85 pmol) de cytochrome *c* a ensuite été percolée sur l'IS 1 puis analysée par LC-MS/MS après digestion enzymatique sur l'IMER de pepsine selon le protocole décrit sur le tableau IV-3. Cette analyse a été répétée trois fois. Tout d'abord, aucune protéine interférente, en particulier les protéines abondantes du plasma comme l'albumine, n'a été détectée par le logiciel MASCOT ce qui confirme la grande sélectivité de l'immunoextraction dans une matrice réelle. Le cytochrome *c* a été reconnu avec un recouvrement de séquence de 30 %. L'analyse de cet échantillon a également été comparée à celle obtenue pour un échantillon pur dopé par la même quantité de cytochrome *c* (85 pmol). La figure IV-14 montre les chromatogrammes des extractions d'ions des deux peptides spécifiques du cytochrome *c* de masses 1386,8 Da à 7,5 min et 1017,5 Da à 9,6 min obtenus dans l'échantillon pur (figure IV-14 a) et dans l'échantillon de plasma (figure IV-14 b).

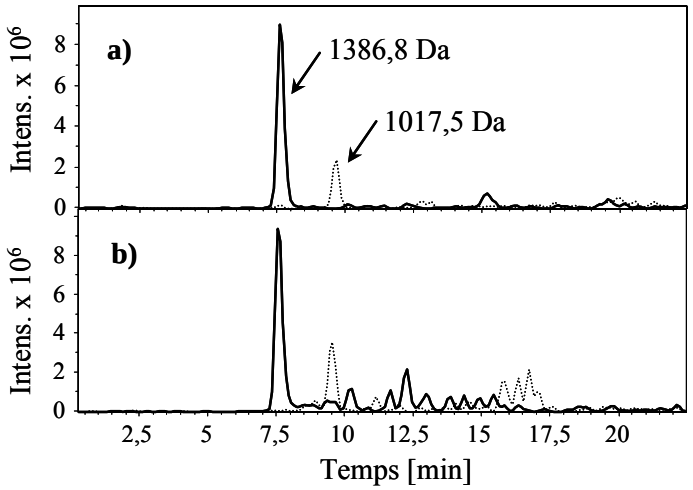


Figure IV-14 : Chromatogrammes d'extraction d'ions des deux peptides spécifiques du cytochrome c de masses 1386,8 et 1017,5 Da après l'analyse totale de 85 pmol de cytochrome c (1 µg) dopé dans un échantillon pur (a) et dans un échantillon de plasma dilué (1/5) (b) par couplage IS 1- IMER de pepsine- LC-MS/MS.

Comme le montre la figue IV-12, les deux chromatogrammes sont très similaires, ce qui confirme le gain en sélectivité de la méthode. Seuls quelques interférents retenus non spécifiquement sur l'immunoadsorbant sont présents sur le chromatogramme. Afin de vérifier si ces interférents gênent la quantification, les aires de ces deux peptides spécifiques ont été comparées et sont reportées sur la figure IV-15.

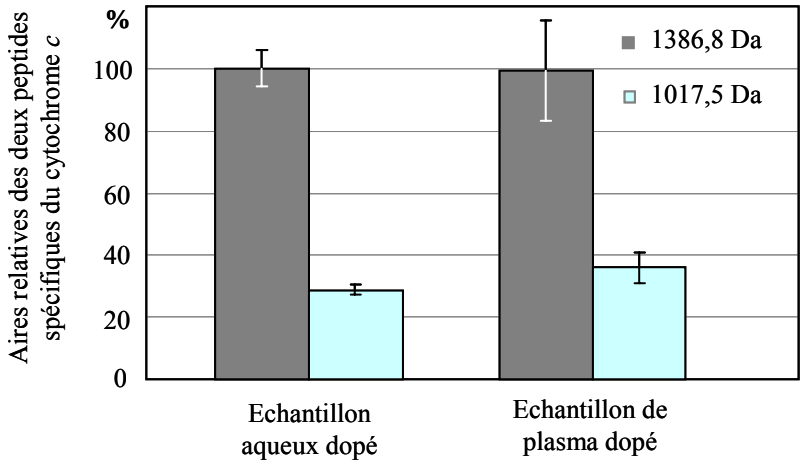


Figure IV-15 : Aires relatives des deux peptides spécifiques du cytochrome c de masses 1386,8 et 1017,5 Da pour l'analyse totale par IS 1/ IMER-P / LC-MS/MS d'un échantillon pur et d'un échantillon de plasma dopé par la même quantité de cytochrome c (85 pmol, 1 µg) (n=3).

Comme le montre la figure IV-15, les aires des pics des deux peptides spécifiques obtenues pour l'analyse du plasma sont très similaires à celles obtenues pour l'analyse d'un échantillon pur. En effet, les réponses pour le peptide spécifique de masse 1017,5 Da ne diffèrent que de 10 % tandis que pour le peptide le plus abondant de masse 1386,8 Da, les aires ne diffèrent que de 1 %. Aucun effet de matrice n'est donc observé sur ces deux peptides. Une bonne répétabilité a été obtenue pour le peptide le plus abondant (1386,8 Da) avec un coefficient de variation inférieur à 17 %. Ainsi, l'analyse quantitative de 85 pmol de cytochrome *c* peut facilement être réalisée dans un fluide biologique complexe tel que le plasma. De plus, le rapport S/N observé pour cette quantité de cytochrome *c* (85 pmol, 1 µg) est estimé à 60 pour le peptide de masse 1386,8 Da. En choisissant un rapport S/N égal à 10 comme limite de quantification (LDQ), la quantité minimale quantifiable de cytochrome *c* est de 14 pmol (0,16 µg) et la limite de détection (LDD) estimée à S/N = 3 est de 4,3 pmol (50 ng). Le plasma ayant été dilué 5 fois, la LDD est de 22 pmol en équivalent dans le plasma.

IV.4. Conclusion

L'analyse d'une protéine ciblée dans un échantillon complexe tel que le plasma nécessite une étape de traitement d'échantillon sélective. Dans cette étude, un immunoadsorbant anti-cytochrome *c* a été développé et la sélectivité a été démontrée par l'élimination de deux autres protéines au cours de l'étape d'immunoextraction. La capacité de l'immunoadsorbant a été mesurée expérimentalement et a permis de déduire qu'un taux de greffage satisfaisant avait été obtenu. De plus, les capacités obtenues permettent d'envisager la miniaturisation de l'immunoadsorbant pour l'analyse de protéines minoritaires.

Afin de mettre au point une méthode totalement automatisable, l'immunoadsorbant a été couplé au réacteur enzymatique puis à l'analyse par LC-MS. L'élution de la protéine de l'immunoadsorbant étant réalisée à pH acide, le couplage avec une enzyme active à pH acide, la pepsine, a été proposé. Ainsi, après optimisation du couplage, la méthode mise au point a montré de très bons résultats en termes de répétabilité et de rendement. En effet, un rendement de 65 % en moyenne a été obtenu par rapport à la digestion en solution contre les 4 % précédemment cités obtenus pour un IS anti BSA couplé à un réacteur de trypsine [1]. L'application à un échantillon complexe, le plasma, a montré la très grande sélectivité de l'immunoadsorbant puisqu'aucun effet matrice n'était observé malgré l'extrême complexité de l'échantillon analysé.

La sensibilité de l'analyse en échantillon réel est de 22 pmol (260 ng), ce qui correspond à une concentration de 13 $\mu g.mL^{-1}$. Afin d'améliorer la sensibilité, il est possible de s'équiper de spectromètres de masse plus performants actuellement disponibles, mais également de miniaturiser le système analytique. En effet, outre le gain en sensibilité, la miniaturisation permet de réduire la consommation de réactifs et le volume d'échantillon utilisé.

Finalement, les résultats encourageants obtenus ainsi que les grandes capacités des réacteurs développés ont permis d'envisager la miniaturisation de la totalité du système analytique

IV.5. Références

[1] J.S. Hoos, H. Sudergat, J.-P. Hoelck, M. Stahl, J.S.B. de Vlieger, W.M.A. Niessen, H. Lingeman, H. Irth, *J. Chromatogr., B* 830 (2006) 262.
[2] C. Maisonnette, P. Simon, M.-C. Hennion, V. Pichon, *J. Chromatogr., A* 1120 (2006) 185.
[3] M. Bouzige, V. Pichon, M.C. Hennion, *J. Chromatogr., A* 823 (1998) 197.
[4] N. Delaunay-Bertoncini, Université de Paris VI. *Développement d'immunoadsorbants à base d'anticorps monoclonaux pour l'extraction sélective de familles de micropolluants organiques contenus dans des matrices complexes. Comparaison avec des polymères à empreintes moléculaires*, novembre 2001.
[5] F. Chapuis, Université Paris VI. *Immunoadsorbants et polymères à empreintes moléculaires pour l'extraction sélective de composés de matrices environnementales et biologiques : synthèse et caractérisation en vue de leur intégration au système total d'analyse*, novembre 2004.
[6] M.-C. Hennion, V. Pichon, *J. Chromatogr., A* 1000 (2003) 29.

CHAPITRE V : MINIATURISATION DE L'ANALYSE EN LIGNE D'UNE PROTEINE CIBLEE

Un gain en sensibilité est indispensable pour l'analyse des molécules présentes en très faible concentration dans les matrices. Dans ce contexte, les systèmes miniaturisés intégrant toutes les étapes de l'analyse sont actuellement en plein essor. En effet, la miniaturisation du système analytique permet de réduire les quantités de solvant utilisées, le volume d'échantillon souvent difficilement disponible en grande quantité (plasma, liquide cérébrospinal...). De plus, en ce qui concerne les outils bioanalytiques comme les ISs et les IMERs, les quantités d'anticorps ou d'enzymes utilisés pour leur synthèse sont grandement réduites ce qui en diminue fortement le coût. Enfin, si les étapes de traitement d'échantillon sont miniaturisées, le gain en sensibilité n'est réel qu'à condition d'y coupler une analyse chromatographique elle-même miniaturisée en format capillaire ou nano.

V.1. Miniaturisation du système chromatographique

De façon générale, la miniaturisation du système d'analyse consiste à réduire le diamètre interne des colonnes chromatographiques. Le terme de micro-chromatographie (µ-LC) sera utilisé pour des diamètres internes de colonne de l'ordre de 1 mm, chromatographie capillaire (cap-LC) pour des diamètres de colonne de 300 µm et nanochromatographie (nano-LC) pour des diamètres de colonne de l'ordre de 100 µm. Ces différents formats induisent une ré-optimisation de tout le système analytique pour l'obtention d'un gain réel en sensibilité avec notamment la modification des débits de phase mobile. Ainsi, des débits d'environ 50 $\mu L.min^{-1}$ doivent être utilisés en µ-LC, de 4 $\mu L.min^{-1}$ en cap-LC et de 200 $nL.min^{-1}$ en nano-LC. La détection doit également être adaptée. En particulier, dans le cas d'une détection UV, le volume de la cellule doit être réduit tout en conservant un trajet optique suffisamment long pour une bonne sensibilité. Dans le cas d'une détection par spectrométrie de masse, outre une ré-optimisation des paramètres d'ionisation, des débits inférieurs à 5 $\mu L.min^{-1}$ induisent l'utilisation d'une source d'ionisation nanospray.

En vue de la miniaturisation du système total d'analyse d'une protéine ciblée et compte tenu des difficultés analytiques, une digestion en ligne en format µ-LC a tout d'abord

été mise au point pour ensuite la transférer en format cap-LC. Dans l'optique d'un couplage à terme avec l'immunoadsorbant, un IMER de pepsine a été utilisé. Une fois la digestion en ligne mise au point, l'immunoadsorbant sera couplé à l'analyse en format cap-LC.

V.1.1. Digestion en ligne et analyse par microchromatographie

V.1.1.1. Montage expérimental

Une colonne analytique de 1 mm de diamètre interne a été utilisée pour la séparation des peptides. Cette colonne Acclaim® PepMap^{TM} (Dionex) est, comme précédemment, une phase de silice greffée C_{18}. Elle est dédiée à la séparation des peptides puisqu'elle présente très peu de groupements silanols libres. La colonne de piégeage a été adaptée aux dimensions de la colonne analytique, avec un diamètre interne également de 1 mm. Comme en format conventionnel, la phase stationnaire est un co-polymère de PLRP-S résistant aux conditions acides du tampon de digestion.

Compte tenu des faibles débits requis, une autre chaîne analytique couplée à une détection UV a été utilisée, combinant à la fois une pompe de préconcentration pouvant atteindre des débits de 1 $\mu L.min^{-1}$ et une pompe analytique pouvant fonctionner en mode µ-LC mais aussi en mode cap-LC et en nano-LC. La chaîne utilisée pour l'analyse en µ-LC est la chaîne Ultimate 3000 (Dionex) et est décrite en annexe 9. Le système n'étant pas couplé à un spectromètre de masse, il a été choisi de faire dans un premier temps les développements analytiques par détection UV. Le volume de la cellule de détection UV pour des débits de l'ordre de 50 $\mu L.min^{-1}$ en µ-LC est de 180 nL.

Un nouvel IMER de pepsine de plus faible volume mort a également été préparé dans une précolonne de diamètre de 1 mm afin de minimiser les volumes de transfert sur la colonne de piégeage. Les dimensions de l'IMER sont alors de 20 x 1 mm d.i., et le volume mort de l'IMER est de 11 µL contre 44 µL précédemment avec le colonne de 20 x 2 mm d.i.. Afin de s'assurer d'une digestion optimale de la protéine, la densité de greffage de la pepsine a été augmentée d'un facteur 4 par rapport à précédemment pour que la même quantité de pepsine soit immobilisées sur l'IMER de 1 mm de d.i. par rapport à celui de 2 mm d.i.. En effet, le volume de la précolonne étant 4 fois inférieur, 4 mg de pepsine au lieu de 1 mg ont été introduits dans la solution de couplage en présence de 25 mg de Sépharose activée CNBr d'après le protocole précisément décrit en annexe 7.

L'IMER de pepsine ainsi préparé a été couplé à la précolonne de piégeage, elle-même couplée à la colonne analytique *via* une vanne de commutation 10 voies. Ainsi, le montage mis au point permet de thermostater à la fois l'IMER, la colonne de piégeage et la colonne analytique à 37 °C. Les injections d'échantillon sont assurées par une boucle de 1 µL connectée à une vanne de commutation six voies. Le montage résultant est décrit sur la figure V-1.

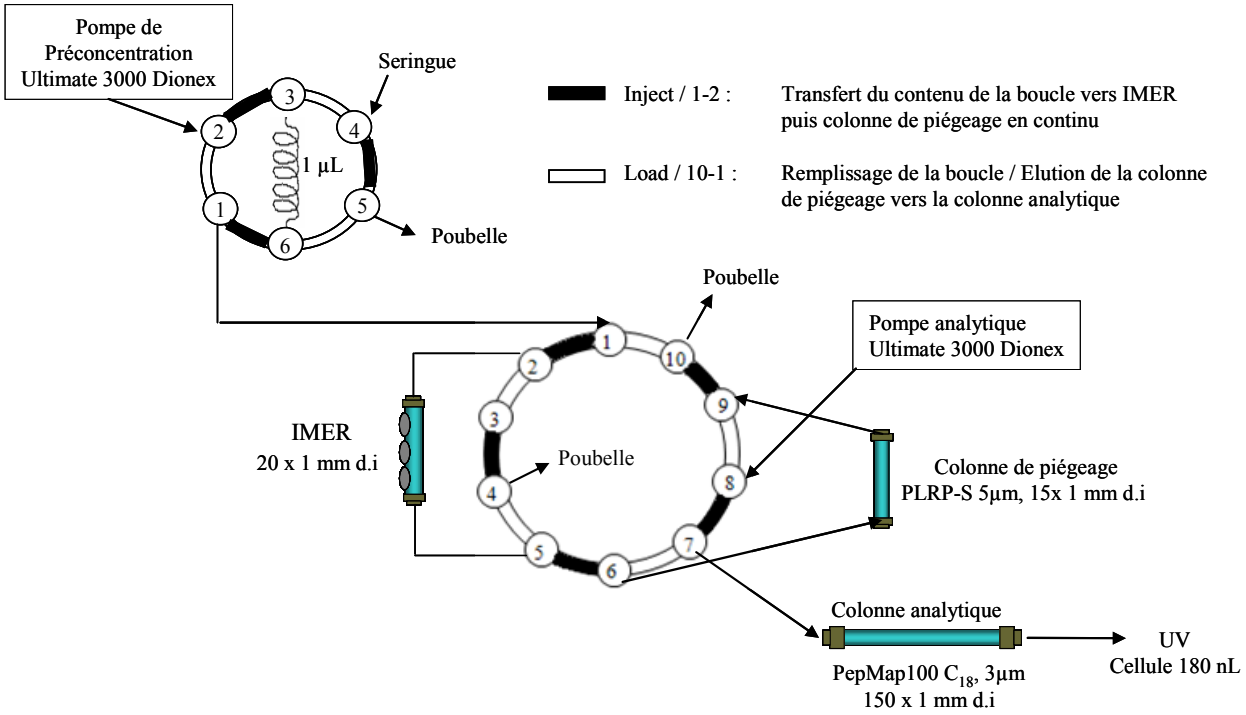


Figure V-1 : Représentation du couplage entre l'IMER et l'analyse par µ-LC.

V.1.1.2. Analyse des peptides après digestion en ligne du cytochrome *c*

(i) Séparation des peptides

Dans un premier temps, il a été nécessaire de vérifier que la détection UV des peptides permettait d'évaluer le système mis au point. Pour cela, 1 µL d'une solution contenant 85 pmol (1 µg) de cytochrome *c* digéré par la pepsine en solution ont été directement injectés sur la colonne analytique et détectés par UV à 280 nm et à 400 nm. En effet, même si la détection UV des peptides est généralement effectuée entre 200 et 220 nm, la majorité des peptides issus de la digestion du cytochrome *c* par la pepsine obtenus en format conventionnel contiennent des acides aminés Tyrosine et Tryptophane détectables à 280 nm. Le choix de 280 nm comme longueur d'onde apporte de ce fait une sélectivité supplémentaire à la détection des peptides, avantageuse lorsqu'une détection UV est seule réalisée. De plus,

comparée à la trypsine, la digestion du cytochrome *c* par la pepsine présente l'avantage de générer moins de peptides et de rendre l'analyse UV plus facile à exploiter.

La phase mobile est la même qu'en format conventionnel c'est-à-dire un mélange H_2O / MeCN acidifié à 0,1 % d'acide formique. Ainsi, afin de séparer au mieux les peptides, un gradient peu éluant contenant des teneurs en acétonitrile comprises entre 5 et 15 % d'acétonitrile a été réalisé les 25 premières minutes, puis 90 % d'acétonitrile a été appliqué pendant 10 minutes pour éluer le cytochrome *c* non digéré observé à 400 nm et éventuellement les peptides les plus hydrophobes. Le chromatogramme obtenu à 280 nm après l'analyse par µLC-UV d'1 µg (85 pmol) de cytochrome *c* digéré en solution par la trypsine est présenté sur la figure V-2.

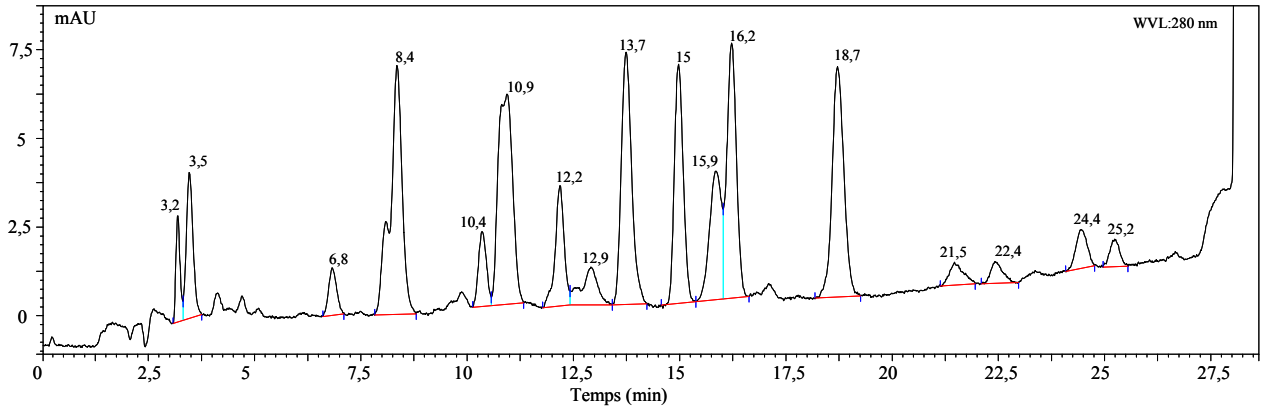


Figure V-2 : Chromatogramme obtenu après analyse par µLC-UV d'une solution d'1 µg (85 pmol) de cytochrome c digérée en solution par la pepsine 280 nm.

La figure V-2 montre plusieurs pics à 280 nm qui correspondent potentiellement à des peptides du cytochrome *c*. A 28 minutes, un plus grand pic est observé et, par comparaison avec le chromatogramme obtenu à 400 nm, il est attribué à une partie du cytochrome *c* qui est non digéré. A ce stade, il est difficile d'estimer le rendement de digestion. En effet, compte tenu des nombreux peptides, le pic du cytochrome *c* à 28 minutes est probablement co-élué avec d'autres peptides qui absorbent à 280 nm.

(ii) Digestion en ligne du cytochrome c

L'IMER de pepsine a ensuite été connecté à la vanne de commutation contenant la précolonne de piégeage, elle-même couplée à l'analyse par cap-LC-UV. Contrairement à l'étude développée en format conventionnel, la pompe de préconcentration dorénavant utilisée permet d'appliquer un débit de 1 µL.min^{-1}. Ainsi, en réalisant une digestion en flux continu à

ce débit, il n'est plus nécessaire d'optimiser le transfert pour atteindre exactement l'IMER, comme c'était le cas pour la digestion en « stop-flow ». De plus, avec un débit de 1 µL.min^{-1}, un temps de digestion de 16 minutes proche de celui utilisé précédemment (20 minutes) est alors assuré entre la solution protéique et les enzymes immobilisées. Ce temps de digestion sera optimisé dans la suite de l'étude.

Une solution de 1 µL de tampon Tris (pH 8) contenant 1 µg (85 pmol) de cytochrome *c* est transférée par 30 µL d'acide formique (pH 2) à 1 µL.min^{-1} en continu sur l'IMER de pepsine. Ce volume de transfert a été choisi en tenant compte du volume de la boucle (1 µL), de volume mort de l'IMER (11 µL), du volume de la précolonne de piégeage (8 µL) et du volume des connectiques (8 µL). Il sera vérifié par la suite. Ainsi, le cytochrome *c* est digéré sur l'IMER de pepsine et les peptides générés sont transférés sur la colonne de piégeage en continu. Puis, les peptides sont élués de la colonne de piégeage et séparés sur la colonne analytique par le gradient de phase mobile mis au point précédemment. Le chromatogramme résultant est présenté sur la figure V-3.

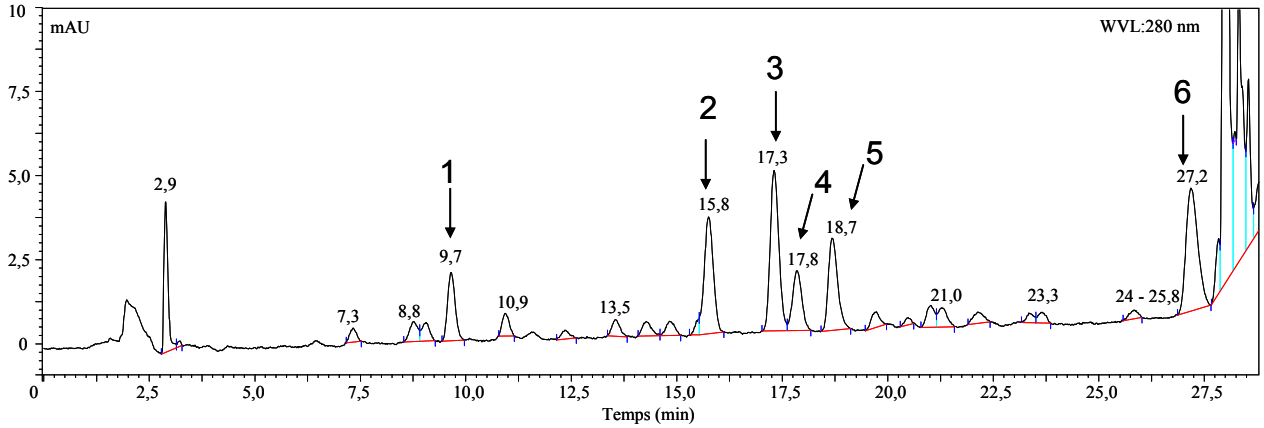


Figure V-3 : Chromatogramme à 280 nm obtenu après digestion en ligne d'1 µg (85 pmol) de cytochrome c (1 µL) transféré sur l'IMER de pepsine par 30 µL d'acide formique à 1 µL.min^{-1} puis analyse par µ-LC-UV.

De nouveau, de nombreux pics sont observés à 280 nm et un plus grand pic est observé à 28 min, attribués aux peptides du cytochrome *c* et à la protéine non digérée respectivement, comme pour la digestion en solution.

Le profil est analogue à celui obtenu après digestion en solution. En effet, les peptides les plus intenses sont situés dans la même gamme de temps de rétention qu'en solution. Toutefois, les pics sont moins nombreux et d'une façon générale, moins intenses qu'après digestion en solution, indiquant que la digestion est moins efficace sur l'IMER de pepsine que pour la digestion en solution. Notamment, dans le cas de la digestion en solution, des pics

supplémentaires sont présents à des temps de rétention plus courts correspondant à des peptides plus polaires et probablement plus petits comparés à ceux présentant une ou plusieurs ruptures manquées.

En conclusion, comme pour la digestion sur l'IMER de pepsine en format conventionnel (chapitre III), la digestion semble un peu moins efficace sur l'IMER par rapport à la digestion en solution.

Afin de vérifier que les pics observés correspondent bien à des peptides du cytochrome *c*, des quantités croissantes de cytochrome *c* de 0,5 ; 0,75 et 1 µg (43, 64 et 85 pmol) ont été digérées en ligne sur l'IMER de pepsine. L'étude a été réalisée sur les pics les plus intenses du chromatogramme notés de 1 à 6 sur la figure V-3. Les analyses ont été répétées 3 fois. L'aire du pic n°5 présentant une mauvaise répétabilité avec des coefficients de variations entre 25 et 47 % dans la gamme de concentration choisi, ce pic n'a pas été étudié. La mesure des aires des autres pics est associée à des coefficients de variation de 11 % en moyenne. De plus, il existe bien une relation linéaire entre les aires de ces pics et la concentration de cytochrome *c* digérée et les meilleurs coefficients de régression (supérieurs à 0,999) ont été obtenus pour les pics n°1, 2 et 3. La figure V-4 montre les aires obtenues pour ces 3 pics en fonction de la quantité de cytochrome *c* digérée.

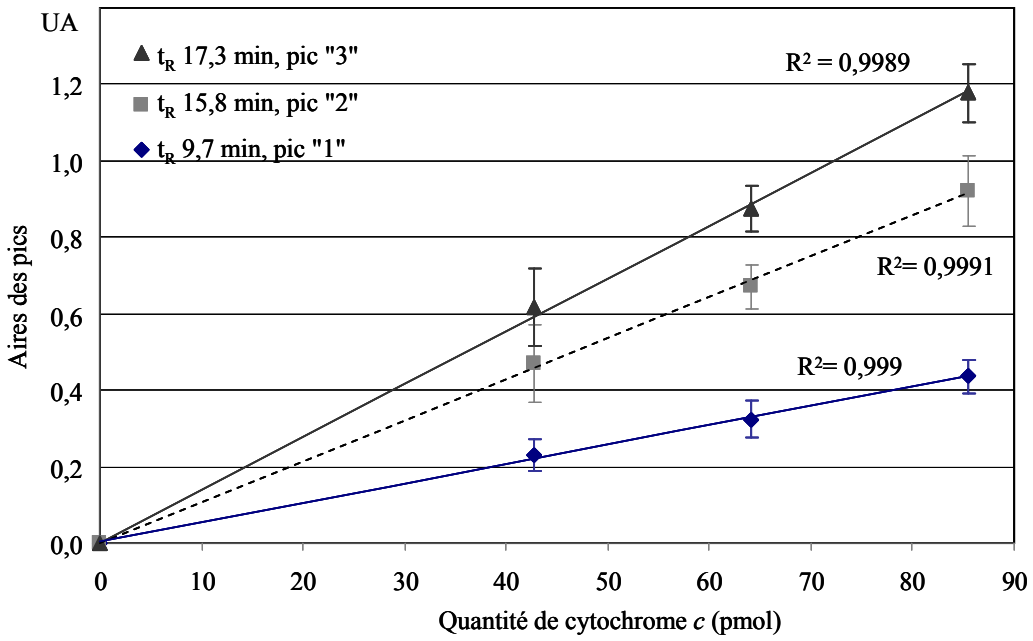


Figure V-4 : Aires des pics observés à 280 nm après digestion en ligne d'1 µL de tampon Tris contenant entre 0,5 et 1,5 µg (43 et 128 pmol) de cytochrome c sur l'IMER de pepsine par 30 µL d'acide formique à 1 µL.min^{-1} puis analyse par µ-LC-UV (n=3). UA : unité arbitraire.

De façon analogue à la démarche suivie pour la détection des peptides du cytochrome *c* par spectrométrie de masse, les peptides correspondant aux pics n°2 et 3 ont été choisis comme peptides spécifiques pour évaluer quantitativement les performances de la méthode. Après la digestion du cytochrome *c* sur l'IMER et analyse par µ-LC, une solution de tampon Tris (pH 8) ne contenant pas de cytochrome *c* a également été analysée selon le même protocole. Le chromatogramme obtenu ne montre aucun pic dans la gamme de temps des peptides spécifiques du cytochrome *c,* indiquant que tous les peptides générés après la digestion de cytochrome *c* sont bien élués de l'IMER. En conclusion, une méthode a été développée pour détecter en UV et quantifier les peptides de digestion du cytochrome *c*. La procédure de digestion en ligne va alors être optimisée.

V.1.1.3. Optimisation du protocole de digestion

La digestion étant effectuée en continue, seuls le volume et le débit de transfert entre la boucle d'injection et la colonne de piégeage ont été optimisés. Compte tenu des volumes morts entre la boucle et la colonne de piégeage, des volumes d'acide formique (pH 2) variant entre 25 et 50 µL ont été percolés à 1 µL.min^{-1} pour la digestion en ligne de 0,75 µg (64 pmol) de cytochrome *c* sur l'IMER de pepsine. La figure V-5 a) présente les aires des deux pics dits de quantification (pic « 2 » et pic « 3 ») en fonction du volume percolé.

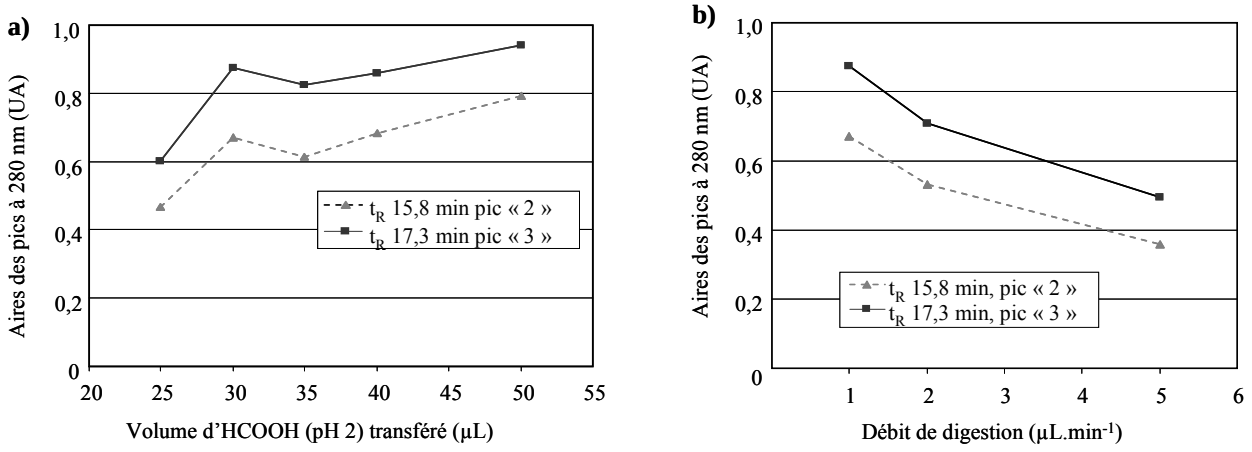


Figure V-5 : Aires des deux pics correspondant à deux peptides du cytochrome c obtenus après digestion en ligne de 0,75 µg de cytochrome c (1 µL) sur l'IMER de pepsine par percolation d'acide formique (pH 2) : en faisant varier (a) les volumes entre 25 et 50 µL à 1 µL.min^{-1} et (b) les débits de 1 à 5 µL.min^{-1} (30 µL). Analyse par µ-LC-UV. UA : unité arbitraire.

La figure V-5 a) montre bien que le volume de 25 µL n'est pas suffisant pour transférer tous les peptides vers la colonne de piégeage. Au-dessus de 30 µL de transfert, les aires des pics semblent constantes compte tenu des coefficients de variation de 11 % obtenus précédemment (figure V-4). Une tendance similaire a également été observée pour le pic correspondant au cytochrome *c* non digéré observé à 400 nm, ce qui confirme que 25 µL ne suffisent pas pour transférer la totalité de l'échantillon à travers le système. Le volume de transfert est donc fixé à 30 µL d'acide formique.

Dans un second temps, le débit de la solution de transfert a été étudié. A cet effet, des débits de 1, 2 puis 5 $\mu L.min^{-1}$ ont été testés. Les vitesses linéaires correspondant à ces débits sont de 1,3 ; 2,6 et 6,4 $mm.min^{-1}$, ce qui induit des temps de résidence de la protéine dans l'IMER de respectivement 16, 8 et 3 minutes au sein de l'IMER. La figure V-5 b) présente les aires des pics des deux peptides spécifiques du cytochrome *c* en fonction du débit appliqué à la solution de digestion. Une augmentation du débit montre clairement une diminution des aires des pics des deux peptides spécifiques du cytochrome *c*. Un temps de digestion minimum entre la protéine et les enzymes immobilisées doit être respecté pour assurer une bonne efficacité de digestion. Des débits inférieurs à 1 $\mu L.min^{-1}$ et donc des temps de digestion supérieurs à 16 minutes n'ont pas été testés de par la limitation de la pompe de préconcentration en termes de débit. De plus, cela aurait impliqué des temps d'analyse relativement long. Ainsi, le temps de digestion utilisé est proche de celui utilisé précédemment pour l'analyse en format conventionnel. En conclusion, un débit de 1 $\mu L.min^{-1}$ avec un volume de transfert de 30 µL a été choisi. Le protocole final est résumé dans le tableau V-1.

étape	solvant utilisé
échantillon	1 µL d'une solution de Tris à pH 8 dopée à 0,75 µg de cytochrome c
digestion en ligne	percolation de 30 µL d'HCOOH (pH 2) vers la précolonne de piégeage (débit = 1 µL.min-1)
séparation analytique	transfert des peptides de la précolonne vers la colonne analytique par la phase mobile.

Tableau V-1 : Protocole de digestion du cytochrome c sur IMER de pepsine et analyse en ligne par µ-LC-UV

V.1.1.4. Sensibilité de la méthode

La sensibilité de la méthode mise au point a été évaluée par la mesure des rapports signal sur bruit (S/N) des deux peptides spécifiques du cytochrome *c*. A partir du

chromatogramme obtenu après digestion en ligne de 0,5 µg (43 pmol) de cytochrome *c* puis analyse par µ-LC-UV, des rapports S/N de 27 et de 37 ont été obtenus pour les peptides n° 2 et 3 respectivement. La limite de détection (LDD) peut être estimée pour un rapport S/N = 3, et par extrapolation, des LDD de 55 ng (4,7 pmol) et de 41 ng (3,5 pmol) ont été obtenus pour les peptides 2 et 3 respectivement à partir de 1 µL d'échantillon injecté.

La méthode de digestion en ligne développée en chromatographie liquide conventionnelle (3 mm d.i.) couplée à l'analyse par spectrométrie de masse avait permis d'atteindre une limite de détection inférieure de 12 ng (1,1 pmol) pour 20 µL injecté. Il est cependant difficile de comparer la méthode développée en µ-LC à celle développée précédemment en format conventionnel puisque la méthode de détection est différente. En effet, il est clair, qu'avec une détection par spectrométrie de masse en sortie de la µ-LC, la sensibilité serait grandement améliorée.

Finalement, la méthode de digestion en ligne a bien été transférée en microchromatographie et les résultats encourageants obtenus nous ont menés à développer l'analyse en chromatographie capillaire afin d'atteindre une meilleure sensibilité et d'y coupler l'immunoadsorbant.

V.1.2. Analyse totale du cytochrome c par immunoaffinité, digestion en ligne et analyse par chromatographie capillaire

Dans un premier temps, la digestion en ligne sur un IMER de pepsine a été couplée seule à l'analyse par chromatographie en phase liquide en format capillaire.

V.1.2.1. Mise au point de la digestion en ligne et analyse par cap-LC

(i) Montage expérimental

La chaîne utilisée pour la chromatographie capillaire est la même que celle pour la µ-LC, l'Ultimate 3000 décrite en annexe 9. Le diviseur de débit et la cellule de détection (45 nL) ont été adaptés pour des débits de l'ordre de 4 $\mu L.min^{-1}$. La chimie de phase de la colonne analytique a été conservée par rapport à la µ-LC (Acclaim® PepMap^{TM}). En revanche, une colonne de plus faible dimension a bien évidemment été choisie à savoir un diamètre interne de 300 µm. Concernant la colonne de piégeage, le choix était limité en termes de matériel. En

effet, pour le piégeage des peptides, la phase hydrophobe disponible avec un diamètre interne de 300 µm est une phase stationnaire de silice greffée alkyle (C_{18}) et non un polymère PLRP-S comme précédemment.

Dans un premier temps, l'IMER de pepsine de dimension 20 x 1 mm d.i. a été conservé pour le couplage avec la chromatographie capillaire, la miniaturisation de l'IMER sera abordée par la suite. Comme précédemment, les injections des échantillons ont assurées par une boucle d'injection de 1 µL. La figure V-6 présente le schéma du couplage entre l'IMER et l'analyse.

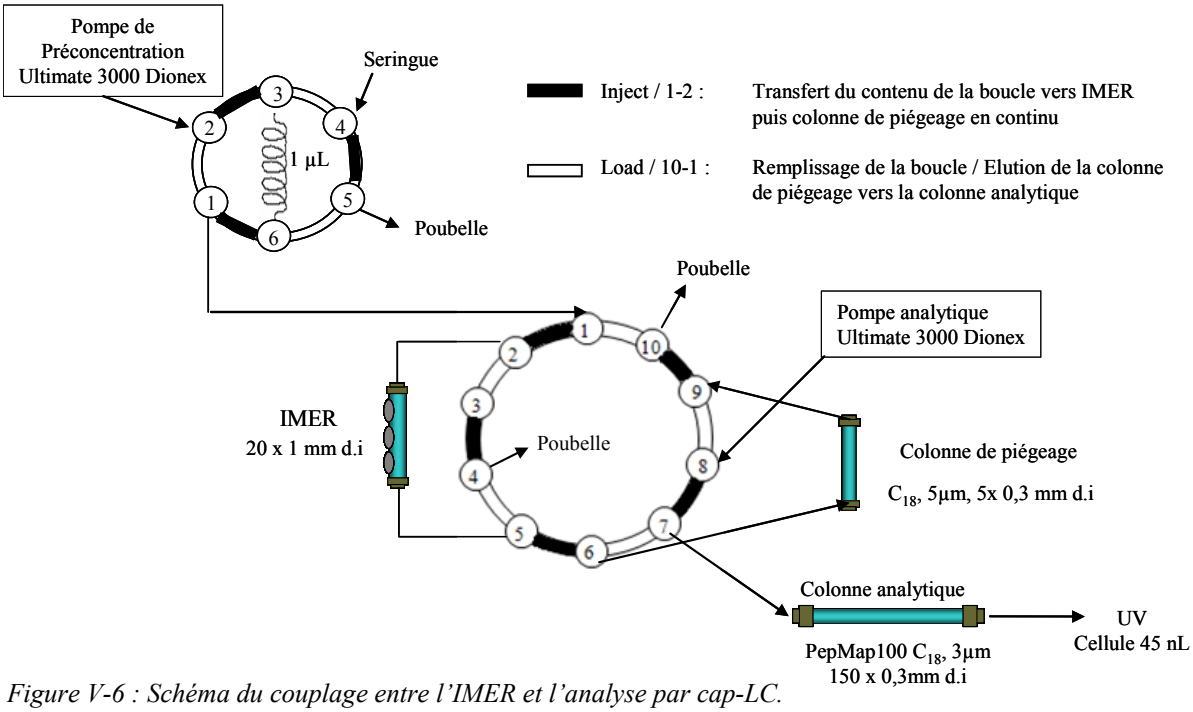


Figure V-6 : Schéma du couplage entre l'IMER et l'analyse par cap-LC.

(ii) Mise au point de la méthode d'analyse

Dans un premier temps, comme pour la µ-LC, la méthode analytique en cap-LC a été mise au point à partir de l'injection de 1 µL de solutions de cytochrome *c* digérées en solution par la pepsine. Comme précédemment, la phase mobile est constituée d'eau et d'acétonitrile acidifiés à 0,1 % d'acide formique. Un gradient plus lent par rapport à la µ-LC entre 5 et 15 % d'acétonitrile en 30 minutes a été mis au point, puis 90 % d'acétonitrile est appliqué pendant 10 minutes pour éluer la protéine non digérée et éventuellement les peptides les plus hydrophobes. La détection est effectuée en UV à 280 nm pour la détection des peptides et à 400 nm pour la détection du cytochrome *c* non digéré.

Dans l'objectif du couplage avec l'IMER, la méthode de digestion développée en µ-LC n'a pas pu être directement appliquée au nouveau montage en raison de la nature de la

phase de la précolonne. En effet, la précolonne de piégeage étant une phase stationnaire de C_{18}, elle ne peut supporter des solutions trop acides comme celle utilisée précédemment composée d'acide formique à pH 2. En effet, la gamme de pH tolérée par la silice est restreinte de 2 à 8. Pour cette raison, la solution de digestion d'acide formique a été légèrement modifiée en fixant son pH à 2,5.

De plus, la silice C_{18} est moins rétentive en termes d'hydrophobie que le polymère PLRP-S. Le volume mort de cette précolonne est également grandement diminué : de 8,2 µL à 0,25 µL pour une même dimension d'IMER en amont. Il était donc primordial d'évaluer la rétention de cette colonne de piégeage. A cet effet, des digestions en solution de cytochrome *c* ont été réalisées par la pepsine. Ainsi, 0,25 µg de cytochrome *c* (1 µL) digérés en solution ont été injectés sur la colonne de piégeage en les transférant par différents volumes d'acide formique compris entre 10 et 150 µL. Cette large gamme de volume a été percolée afin de vérifier les performances de la colonne de piégeage en termes de rétention. Cette étude a aussi permis d'évaluer le volume minimum nécessaire pour le transfert entre la boucle et la colonne de piégeage.

Dans un premier temps, le chromatogramme d'un digestat à la pepsine de 0,25 µg de cytochrome *c* obtenu à 280 nm avec un volume de transfert sur la colonne de piégeage de 30 µL d'acide formique (pH 2,5) est présenté sur la figure V-7.

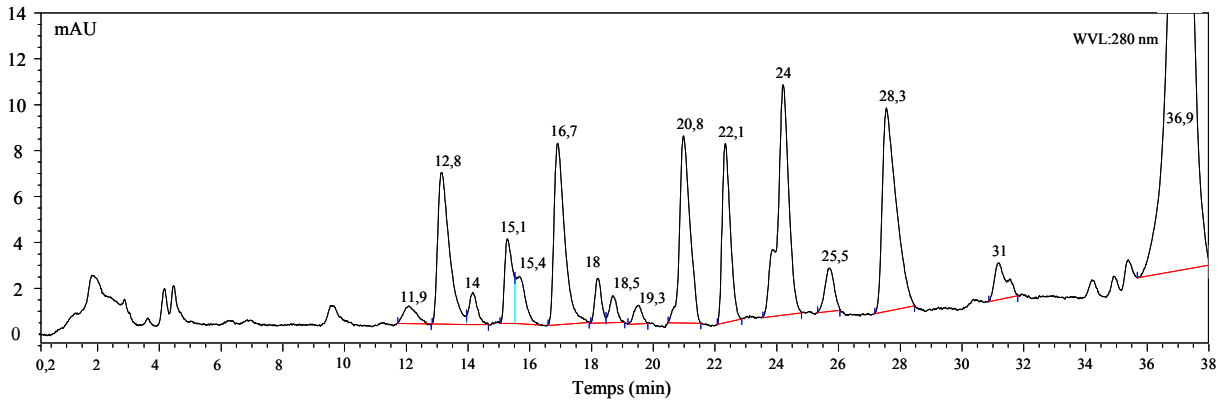


Figure V-7 : Chromatogramme obtenu à 280 nm après analyse par cap-LC-UV d'1 µL d'une solution contenant 0,25 µg (21 pmol) de cytochrome c digérée en solution par la pepsine.

Le chromatogramme obtenu montre, comme précédemment, de nombreux pics à 280 nm et un plus grand pic qui, par comparaison au chromatogramme obtenu à 400 nm, correspond au cytochrome *c* non digéré et éventuellement à d'autre peptides plus hydrophobes co-élués. Toutefois, le chromatogramme obtenu après analyse par cap-LC est différent de celui obtenu en format micro-LC. En effet, entre les deux analyses, le gradient de

phase mobile a été modifié. Pour cette raison, les pics spécifiques préalablement déterminés ne peuvent plus être utilisés. Deux nouveaux pics ont donc été choisis comme précédemment de façon arbitraire sur le chromatogramme en tant que peptides spécifiques du cytochrome *c* pour évaluer les performances de l'analyse. Ce sont les pics aux temps de rétention 20,8 et 28,3 minutes ; ils correspondent à deux pics intenses du chromatogramme. Les aires de ces deux pics sont reportées en fonction du volume de la solution de transfert percolé sur la figure V-8.

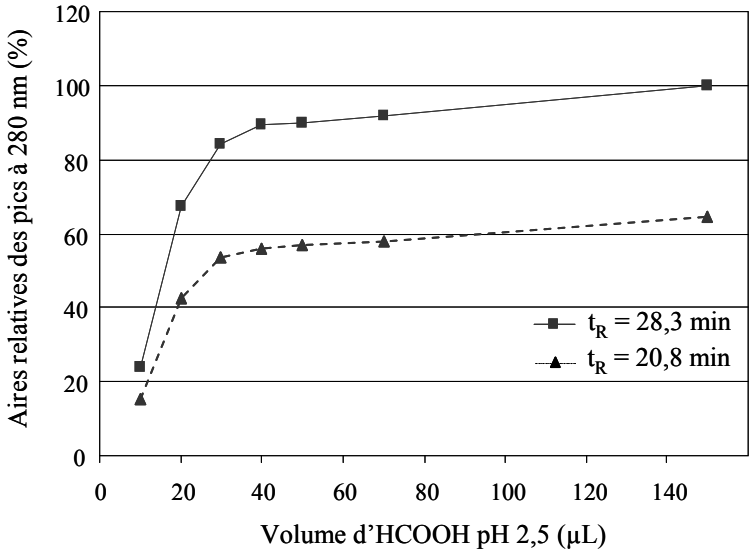


Figure V-8 : Aires de deux peptides spécifiques du cytochrome c obtenues après digestion en solution de 0,25 µg de cytochrome c (1 µL), en fonction du volume d'acide formique percolé. L'analyse est effectuée par cap-LC et détection UV à 280 nm.

Pour les deux pics spécifiques choisis, la figure IV-8 montre une augmentation des aires entre 10 et 40 µL percolé, indiquant qu'avec le montage mis au point, 40 µL de solution sont nécessaires pour transférer le digestat de la boucle de 1 µL à la colonne de piégeage. Ce volume est différent de celui obtenu en microchromatographie car le montage a été modifié et des volumes morts ont été ajoutés avec les connectiques. En effet, la perte de charge générée par la précolonne capillaire étant supérieure à celle générée par la précolonne micro, les diamètres des connectiques en amont de la colonne de piégeage ont été augmentés afin de préserver le support de Sépharose de l'IMER peu résistant mécaniquement. Ceci a provoqué une augmentation des volumes morts.

Entre 40 et 150 µL, on observe des aires constantes démontrant la très bonne rétention des composés concernés sur la colonne de piégeage. De plus, par superposition des différents chromatogrammes obtenus entre 40 et 150 µL d'acide formique transféré sur la colonne de

piégeage, tous les pics, même les plus polaires, sont retrouvés avec la même intensité ce qui assure un volume de fin de fixation suffisant.

En conclusion, cette étude a permis de montrer la bonne rétention de la colonne de piégeage et permet d'envisager le couplage avec l'IMER de pepsine.

V.1.2.2. Digestion en ligne sur l'IMER de pepsine

L'IMER de pepsine étant le même que précédemment, celui-ci a directement été couplé à l'analyse par LC capillaire. Il convient tout de même de vérifier que le transfert entre la boucle et la colonne de piégeage est optimal et que le pH de 2,5 n'altère pas la digestion enzymatique. Le chromatogramme obtenu après un premier essai de digestion en ligne de 150 ng de cytochrome *c* (13 pmol) est présenté sur la figure V-9.

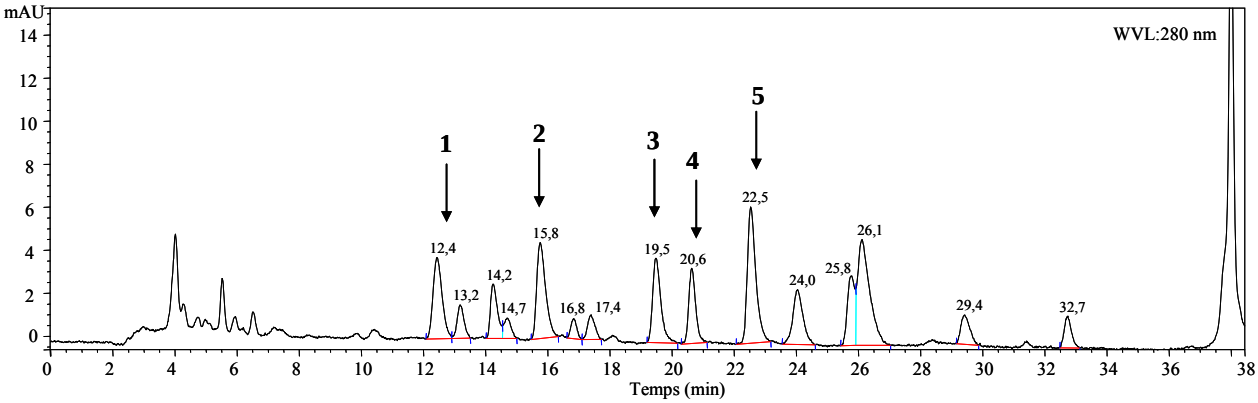


Figure V-9 : Chromatogramme obtenu à 280 nm après la digestion en ligne de 150 ng (13 pmol) de cytochrome c (1 µL) sur l'IMER de pepsine à 1 µL.min^{-1} d'acide formique (pH 2,5) puis analyse par cap-LC-UV.

Le profil chromatographique obtenu après digestion en ligne sur l'IMER de pepsine est très similaire à celui obtenu près digestion en solution. De nombreux pics sont observés à 280 nm et un pic plus intense, correspondant au cytochrome *c* non digéré, est observé à 37 min. En particulier, les pics notés de 1 à 5 sur le chromatogramme sont retrouvés sur celui obtenu après digestion en solution. La bonne résolution obtenue avec la séparation mise au point a permis de comparer quantitativement les deux modes de digestion. Les aires obtenues pour ces 5 pics ont donc été comparées et, pour la digestion en ligne sur l'IMER de pepsine, elles correspondent à 55 % jusqu'à 78 % des aires obtenues après digestion en solution de la même quantité de cytochrome *c*. Ces valeurs sont analogues à celles obtenues précédemment

en format conventionnel par comparaison des aires obtenues en MS de deux peptides spécifique.

Comme pour l'analyse par µ-LC, deux peptides spécifiques du cytochrome *c* ont été choisis. Pour cela, des quantités croissantes entre 75 ng et 500 ng de cytochrome *c* (entre 6,4 et 64 pmol) ont été transférées sur l'IMER de pepsine par de l'acide formique (pH 2,5) à 1 $\mu L.min^{-1}$. Comme précédemment, les aires des pics les plus intenses notés de 1 à 5 sur la figure V-9 ont été reportées en fonction de la quantité de cytochrome *c* et sont présentées sur la figure V-10.

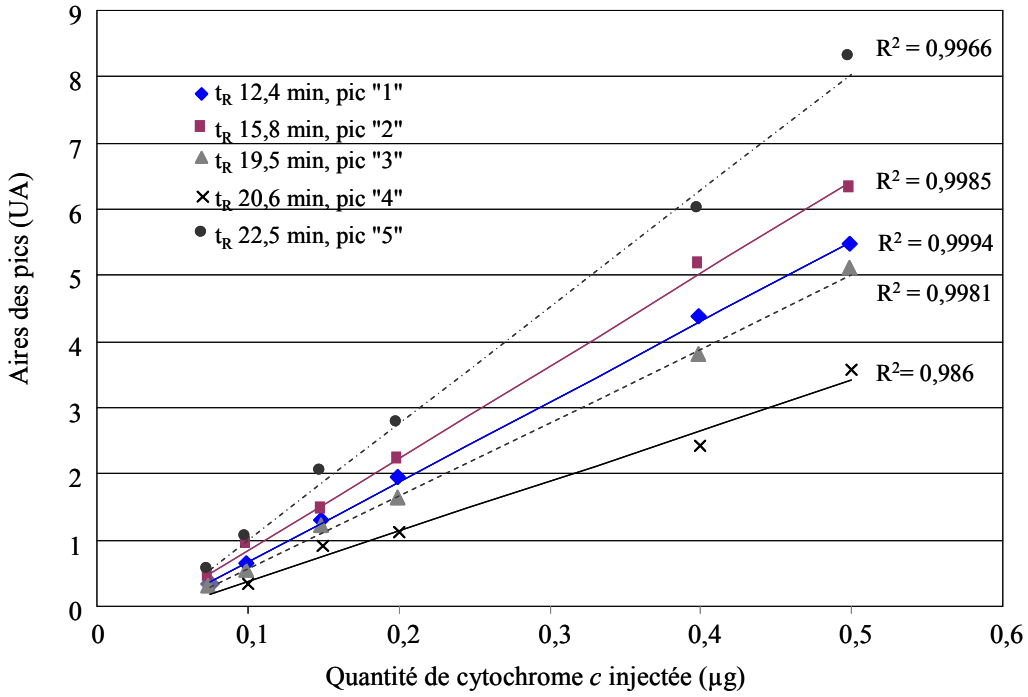


Figure V-10 : Aires des pics observés à 280 nm après digestion en ligne de cytochrome c entre 75 et 500 ng (entre 6,4 et 43 pmol) sur l'IMER de pepsine par de l'acide formique (pH 2,5) à 1 $\mu L.min^{-1}$ et analyse par cap-LC-UV. UA : unité arbitraire.

La figure V-10 montre que des relations relativement linéaires ont été obtenues pour les 5 peptides avec des coefficients de régression entre 0,986 et 0,999 indiquant qu'il s'agit bien de peptides spécifiques du cytochrome *c*. Les deux peptides choisis sont les peptides n°1 et n°5 élués aux temps de rétention de 12,4 et 22,5 minutes respectivement. Le pic n°5 est le plus intense et le n°1 est celui pour lequel la meilleure linéarité a été obtenue (R^2 = 0,9994). Les deux peptides spécifiques choisis vont donc être utilisés pour optimiser la digestion en ligne.

En effet, le montage expérimental ayant été modifié pour l'analyse par cap-LC, il est nécessaire de ré-optimiser le volume de transfert entre la boucle et la précolonne de piégeage.

Pour cela, 100 ng de cytochrome *c* ont été transférés par 30 à 60 µL d'acide formique pH 2,5 à 1 µL.min^{-1} sur l'IMER de pepsine et les aires des deux peptides spécifiques choisis sont reportées sur la figure V-11 a).

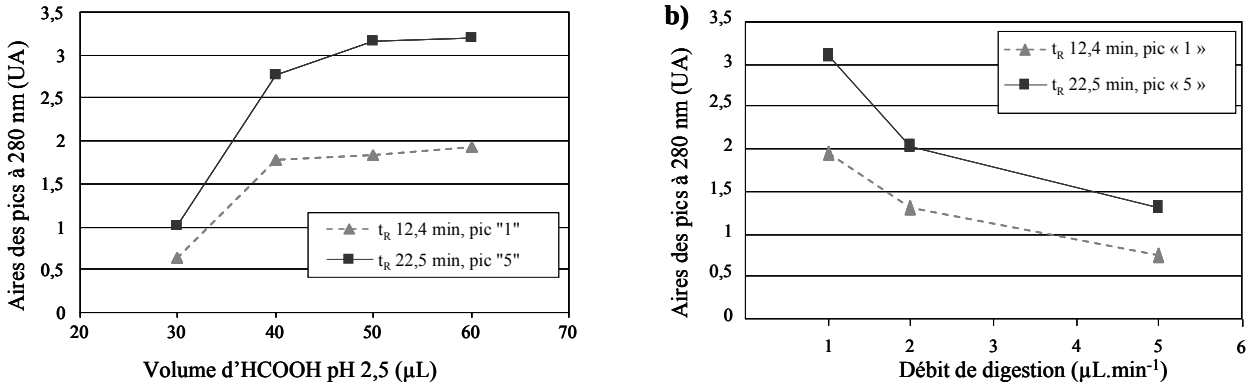


Figure V-11 : Aires des deux peptides spécifiques du cytochrome c obtenues après digestion en solution de 0,1 µg de cytochrome c, en fonction du volume d'acide formique transféré (a) et du débit de digestion (b). L'analyse est effectuée par chromatographie capillaire et détection UV à 280 nm.

La figure V-11 a) montre qu'un volume de 50 µL permet un transfert optimal des peptides vers la colonne de piégeage. Les tests de transfert sur la colonne de piégeage avec des digestats réalisés en solution avaient montré un volume optimal de 40 µL. La différence correspond au volume mort induit par l'IMER (11 µL). Les droites de calibration ont été précédemment établies avec un volume de transfert de 30 µL. Même si ce volume n'est pas optimal, la linéarité de la réponse obtenue est toujours valable.

Comme précédemment, l'effet du débit et donc du temps de digestion a été évalué sur les deux peptides spécifiques du cytochrome *c* en faisant varier le débit de 1 à 5 µL.min^{-1} correspondant à des temps de digestion entre 16 et 3 minutes. La figure V-11 b) présente les aires des deux peptides spécifiques en fonction de débit de transfert de 50 µL d'acide formique entre 1 et 5 µL.min^{-1}. Comme attendu, les aires diminuent en augmentant le débit, c'est-à-dire en diminuant le temps de digestion. Comme précédemment, le plus faible débit (1 µL.min^{-1}) correspondant à un temps de digestion de 16 minutes permet d'obtenir une meilleure digestion.

En conclusion, un volume de transfert de 50 µL à 1 µL.min^{-1} a été choisi pour transférer le cytochrome *c* vers l'IMER de pepsine puis vers la colonne de piégeage. Le protocole final est résumé dans le tableau V-2.

étape	solvant utilisé
échantillon	1 µL d'une solution de Tris à pH 8 dopée à 100 ng de cytochrome *c*
digestion en ligne	percolation de 50 µL d'HCOOH (pH 2,5) vers la précolonne de piégeage (débit = 1 $\mu L.min^{-1}$)
séparation analytique	transfert des peptides de la précolonne vers la colonne analytique par la phase mobile

Tableau V-2 : Protocole de digestion du cytochrome c sur IMER de pepsine (1 mm d.i.) et analyse en ligne par cap-LC-UV

V.1.2.3. Sensibilité de la méthode de digestion

La même méthodologie qu'en format micro a été appliquée afin de déterminer la sensibilité de la méthode d'analyse. Le rapport signal sur bruit (S/N) des deux peptides spécifiques a été mesuré pour l'analyse de 100 ng (8,5 pmol) de cytochrome *c*. Des rapports S/N de 29 et de 26 ont été obtenus pour les peptides n° 1 et n°5 (t_R 15,1 et 25,5 min) respectivement. Les LDD sont alors estimées à 10,3 ng (1 pmol) et 11,7 ng (1,5 pmol) pour les peptides n°1 et n°5 respectivement.

La limite de détection de l'analyse par micro-LC était de l'ordre de 41 et 55 ng de cytochrome *c*. L'analyse par chromatographie capillaire a donc permis de gagner en sensibilité. Là encore, la sensibilité devrait être grandement améliorée avec une détection par spectrométrie de masse.

V.1.2.4. Stabilité de l'IMER

De nombreuses digestions en ligne ont été réalisées sur cet IMER et une très bonne stabilité a été observée durant 8 mois. Toutefois, comme le montre la figure V-12, au bout d'environ 140 analyses, le chromatogramme obtenu a été modifié.

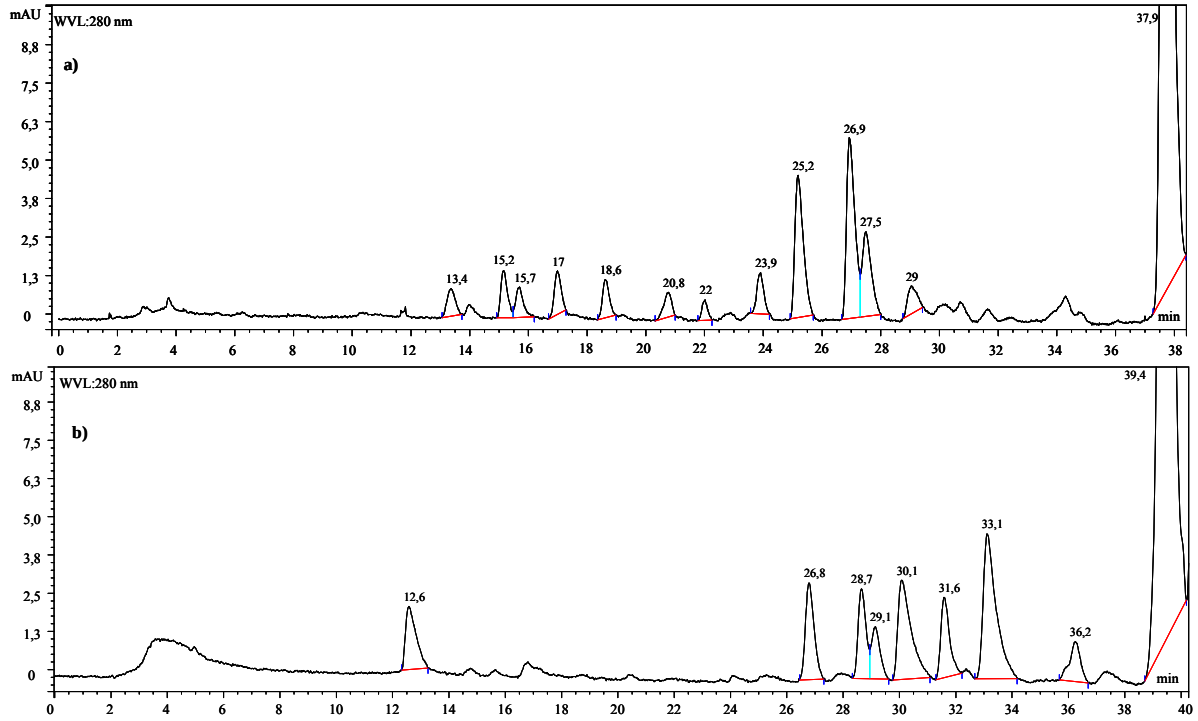


Figure V-12 : Chromatogrammes obtenus à 280 nm après digestion en ligne de 100 ng de cytochrome c (1 µL) sur l'IMER de pepsine à 1 µL.min^{-1} d'acide formique (pH 2,5) puis analyse par cap-LC-UV. a)110ème analyse b) 140ème analyse.

Entre la figure V-12 a) et la figure V-12 b), les peptides les moins hydrophobes (pour des t_R entre 13 et 26 min) ont des intensités beaucoup plus faibles alors que de nouveaux pics, correspondant à des composés plus hydrophobes sont apparus (t_R > 30 min). Compte tenu de la précision de la chromatographie capillaire en termes de temps de rétention, on peut penser que les trois pics aux temps de rétention 26,8, 28,7 et 29,1 minutes sur le chromatogramme b) correspondent aux trois pics aux temps de rétention 25,2, 26,9 et 27,5 sur le chromatogramme a).

La première hypothèse a été que la colonne de piégeage était défaillante menant à la perte des peptides les moins hydrophobes lors du transfert sur celle-ci. Cependant, elle a été remplacée et aucune amélioration n'a été observée, indiquant que ce changement de profil chromatographique n'était pas lié à un problème de rétention sur la colonne de piégeage.

Une autre hypothèse a été que les pics observés correspondent à des peptides différents et concerne donc l'IMER lui-même. En effet, au chapitre III, il avait été montré que l'IMER de trypsine développé de dimensions 20 x 2 mm d.i. n'était plus efficace au bout d'environ 10 mois d'analyse. Concernant, le réacteur de pepsine de dimensions 20 x 2 mm d.i., il avait

montré une très bonne stabilité durant 4 mois mais aucune donnée n'a pas permis d'établir la fin de vie de cet IMER de pepsine.

La dégradation de l'IMER de pepsine utilisé dans ce chapitre pourrait expliquer la disparition des peptides les moins hydrophobes au profit des plus hydrophobes, ces derniers étant des peptides présentant un plus grand nombre de ruptures manquées donnant des peptides de plus grands poids moléculaires. Un moyen de vérifier cette hypothèse aurait consisté à réaliser une nouvelle synthèse d'IMER. Toutefois, compte tenu du temps imparti et au vu des performances encore acceptables de cet IMER, il a été tout de même utilisé pour la suite de l'étude afin de montrer la faisabilité du couplage avec l'IS.

En conclusion, la méthode de digestion et analyse en ligne par chromatographie capillaire a été mise au point. La suite de l'étude porte donc sur le couplage de l'immunoadsorbant au système mis au point.

V.1.3. Couplage de l'immunoadsorbant au système de digestion en ligne par chromatographie capillaire

V.1.3.1. Mise au point du couplage

Pour coupler l'immunoadsorbant à la digestion en ligne et à l'analyse par chromatographie capillaire, le montage a du être modifié. Comme précédemment décrit en format conventionnel, une vanne de commutation 6 voies a été ajoutée afin d'intégrer l'IS entre la boucle d'injection et le réacteur enzymatique. Comme pour l'IMER, l'immunoadsorbant est encore dans des dimensions conventionnelles. La miniaturisation de l'IS et de l'IMER sera envisagée dans un second temps. La figure V-13 présente le montage expérimental.

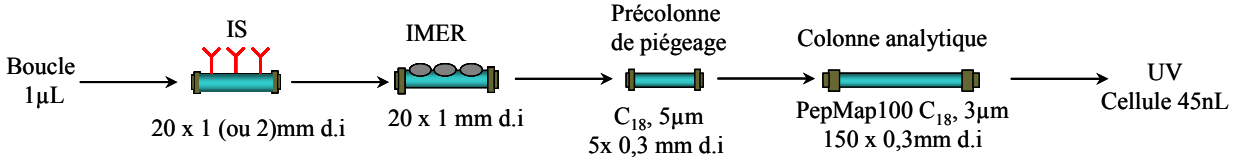


Figure V-13 : Représentation du montage expérimental pour le couplage de l'immunoadsorbant de l'IMER de pepsine pour l'analyse en ligne du cytochrome c par chromatographie liquide capillaire.

L'étude en format conventionnel avait montré que l'IS de diamètre interne 1 mm (IS 1) conduisait à un couplage optimal avec l'IMER de pepsine. Concernant le protocole d'extraction, les étapes de percolation et de lavage sont donc les mêmes que celles décrites au chapitre IV. La différence pour ce système porte essentiellement sur l'étape d'élution. Contrairement au couplage développé avec l'analyse LC-MS en format conventionnel, la digestion est désormais réalisée sans arrêt de débit. Par conséquent le volume d'élution de l'immunoadsorbant n'est plus une limitation pour le couplage entre l'IS et l'IMER. Le volume de transfert a du toutefois être ajusté au nouveau montage. Précédemment, le volume optimal de transfert était de 50 µL. Si on prend en compte le volume mort des connectiques ajoutées (4 µL) et le volume mort de l'IS 1 (11 µL), 65 µL d'acide formique sont nécessaires pour assurer le transfert entre l'IS 1 et l'IMER de pepsine. Compte tenu du volume pouvant être percolé sur la précolonne utilisée sans observer de perte de rétention des peptides (> 140 µL), un volume de transfert de 110 µL a tout de même été choisi afin de garantir une élution efficace de l'IS 1. Cependant, avec un débit de 1 $\mu L.min^{-1}$, le transfert aurait duré 110 minutes. Afin de réduire la durée de ce transfert, il serait possible de réduire les volumes morts entre les colonnes en diminuant le diamètre des capillaires utilisés pour le montage. Toutefois, compte tenu de la faible résistance mécanique du support de Sépharose utilisé, ceci engendrerait des contre-pressions trop élevées. Pour cette raison, le débit a été modifié pour la mise au point de la méthode à 2 $\mu L.min^{-1}$, ce qui induit un temps de résidence de la protéine dans l'IMER de 8 minutes au lieu de 16 minutes. En effet, les études précédentes ont permis de montrer qu'à 2 $\mu L.min^{-1}$, la digestion restait toujours efficace même si une baisse de l'intensité des peptides spécifiques avait été observée. Pour illustration, la figure V-14 compare les chromatogrammes obtenus après digestion en ligne de 50 ng de cytochrome *c* à 1 $\mu L.min^{-1}$ et à 2 $\mu L.min^{-1}$ suivant le protocole décrit dans le tableau V-2.

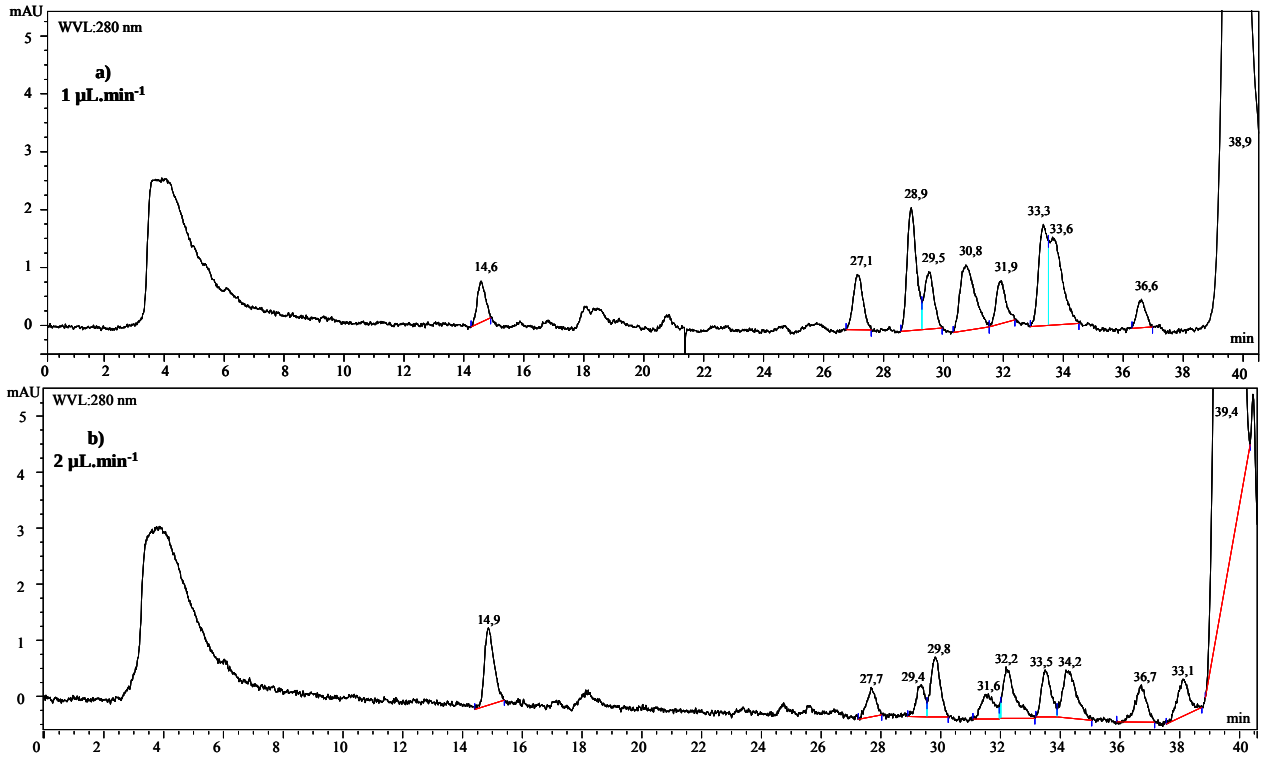


Figure V-14 : Chromatogrammes obtenus à 280 nm après digestion en ligne de 50 ng de cytochrome c sur l'IMER de pepsine à 1 µL.min^{-1} (a) ou 2 µL.min^{-1} (b) d'acide formique puis analyse par cap-LC-UV.

La figure V-14 montre effectivement un profil chromatographique similaire en termes de temps de rétention selon le débit de digestion utilisé et, comme précédemment mentionné, les aires des peptides diminuent, mais d'un facteur inférieur à 2. Toutefois, afin de démontrer la faisabilité du couplage, ce débit de digestion a été choisi dans un premier temps afin de diminuer le temps d'analyse de presque une heure. Le protocole d'analyse total est résumé dans le tableau V-3.

étape	solvant utilisé
échantillon	1 µL d'une solution de Tris à pH 8 dopée à 40 ng de cytochrome *c*
immunoextraction	- percolation de 250 µL de PBS *via* la boucle d'injection (débit : 50 µL.min^{-1}) - percolation de 250 µL de NaCl à 2 mol.L^{-1}, 250 µL d'eau pure (débit : 50 µL.min^{-1})
Elution digestion en ligne	L'IMER de pepsine a été conditionné préalablement avec de l'acide formique (pH 2) - le cytochrome c est élué de l'IS et transféré en continu vers l'IMER de pepsine puis vers la colonne de piégeage par 110 µL d'HCOOH (pH 2) à 2 µL.min^{-1}
séparation analytique	transfert des peptides de la précolonne vers la colonne analytique par la phase mobile

Tableau V-3 : Protocole d'analyse en ligne du cytochrome c par IS-IMER-cap-LC-UV

V.1.3.2. Analyse totale du cytochrome *c* par IS-IMER-cap-LC-UV dans un échantillon pur

40 ng de cytochrome *c* ont été extraits sur l'IS 1 et digérés en ligne sur l'IMER de pepsine selon le protocole décrit dans le tableau V-3. La quantité de cytochrome *c* percolée sur l'IS 1 (40 ng) a été choisie pour être largement inférieure à la capacité de l'IS déterminée au début de l'étude (2 µg). Les résultats ont été comparés à la digestion en ligne sans immunoextraction avec le nouveau montage. La figure V-15 présente les chromatogrammes obtenus.

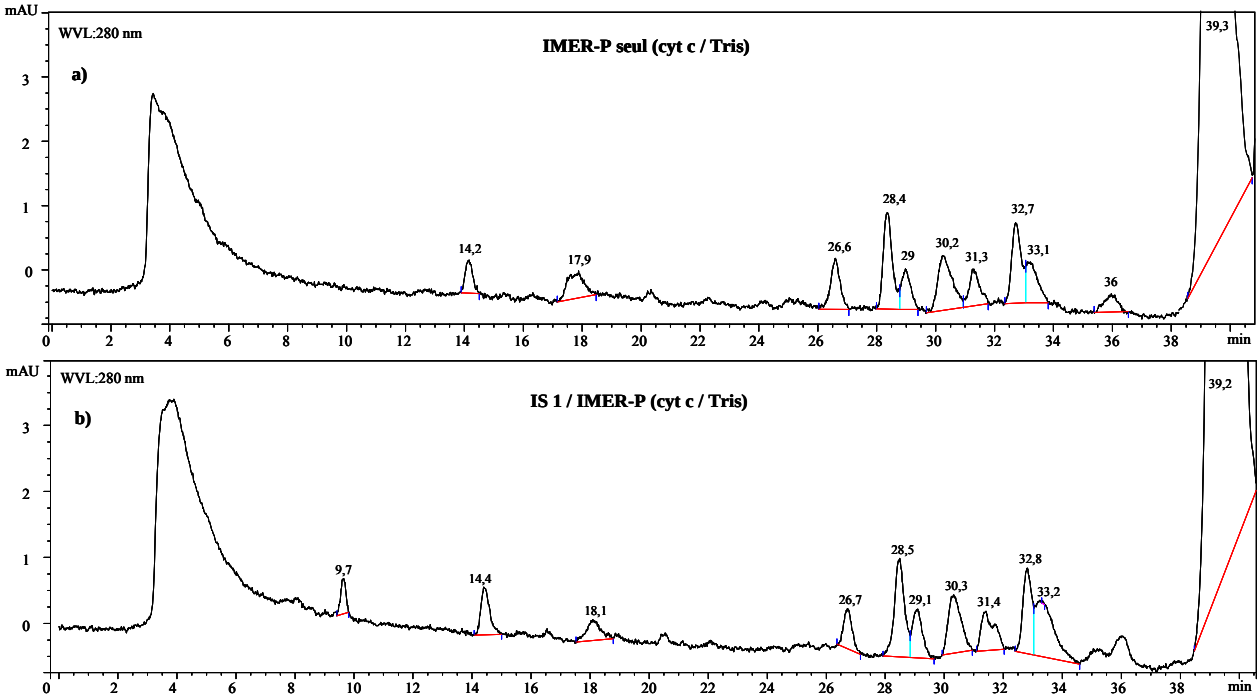


Figure V-15 : Chromatogrammes obtenus à 280 nm après digestion en ligne de 40 ng de cytochrome c sur l'IMER de pepsine seul (a) ou après immunoextraction sur l'IS 1 (b) et analyse par cap-LC-UV.

La figure V-15 montre des profils chromatographiques très similaires en termes de temps de rétention et d'aires des pics pour l'analyse du cytochrome *c* avec ou sans immunoextraction, ce qui montre la faisabilité du couplage à débit continu. Afin d'estimer le rendement du couplage par rapport à la digestion en ligne sans immunoextraction, le peptide spécifique à t_R = 26,6 min et un autre peptide à t_R = 30,2 min ont été choisis, car il semblent être les mieux résolus sur le chromatogramme. Par comparaison des aires entre les deux chromatogrammes obtenus, des rendements de 80 et 104 % sont obtenus pour ces deux peptides respectivement. Au vu des intensités des pics et des mauvaises résolutions, ces

résultats peuvent être assimilés à un rendement de couplage proche de 100 % par rapport à la digestion en ligne.

Afin de démontrer la sélectivité de la méthode mise au point, elle a été appliqué à un échantillon de plasma dopé par du cytochrome *c*.

V.1.3.3. Analyse totale du cytochrome *c* par IS-IMER-cap-LC-UV dans un échantillon de plasma

Dans un premier temps, un échantillon de plasma dilué (1/5) dopé par 40 ng de cytochrome *c* a directement été injecté sur l'IMER et analysé par cap-LC-UV, le protocole est celui décrit ci-dessus (tableau V-3), c'est-à-dire que la digestion a été réalisée à 2 $\mu L.min^{-1}$. La figure V-16 présente le chromatogramme obtenu et est comparé à celui obtenu pour l'analyse d'un échantillon pur dopé par la même quantité de cytochrome *c*.

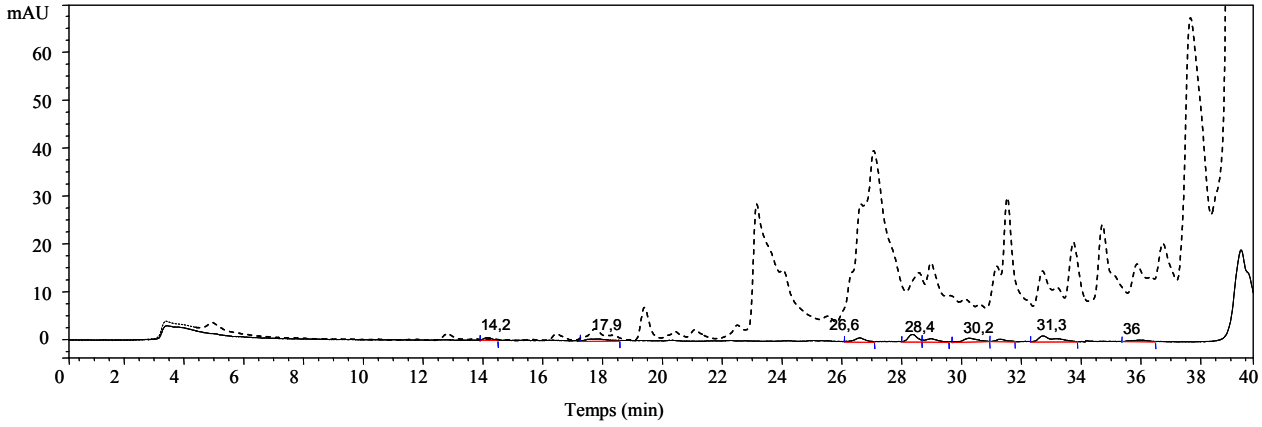


Figure V-16 : Chromatogrammes obtenus après digestions en ligne sur l'IMER de pepsine et analyses par cap-LC d'un échantillon pur (trait plein) et d'un échantillon de plasma dilué (pointillés) dopés par 40 ng de cytochrome c.

La figure V-16 montre clairement le grand nombre d'interférents présents dans le plasma et leur abondance par rapport au cytochrome *c* dopé à 40 ng. Les pics correspondant aux peptides spécifiques du cytochrome *c* sont totalement masqués par les interférents. Une telle analyse par une détection en spectrométrie de masse engendrerait des effets de matrice considérables rendant difficile l'identification et la quantification de la protéine. De nouveau, le besoin d'un traitement de l'échantillon sélectif est mis en évidence.

Cet échantillon de plasma a donc été analysé dans un second temps par immunoextraction suivie d'une digestion en ligne et analyse LC-UV en format capillaire

toujours à 2 µL.min^{-1}. La figure V-17 présente les chromatogrammes obtenus après analyse couplant l'IS 1 avec l'IMER de pepsine et l'analyse par cap-LC d'un échantillon pur et d'un échantillon de plasma dopés par 40 ng de cytochrome *c*.

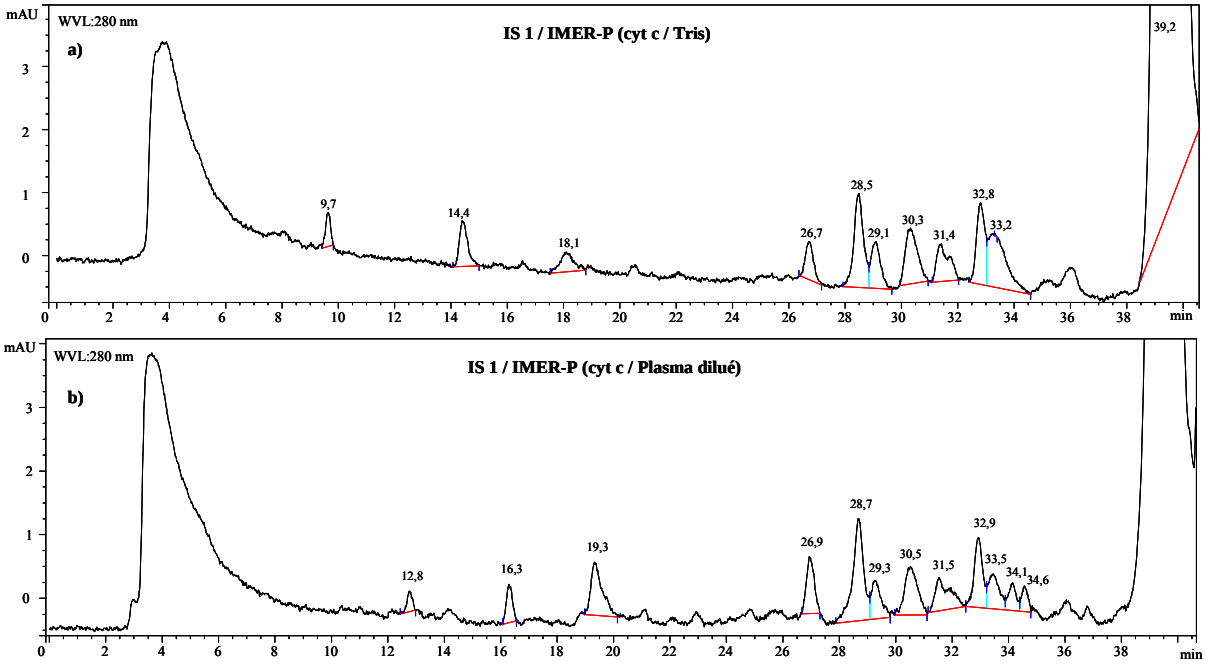


Figure V-17 : Chromatogrammes obtenus après analyse couplant l'IS 1 avec l'IMER de pepsine et l'analyse par cap-LC d'un échantillon pur (a) et d'un échantillon de plasma dilué (b) dopés par 40 ng de cytochrome c.

La figure V-17 montre que le chromatogramme obtenu après l'analyse de l'échantillon de plasma est très similaire à celui obtenu pour l'échantillon pur dopé, ce qui démontre à nouveau la grande sélectivité du protocole d'immunoextraction. En effet, si on compare ces résultats à ceux obtenus en LC-MS, l'apport en sélectivité est d'autant plus marqué puisque la détection UV est une détection moins spécifique.

Même si le couplage avec l'IS 1 montre de bons résultats, le couplage avec l'IS 2 a tout de même été évalué. En effet, dans l'étude en format conventionnel, la limitation de l'IS 2 pour le couplage était liée à un volume d'élution bien supérieur au volume de l'IMER. Toutefois, ce qui est problématique pour une digestion en « stop-flow », ne l'est plus pour une digestion en continu en sortie de l'IS.

Le débit d'élution-digestion choisi entre l'IS 2 et l'IMER de pepsine est toujours de 2 µL.min^{-1} d'acide formique (pH 2,5). Toutefois, le volume de transfert a été ajusté afin de prendre en compte le volume mort supplémentaire de l'IS 2 (44 µL). Ainsi, 140 µL d'acide formique au lieu de 110 µL ont donc été appliqués pour transférer le cytochrome *c* vers

l'IMER puis la colonne de piégeage. La figure V-18 présente les chromatogrammes obtenus après digestion en ligne de 75 ng de cytochrome *c* sur l'IMER de pepsine sans étape d'immunoextraction au préalable, puis après immunoextraction sur l'IS 2 suivie d'une digestion en ligne d'un échantillon pur et un échantillon de plasma dopés par 75 ng de cytochrome *c*.

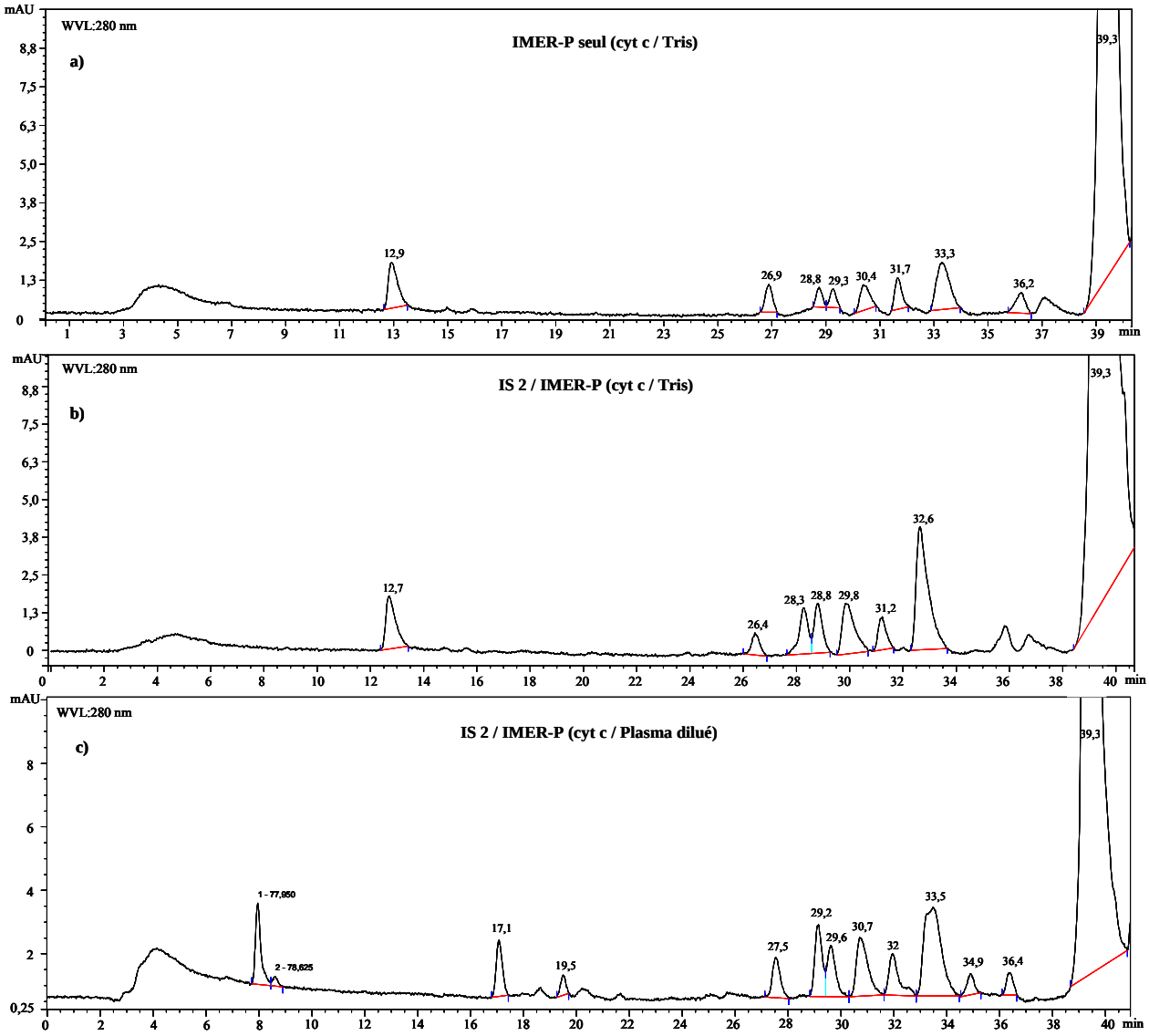


Figure V-18 : Chromatogrammes obtenus à 280 nm après analyse par chromatographie capillaire après digestion en ligne de 75 ng de cytochrome c dans un échantillon pur sans immunoextraction (a) ou avec immunoextraction sur l'IS 2 (b) et après analyse d'un échantillon de plasma dopés par 75 ng de cytochrome c couplant l'IS 2 et l'IMER (c).

Les trois chromatogrammes sont quasiment superposables dans la région des peptides hydrophobes, confirmant à nouveau la grande sélectivité de l'immunoadsorbant. Afin

d'estimer le rendement du couplage par rapport à la digestion en ligne sans immunoextraction, le peptide spécifique à tR = 26,8 min et un autre peptide à tR = 31,6 min ont été choisis. Par comparaison des aires entre les deux chromatogrammes obtenus, des rendements de 75 et 93 % sont obtenus pour ces deux peptides respectivement. En comparant le couplage appliqué à un échantillon de plasma dopé avec la digestion en ligne sans immunoextraction, des rendements de 118 et 104 % ont été observés pour les deux peptides.

Ces résultats confirment la grande sélectivité de l'immunoextraction puisqu'aucun effet matrice n'est observé. Au vu des intensités des pics et des mauvaises résolutions, ces résultats peuvent être assimilés à un rendement de couplage proche de 100 % par rapport à la digestion en ligne.

V.1.4. Conclusion

Dans un premier temps, seule l'analyse chromatographique a été miniaturisée. Le réacteur enzymatique a été conditionné dans une colonne de plus faible diamètre (1 mm) mais d'un format encore conventionnel. La digestion en ligne suivie de la séparation LC ont été mises au point en micro-chromatographie puis en chromatographie capillaire. Le matériel utilisé a permis la digestion en flux continu évitant de nombreuses étapes d'optimisation. Malheureusement, pour des raisons de disponibilités matérielles, la détection a du être effectuée en UV. Toutefois, un gain en sensibilité entre la µ-LC et la cap-LC a bien été obtenu. De plus, un gain en sensibilité entre l'analyse par LC-MS et l'analyse par cap-LC-UV a été démontré. Le couplage de la spectrométrie de masse à l'analyse par LC capillaire mise au point permettrait un gain supplémentaire en sensibilité.

Le couplage entre l'IS et l'IMER avec la cap-LC-UV a confirmé la grande sélectivité de l'immunoadsorbant et le bon rendement du couplage mis au point.

L'étape suivante consiste donc à miniaturiser l'ensemble des étapes de traitement d'échantillons avant l'analyse, c'est-à-dire l'immunoextraction et la digestion sur support d'enzymes immobilisées.

V.2. Miniaturisation de l'IMER

V.2.1. Introduction

L'objectif à terme reste le couplage d'un IS et d'un IMER de pepsine en format miniaturisé. Toutefois, au vu de la simplicité de la méthode de caractérisation développée pour les IMERs de trypsine en format conventionnel, les premiers travaux de miniaturisation ont été réalisés sur l'IMER de trypsine permettant un suivi UV de la digestion du BA*p*NA pour sa caractérisation.

De nombreuses études ont déjà porté sur la mise au point de réacteurs enzymatiques en format capillaire, le support d'enzymes immobilisées étant conditionné dans des capillaires de silice fondue de diamètres de l'ordre de la centaine de microns. Comme mentionné au chapitre II, les développements actuels ont principalement recours à la synthèse de monolithes *in situ* dans les capillaires compte tenu de la difficulté de remplissage des capillaires avec des phases particulaires et de la faible surface spécifique des colonnes à tube ouvert. En effet, les monolithes ont, par définition, une structure continue et présentent l'avantage de pouvoir être immobilisés de façon covalente à la paroi du capillaire. De plus, les monolithes sont constitués d'un réseau de mésopores et de macropores interconnectés assurant à la fois une grande surface spécifique ainsi qu'une grande perméabilité du monolithe et donc une diffusion rapide des macromolécules.

Comme précédemment décrit, deux types de monolithes ont été développés pour les IMERs dédiés à la digestion des protéines : ceux à base de polymères organiques et ceux à base de silice. Les monolithes organiques ont majoritairement été utilisés car leur synthèse est aisée, ils sont très stables chimiquement et présentent une bonne bicompatibilité. Toutefois, il a été reporté un phénomène d'adsorption non spécifique des protéines sur le support d'immobilisation formé à partir d'éthylènediméthacrylate (EDMA) [1,2]. La digestion nécessite alors l'ajout d'un modificateur polaire tel que l'acétonitrile ou le méthanol pour rompre ces interactions hydrophobes. Cependant, un pourcentage trop élevé de modificateur polaire peut entraîner la dénaturation des enzymes immobilisées et diminuer la rétention des peptides ainsi libérés sur la colonne de piégeage ou sur la colonne chromatographique. Pour ces raisons, les monolithes à base de silice ont été privilégiés dans cette étude. L'étude bibliographique a montré que les monolithes de silice ont particulièrement été développés pour l'encapsulation de biomolécules telles que des protéines, des anticorps ou des enzymes

ce qui permet de conserver l'activité de la biomolécule native en évitant le greffage covalent. Toutefois, peu ont été appliquées à la digestion des protéines. En effet, le procédé d'encapsulation nécessite la synthèse de pores de petite taille afin d'éviter le relargage des enzymes, ce qui n'est pas compatible avec la bonne diffusion des macromolécules telles que les protéines. Même si des monolithes à distribution de pores bimodale (macropores et mésopores) ont été développés, le relargage d'enzyme a encore été observé [3,4]. Seule une étude portant sur un tel IMER a été appliquée à la digestion avec succès des protéines, mais elle ne mentionne pas le relargage d'enzymes ni la stabilité de l'IMER développé [5].

Par conséquent, au vu des différentes études réalisées, un monolithe à base de silice associé à un greffage covalent de l'enzyme de digestion semble le meilleur compromis pour l'obtention d'un IMER performant. Cette étude s'est inspirée des conditions de synthèse décrites par l'équipe de Y. Zhang [6]. Cette synthèse est basée sur la co-condensation de deux précurseurs par le procédé sol-gel, le tétraéthoxysilane (TEOS) et le 3-aminopropyl tri-éthoxysilane (APTES) générant un monolithe hybride organique-inorganique possédant des groupements amine.

V.2.2. Synthèse et caractérisation du support monolithique

V.2.2.1. Stratégie de synthèse

La synthèse des monolithes à base de silice est réalisée par le procédé sol-gel. Ce procédé permet de générer un réseau de silice à partir de précurseurs en solution. Les deux précurseurs utilisés sont le TEOS et l'APTES. Le TEOS est un des précurseurs les plus utilisés pour la synthèse de monolithes à base de silice. Ce précurseur contient quatre fonctionnalités susceptibles de former des liaisons siloxane et va permettre de générer un réseau rigide de silice. L'APTES contient quant à lui une fonction amine en plus des trois fonctionnalités pouvant être incluses dans le réseau de silice. Il a été utilisé afin de pouvoir effectuer, à terme, un greffage covalent des enzymes sur le monolithe. Ainsi, comme le montre la figure V-19, la co-condensation du TEOS et de l'APTES permet de générer un monolithe de silice possédant des groupements amine [6].

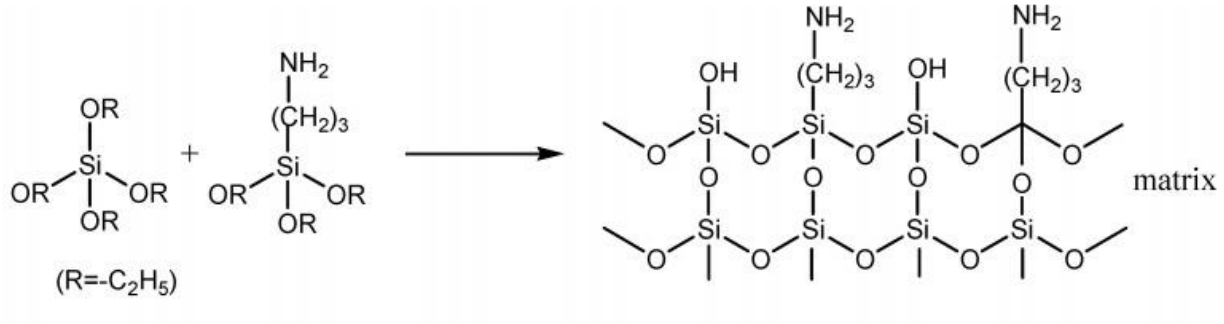


Figure V-19 : Procédé de synthèse du monolithe hybride à base de TEOS et d'APTES. Adapté de [6].

Afin de lier le monolithe de façon covalente à la paroi du capillaire, une étape préalable de traitement du capillaire est nécessaire. Dans la littérature, le protocole de prétraitement de capillaire le plus utilisé est celui développé par Hjertén [7]. Dans un premier temps, le capillaire est rincé à la soude afin d'accroître le nombre de groupements silanol disponibles et ainsi d'augmenter la surface d'interaction. La deuxième étape consiste à lier chimiquement un composé à la paroi interne par une réaction de silanisation. L'agent silanisant contient généralement un groupement silane trifonctionnel capable de se lier à la paroi de silice du capillaire ainsi qu'une autre fonction qui participe à la réaction de polymérisation pour la formation du monolithe. Dans le cas des monolithes de silice, une simple activation du capillaire de silice par de la soude est suffisante afin que les silanols de la paroi du capillaire prennent part à la réaction sol-gel en formant des liaisons siloxane.

Lors de la synthèse d'une colonne monolithique, la porosité de la structure doit être contrôlée puisqu'elle détermine des paramètres importants tels que la perméabilité (et donc la contre-pression générée), la surface spécifique, la capacité et l'efficacité de la colonne monolithique. En particulier, dans le cas de la digestion de protéines, la diffusion de ces macromolécules est améliorée par la présence de macropores dans la structure. Dans cette étude, un procédé d'empreinte par utilisation d'un surfactant, le cétyltriméthylammonium (CTAB) a été réalisé, l'objectif étant de générer et de contrôler les pores du monolithe [8]. Le CTAB forme des agrégats micellaires assez flexibles. Cette flexibilité leur confère une bonne capacité d'adaptation à la forme de leur environnement comme le réseau poreux d'une matrice sol-gel. De plus, comme l'illustre la figure V-20, la tête positivement chargée du CTAB est capable de s'adsorber sur la matrice de silice négativement chargée par des interactions électrostatiques tandis que la queue hydrophobe forme des structures micellaires variées [9].

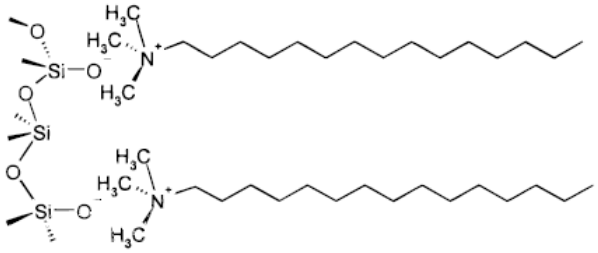


Figure V-20: Représentation du surfactant CTAB et de son adsorption sur une surface de silice [9].

En conclusion, la synthèse du monolithe hybride poreux est le résultat de deux processus compétitifs, l'organisation du surfactant et la polymérisation [10]. La synthèse du monolithe ayant lieu *in situ*, des capillaires en silice vierge de faible diamètre interne ont été choisis (100 µm). Les capillaires utilisés sont d'ailleurs transparents pour pouvoir aisément observer l'homogénéité du remplissage au micoscope.

V.2.2.2. Procédure de synthèse

(i) Prétraitement de la surface interne du capillaire

Avant d'introduire le mélange réactif dans le capillaire, celui-ci est traité afin d'accroitre le nombre de groupements silanols sur la paroi du capillaire.

D'un point de vue pratique, l'introduction des différentes solutions dans le capillaire est réalisée en mode hydrodynamique, en surélevant le flacon contenant la solution à introduire d'une certaine dénivellation (10 cm) par rapport à un flacon vide disposé à l'autre extrémité du capillaire. Une différence de pression entre les deux extrémités du capillaire est créée afin de propulser la solution à l'intérieur du capillaire. Pour cela, de l'air est injecté au moyen d'une seringue dans le flacon contenant la solution. La figure V-21 présente le montage expérimental utilisé.

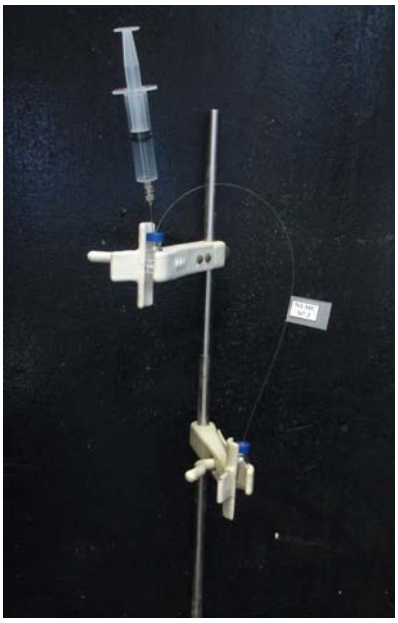


Figure V-21 : Mode d'introduction des différentes solutions dans le capillaire.

Ainsi, après décapage d'un capillaire de silice de 20 cm de long pendant 30 minutes à l'acide puis rinçage à l'eau jusqu'à atteindre un pH proche de 7, une solution fortement basique de soude est introduite dans le capillaire en continu durant 2 heures. Le capillaire est ensuite rincé à l'eau puis au méthanol pour au final être séché sous azote pendant 3 heures. Le protocole d'activation du capillaire utilisé est décrit en détails en annexe 10.

(ii) Protocole de synthèse du monolithe

Comme mentionné précédemment, le TEOS et l'APTES ont été utilisés comme précurseurs car ils possèdent respectivement quatre et trois fonctionnalités susceptibles, après hydrolyse, de former des liaisons siloxane. Ainsi, afin d'obtenir un monolithe perméable et résistant mécaniquement, la solution a été préparée avec un mélange de TEOS et APTES à un ratio molaire stœchiométrique 1:1. L'APTES contenant une fonction amine permettra, après activation de ces fonctions, l'immobilisation covalente d'enzymes. Un autre avantage de l'APTES, est le fait qu'à pH acide ou neutre, le groupement amine est positivement chargé limitant l'accès et donc les risques d'adsorption non spécifique des protéines basiques avec les silanols résiduels. Afin de générer les macropores, le CTAB a été ajouté à sa concentration supérieure à la concentration micellaire critique (cmc) qui est de l'ordre de 0,8 mmol.L^{-1} [11].

L'hydrolyse des précurseurs est initiée par ajout d'eau et de l'éthanol est ajoutée afin de solubiliser les précurseurs mais aussi pour retarder la réaction d'hydrolyse. L'APTES peut être utilisé comme catalyseur basique interne du à la présence du groupement amine dans sa structure [12]. En effet, les premières expériences ont montré que le gel se forme en seulement quelques minutes après avoir mélangé l'APTES au reste du mélange alors qu'aucun gel n'est formé même après plusieurs heures en absence d'APTES. Aucun catalyseur n'est donc ajouté au mélange réactif.

Les deux précurseurs, le CTAB, l'éthanol et l'eau sont introduits dans un flacon de faible volume (2 mL) et agités durant quelques secondes avant d'être incorporé dans un capillaire de 100 µm d.i. prétraité. Deux différents temps d'agitation et deux différents modes d'introduction dans le capillaire ont été testés et seront décrits par la suite. En effet, la solution de précurseurs polymérisant très rapidement, l'introduction dans le capillaire est une étape délicate. Le capillaire est ensuite placé à 40 °C durant 24 heures où le monolithe se forme et est séché. A ce stade de la synthèse, seul un capillaire rempli de 5 cm de longueur est conservé. Une extraction par solvant (EtOH) permet d'éliminer le surfactant et le monolithe est rincé à l'eau. Le protocole de synthèse du monolithe est décrit en détail en annexe 10.

V.2.2.3. Caractérisation du monolithe

Avant de greffer les enzymes sur le support monolithique, plusieurs synthèses ont été effectuées et les monolithes ainsi obtenus ont été caractérisés. Pour cela, les pressions générées par chaque monolithe sont comparées et les capillaires ont été observés par microscopie.

(i) Influence du ratio TEOS / APTES

Une première synthèse a été réalisée dans un capillaire de dimension 50 x 0,1 mm d.i., appelée **SG-1**. Le mélange de réactifs est injecté dans le capillaire grâce à une seringue connectée au capillaire *via* un embout en Teflon. Après élimination du CTAB par de l'éthanol, la perte de charge générée par le monolithe ainsi préparé est évaluée en délivrant de l'eau avec une pompe permettant des débits de l'ordre du $nL.min^{-1}$ (MircoPump 350, Gilson). Ainsi, le monolithe **SG-1** a généré une perte de charge de 50 bars à 0,5 $\mu L.min^{-1}$. Cette perte de charge est cinquante fois plus élevée par rapport à celle obtenue par l'équipe de Zhang, qui est de 54 bars à 5 $\mu L.min^{-1}$ pour un monolithe de dimensions 10 x 0,1 mm d.i. [9].

Pour cette raison, l'influence du ratio TEOS / APTES a aussi été étudiée. En effet, le TEOS contenant 4 fonctionnalités susceptibles de former des liaisons siloxane et l'APTES n'en contenant que 3, une diminution du ratio TEOS / APTES est sensée conduire à une diminution du degré de condensation. De plus, l'augmentation de ce ratio mène à un plus grand nombre de groupement amine, favorisant le futur greffage des enzymes. Le ratio TEOS / APTES de 1/1 appliqué pour le **SG-1** a été comparé à un ratio 2/3 menant à un monolithe **SG-2** de même dimension (50 x 0,1 mm d.i.). Le mode d'introduction du mélange de précurseurs a toujours été réalisé toujours *via* une seringue connectée au capillaire. De nouveau, la pression générée par cette colonne **SG-2** a été de 69 bars à 0,5 $\mu L.min^{-1}$ d'eau. La diminution de perte de charge attendue pour un degré de réticulation moins important lors de la polymérisation n'a donc pas été observée. Finalement, le ratio TEOS / APTES de 1/1 a été conservé.

(ii) Homogénéité du remplissage dans le capillaire

Lors du remplissage du capillaire par le mélange de précurseurs, des difficultés ont été rencontrées lors de l'injection dans le capillaire obligeant à appliquer une certaine pression. Il a même été observé une polymérisation très rapide dans le capillaire avant même que la solution de précurseurs n'ait eu le temps de ressortir. Ainsi, quelques essais ont mené à des monolithes présentant des inhomogénéités visibles à l'œil nu. Pour cette raison, un autre mode de remplissage a été testé. Le capillaire **SG-3** a donc été rempli par capillarité en plongeant le capillaire de silice dans le mélange de synthèse. Ainsi, les monolithes obtenus selon ces deux modes de remplissage (**SG-1** et **SG-3**) ont été comparés. Le capillaire de silice étant transparent, les monolithes ont pu être observés au microscope afin d'étudier l'homogénéité du remplissage du monolithe. Les photos des observations faites au microscope sont présentées sur la figure V-22.

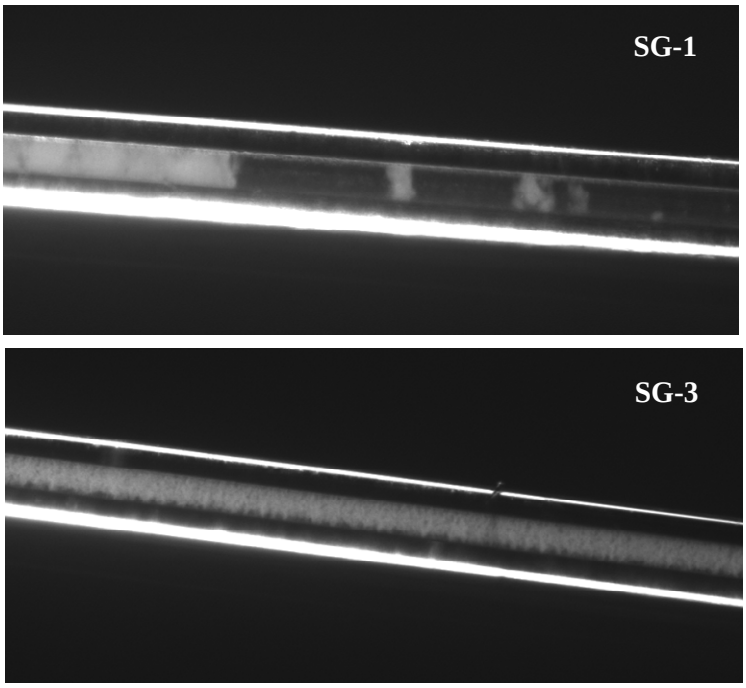


Figure V-22 : Photos des capillaires SG-1 et SG-3après synthèse du monolithe sol-gel hybride suivant deux modes de remplissages différents.

La figure V-22 montre que pour le monolithe **SG-1**, une partie du capillaire n'est pas remplie, contrairement au monolithe **SG-3** dont le remplissage est homogène tout le long du capillaire. Le remplissage à la seringue demande un temps plus long. En effet, après avoir agité le mélange de précurseurs durant 15 secondes, la mise en place du système prend bien 10 à 15 secondes avant d'injecter le mélange dans le capillaire (**SG-1**) alors que 5 secondes suffisent pour le remplissage par capillarité (**SG-3**). La solution pouvant polymériser en quelques secondes, ceci peut expliquer l'inhomogénéité observée liée au remplissage pour SG-1. En conclusion, l'injection du mélange de précurseurs par capillarité a été choisie.

Pour ces capillaires de 5 cm de long (**SG-1** et **SG-3**), la pression générée par le capillaire à 0,5 $\mu L.min^{-1}$ d'eau est de 50 bars pour **SG-1** et de 6 bars pour **SG-3**. La pression générée par le **SG-3** est faible par rapport à celle générée par le **SG-1**. Ceci s'explique sûrement, comme précédemment, par le mode d'injection plus rapide de la solution dans le capillaire et donc un temps de polymérisation plus court avec injection dans le capillaire. Afin de vérifier cela, le monolithe **SG-3** dont le mélange de précurseur a été agité pendant 15 secondes avant d'être injecté dans le capillaire a été comparé à un autre monolithe (**SG-4**) préparé à partir du même mélange de précurseurs mais agités pendant 30 secondes avant l'injection dans le capillaire par capillarité. L'observation au microscope du monolithe **SG-4** sur la figure V-23 montre qu'il est bien homogène tout le long du capillaire.

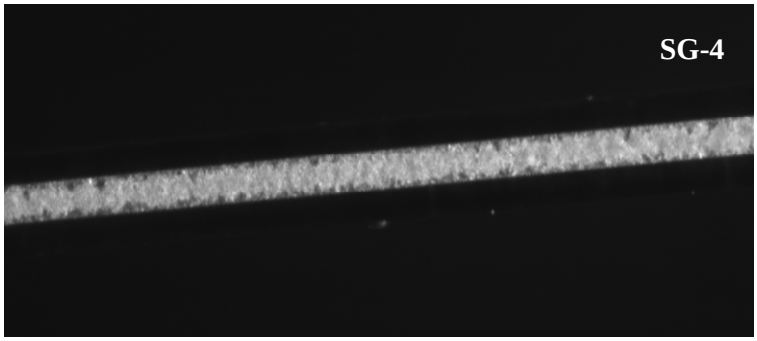


Figure V-23 : Photo du capillaire SG-4.

Comme attendu, la pression générée par le monolithe **SG-4** (P = 15 bars à 0,5 µL.min^{-1}) est supérieure à celle générée par le **SG-3** (P = 6 bars), ce qui traduit qu'une agitation plus longue avant l'introduction dans le capillaire favorise la polymérisation du monolithe et donc le degré de condensation.

(iii) Microscopie électronique à balayage

Afin d'évaluer la régularité de la polymérisation, le monolithe a été observé par microscopie électronique à balayage (MEB). Ces observations ont été effectuées sur des sections transversales des capillaires. Le MEB est une technique destructive mais elle est réalisée sur des sections de capillaire très courtes et ce après métallisation préalable à l'or. L'annexe 11 décrit les conditions d'utilisation du MEB. La figure V-24 présente une image MEB du monolithe **SG-3**.

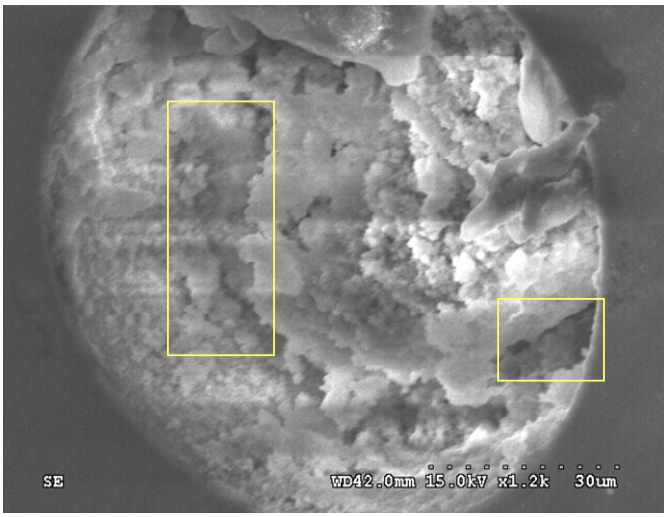


Figure V-24 : Image MEB d'une section de capillaire du monolithe SG-3.

Malgré la mauvaise qualité d'image, on peut tout d'abord noter que le monolithe est bien ancré à la paroi de capillaire, ce qui indique que la méthode d'activation du capillaire est efficace. Toutefois, la polymérisation du monolithe ne semble pas très homogène. En effet, on peut observer des espaces non remplis réduisant la surface spécifique du monolithe et pouvant expliquer la grande perméabilité du monolithe.

Pour comparaison, une section du monolithe **SG-2** a été observée au MEB. Ce monolithe a été choisi car il présente une perte de charge bien plus élevé (P = 50 bars à 0,5 $\mu L.min^{-1}$) par rapport au monolithe **SG-3**. Ainsi, on suppose que la polymérisation est plus dense et que le monolithe présente moins d'interstices. Les images MEB d'une section transversale du monolithe **SG-2** sont présentées sur la figure V-25.

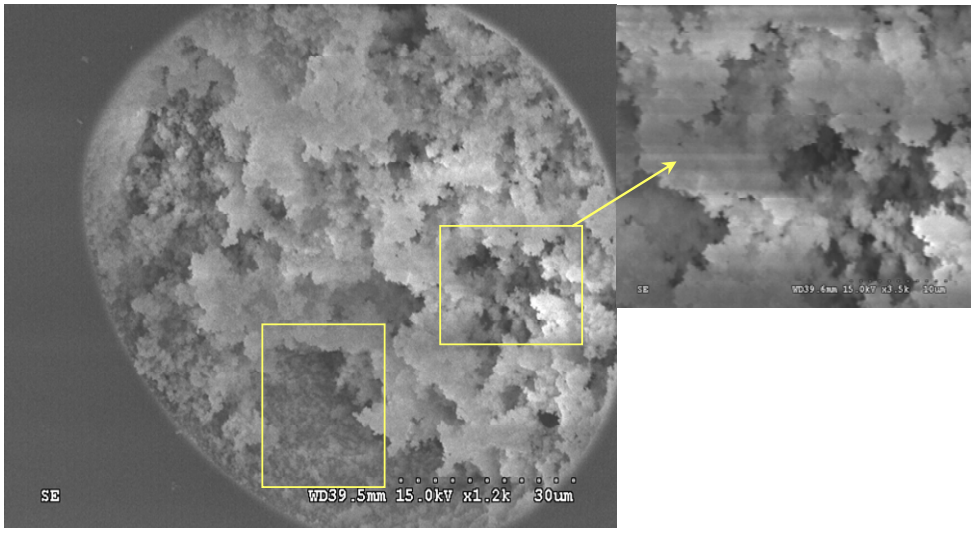


Figure V-25 : Images MEB d'une section de capillaire du monolithe SG-2.

Comme précédemment, on peut observer que le monolithe est bien ancré à la paroi du capillaire. Comme attendu compte tenu des pressions générées, le monolithe est plus dense que le monolithe **SG-3**. On peut aussi observer la présence de macropores dont la taille n'a pu être estimée en raison de la mauvaise qualité des images pour des grossissements supérieurs.

Rappelons que le monolithe **SG-2** a été préparé avec un ratio TEOS/APTES de 2/3 contre 1/1 précédemment, ce qui, en théorie, mène à un degré de condensation moins important. Toutefois, le remplissage du capillaire **SG-2** ayant été réalisé par une seringue, la solution de précurseurs a eu le temps de plus polymériser avant son injection dans le capillaire par rapport au monolithe **SG-3**.

Les résultats obtenus montrent que la synthèse du monolithe reste encore à optimiser. Cependant, compte tenu des faibles pressions générées par SG-3, celui-ci a été choisi pour l'immobilisation des enzymes afin de vérifier la faisabilité d'un tel greffage.

V.2.3. Synthèse et caractérisation du réacteur enzymatique en format miniaturisé

Dans un premier temps et afin de caractériser aisément l'IMER miniaturisé, l'enzyme immobilisée choisie a été la trypsine. En, effet, le substrat chromogène BA*p*NA permet d'évaluer rapidement l'efficacité de digestion d'un IMER de trypsine.

V.2.3.1. Immobilisation de la trypsine sur le monolithe

Une fois le monolithe synthétisé, les groupements amine du monolithe sont activés par du glutaraldéhyde comme le montre la figure V-26.

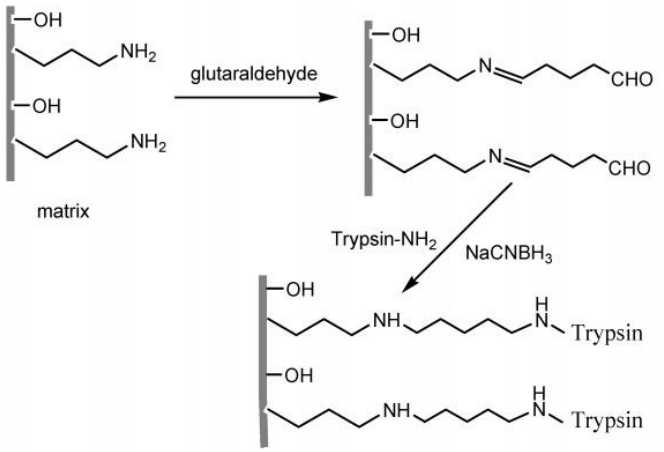


Figure V-26 : Principe d'activation du monolithe par du glutaraldéyde et immobilisation de la trypsine.

Ainsi, la trypsine peut être immobilisée par greffage covalent par réaction des fonctions amine primaire de la trypsine avec les groupements aldéhydes de la fonction glutaraldéhyde. Pour cela, une solution de trypsine préparée dans un tampon phosphate (pH 8) contenant du benzamidine afin de prévenir de l'autolyse de la trypsine est percolée durant 24 heures. Comme précédemment décrit, une solution de cyanoborohydrure de sodium ($NaCNBH_3$) est ajoutée dans la solution de trypsine pour réduire la fonction imine et stabiliser l'enzyme immobilisée. Le protocole d'immobilisation est précisément décrit en annexe 10.

Le bras espaceur entre le support et l'enzyme ainsi obtenu permet une meilleure flexibilité de l'enzyme. De plus, les liaisons Si-C ainsi crées à la surface permettent d'améliorer la résistance du monolithe à base de silice à une plus large gamme de pH.

L'IMER de trypsine ainsi obtenu de dimensions 50 x 0,1 mm d.i. a ensuite été caractérisé.

V.2.3.2. Evaluation des performances de l'IMER miniaturisé

(i) Principe

a) Montage expérimental

Comme décrit au chapitre III, l'évaluation de l'efficacité de digestion du réacteur de trypsine immobilisée a été réalisée par la mesure du rendement de digestion du substrat BA*p*NA spécifique de la trypsine donnant un produit détectable en UV.

Pour cela, l'IMER de trypsine a été couplé à l'analyse LC capillaire – UV précédemment développée. La chaîne utilisée est donc la chaine Ultimate 3000 précédemment décrite (annexe 9) à l'exception de la pompe de préconcentration. En effet, si cette dernière est adaptée à la percolation de solutions à des débits compatibles aux précolonnes de 1 mm de diamètre, elle ne permet pas d'atteindre des débits inférieurs à 1 $\mu L.min^{-1}$. Or, en raison du faible diamètre de l'IMER miniaturisé (100 µm d.i.), des débits bien inférieurs à ceux utilisés sur les IMERs en format conventionnel précédemment développés doivent être appliqués pour assurer un temps de digestion suffisamment long entre le substrat et les enzymes immobilisées et ce même si la structure monolithique permet aux substrats de diffuser plus rapidement qu'à travers les supports particulaires. Ainsi, une pompe micro-pompe 350 Gilson permettant de délivrer des débits de 100 $nL.min^{-1}$ a été utilisée comme pompe de préconcentration. La figure V-27 présente le montage utilisé. La précolonne de piégeage et la colonne analytique sont les mêmes que précédemment, c'est-à-dire des colonnes de 300 µm de diamètre interne remplies de phase de silice greffée C_{18}. Les échantillons sont injectés *via* une boucle de 250 nL.

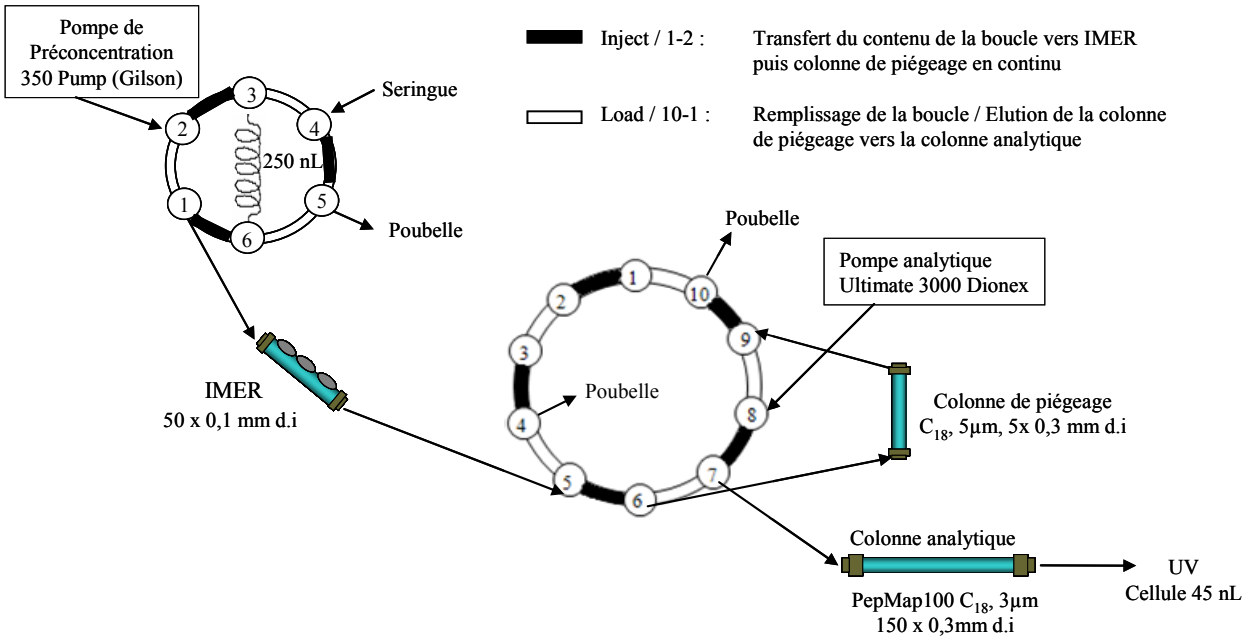


Figure V-27 : Schéma de l'analyse couplant l'IMER de trypsine miniaturisé (50 x 0,1mm d.i.) avec une analyse par LC capillaire et une détection UV.

b) Mise au point d'une méthode d'analyse du BA*p*NA et du *p*-NA en LC capillaire

La méthode d'analyse chromatographique du BA*p*NA et du *p*-NA a du être préalablement mise au point en format capillaire. Comme pour la méthode développée en format conventionnel au chapitre III, la phase mobile est composée d'un tampon phosphate (pH 7) et d'acétonitrile. Le gradient a été modifié avec une variation de 30 à 50 % d'acétonitrile en 10 minutes. Dans ces conditions, le *p*-NA et le BA*p*NA sont élués à 10,5 et 14,8 minutes respectivement.

Pour établir les droites d'étalonnage du BA*p*NA et du *p*-NA, 250 nL des solutions de BA*p*NA et de *p*-NA ont directement été percolées sur la colonne de piégeage par transfert *via* le tampon de digestion. Le volume mort calculé entre la boucle et la colonne de piégeage est inférieur à 3 µL. Toutefois, l'étude précédente ayant prouvé la très bonne rétention de la colonne de piégeage, 5 µL de tampon de digestion ont été utilisés pour transférer le *p*-NA et le BA*p*NA de la boucle vers la colonne de piégeage sans risque d'engendrer de perte des composés. Notons que le tampon de digestion utilisé est similaire à celui précédemment utilisé en format conventionnel, c'est-à-dire un tampon tris 50 $mmol.L^{-1}$, contenant 10 $mmol.L^{-1}$ de $CaCl_2$. Toutefois, la solution a été préparée à un pH légèrement inférieur de 7,5 afin d'être dans des conditions compatibles avec le support d'immobilisation de l'IMER et

avec la phase stationnaire hydrophobe de la colonne de piégeage, tous deux à base de silice, tout en conservant une bonne activité trypsique.

Ainsi, des solutions contenant de 5 à 200 µmol.L^{-1} (entre 1,25 et 50 pmol) de BA*p*NA et de *p*-NA préparées dans le tampon de digestion, ont été injectées et analysées par LC-UV. Ces quantités sont inférieures à celles étudiées en format conventionnel (entre 20 pmol et 40 nmol). La figure V-28 représente les deux courbes d'étalonnage obtenues à 310 et 380 nm pour le BA*p*NA et le *p*-NA respectivement (n=3 pour chaque niveau de concentration).

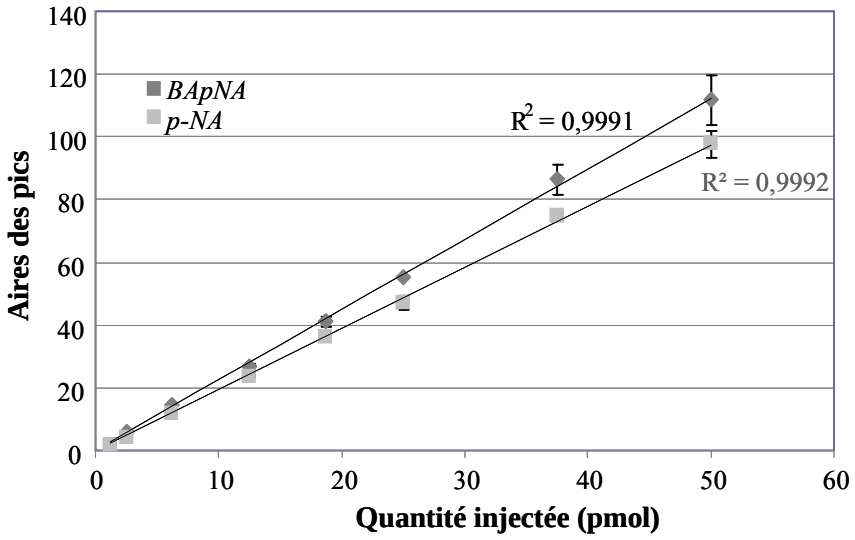


Figure V-28 : Courbes d'étalonnage obtenues après analyses par LC capillaire de quantités croissantes de BApNA et du p-NA entre 1,25 et 50 pmol (n=3).

Comme le montre la figure V-28, une méthode d'analyse quantitative du BA*p*NA et du *p*-NA a été développée entre 1,25 et 50 pmol injectées. De plus, les coefficients de variation obtenus sont inférieurs à 7 % indiquant que l'analyse est répétable. En mesurant le rapport S/N des deux composés, la limite de détection (S/N =3) est estimée à 1,25 µmol.L^{-1} (0,3 pmol) pour le *p*-NA et à 0,5 µmol.L^{-1} (0,13 pmol) pour le BA*p*NA.

Cette méthode d'analyse mise au point en cap-LC a ensuite été directement appliquée pour évaluer l'efficacité de digestion du BA*p*NA sur l'IMER de trypsine miniaturisé.

(ii) Estimation du rendement de digestion du BApNA sur l'IMER de trypsine miniaturisé

Les conditions de digestion de BA*p*NA préalablement mises au point sur l'IMER de trypsine ont du être adaptées au montage utilisé. Ainsi, outre le changement de pH, la

digestion a été effectuée à température ambiante pour des raisons matérielles. Enfin, un débit de 100 nL.min^{-1} correspondant au débit minimum pouvant être appliqué par la pompe de préconcentration a été choisi de façon arbitraire comme débit de digestion. Les dimensions de l'IMER étant de 50 x 0,1 mm d.i., ce débit volumique correspond à une vitesse linéaire de 12,7 mm.min^{-1}, ce qui assure un temps de résidence du substrat de 4 minutes dans le réacteur enzymatique. Le volume mort d'un capillaire de dimensions 50 x 0,1 mm d.i. est de 390 nL. La porosité du monolithe préparé **SG-3** n'ayant pas été évaluée, on peut toutefois estimer que le volume mort de l'IMER est proche si ce n'est supérieur à 250 nL. Par conséquent, si on tient compte du volume de la boucle (250 nL), de l'IMER et des connectiques, 1 µL suffisent largement pour transférer l'échantillon sur l'IMER. Toutefois, l'échantillon de BA*p*NA est percolé par 3 µL de tampon de digestion à 100 nL.min^{-1} pour assurer sa digestion sur l'IMER, puis10 µL de tampon de digestion sont percolés à 1 µL.min^{-1} sur l'IMER connecté à la colonne de piégeage afin de s'assurer que le *p*-NA résultant et le BA*p*NA résiduel soient bien éliminés de l'IMER et qu'ils atteignent bien la colonne de piégeage. La figure V-29 présente le chromatogramme résultant de la digestion de 25 pmol de BA*p*NA sur l'IMER de trypsine miniaturisé.

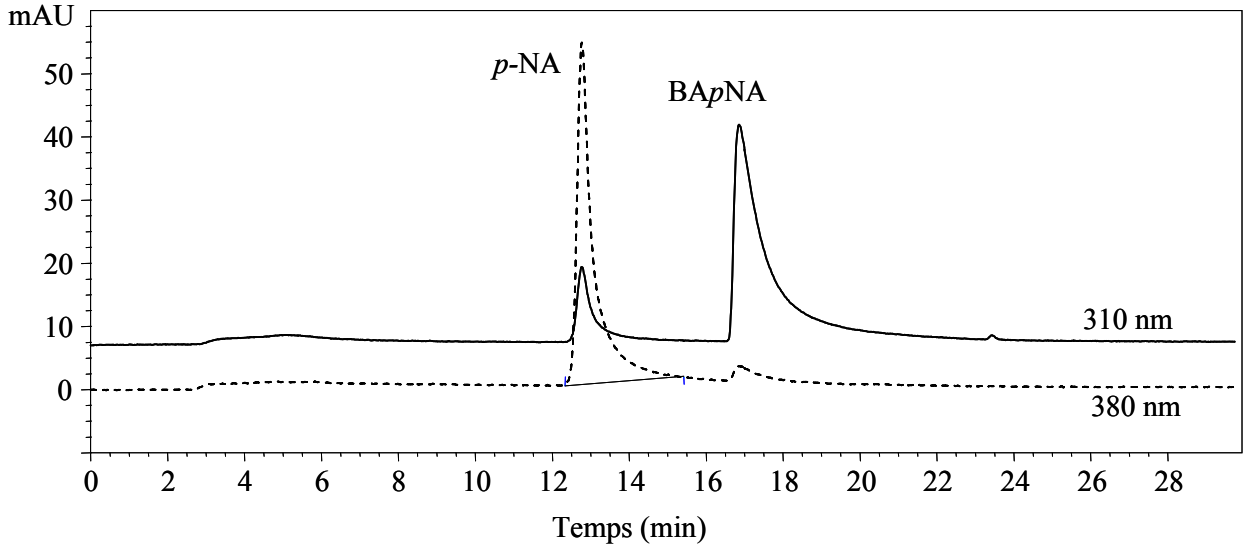


Figure V-29 : Chromatogrammes à 310 nm et à 380 nm après digestion sur l'IMER de trypsine miniaturisé de 25 pmol de BApNA et analyse en ligne du produit et du substrat résiduel par LC-capillaire

La figure V-29 montre qu'après percolation d'une solution de BA*p*NA sur l'IMER de trypsine miniaturisé, le produit de digestion, le *p*-NA, a été détecté. Ce premier résultat très encourageant indique donc que l'immobilisation de la trypsine sur le monolithe a été effectuée. Afin de confirmer ce résultat, la digestion de 25 pmol de BA*p*NA a été réalisée 7

fois. Les rendements de digestion ainsi que les taux de récupération ont été mesurés en exploitant les droites d'étalonnage établies précédemment. Rappelons que le taux de récupération représente le rapport de la quantité totale détectée (*p*-NA et BA*p*NA) sur la quantité initialement introduite (25 pmol). La figure V-30 présente les résultats obtenus.

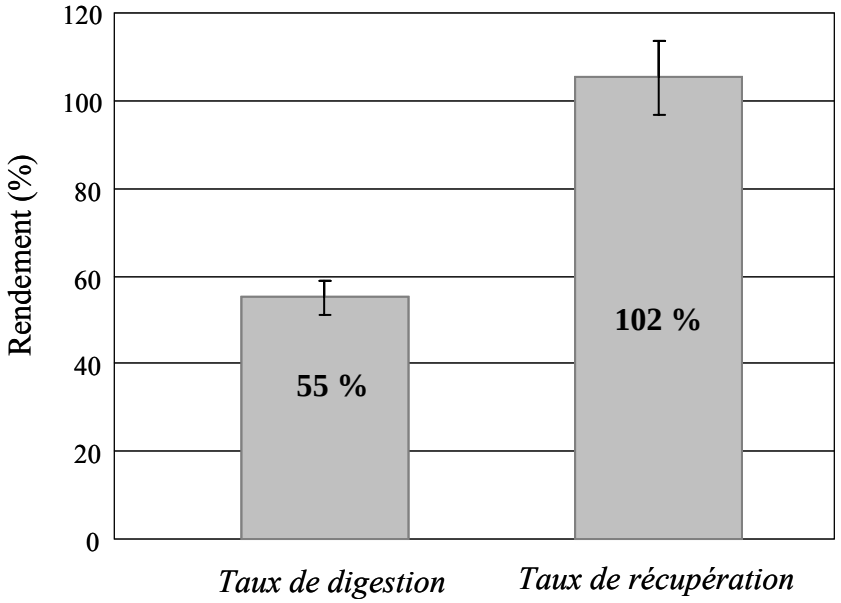


Figure V-30 : Rendements de digestion et taux de récupération obtenus après 7 digestions de 25 pmol de BApNA et analyse en ligne du produit et du substrat résiduel par LC capillaire.

La figure V-30 montre, que le taux de récupération obtenu est proche de 100 % indiquant que le protocole de digestion en ligne appliqué est satisfaisant et qu'aucune interaction non spécifique ne se développe entre l'IMER et le substrat BA*p*NA. En effet, au chapitre III, il avait été observé que dans le cas de la SyrosZyme^{TM}, l'addition de 50 % d'acétonitrile était nécessaire pour éluer au final le produit et le substrat résiduel. Ce résultat avait été attribué au développement d'interactions non spécifiques se développant entre les composés et le support d'immobilisation à caractère hydrophobe à base de polymère PS-DVB de la StyrosZyme^{TM}. Dans le cas de l'IMER miniaturisé, aucune addition de solvant ne s'est pas avérée nécessaire. Ceci peut s'expliquer par la grande hydrophilie du monolithe préparé malgré l'incorporation d'un précurseur organosilane (APTES) lors de la synthèse.

On peut aussi observer, la très bonne répétabilité obtenue pour le taux de récupération et le rendement de digestion avec des coefficients de variation inférieurs à 8 %. En moyenne, un rendement de digestion du BA*p*NA de 55 % a été obtenu. Cette valeur est très proche de celle précédemment trouvée où un rendement de digestion de 60 % avait été obtenu après digestion en ligne sur l'IMER à base de Sépharose activée CNBr et un rendement de 47 %

avait été obtenu après digestion en solution, comme après digestion sur la colonne commerciale de trypsine StyrosZyme^{TM}.

Les résultats obtenus montrent alors le grand potentiel du support monolithique à base de silice pour le développement de réacteurs de digestion miniaturisés. Toutefois, comme mentionné au chapitre II, le problème majeur des IMERs à base d'un monolithe de silice préparé par voie sol-gel est le contrôle de la taille des pores. En effet, les principaux réacteurs enzymatiques développés ont été appliqués à la digestion de molécules de faible poids moléculaire. Afin de s'affranchir de cet inconvénient, la synthèse de l'IMER a été réalisée en présence de surfactant cationique servant d'empreinte moléculaire pour générer les macropores. Il convient donc de confirmer les résultats obtenus avec le peptide BA*p*NA par la digestion d'une macromolécule afin de vérifier si la protéine diffuse bien à travers l'IMER de trypsine. Comme précédemment, le cytochrome *c* a été choisi comme protéine modèle.

(iii) Digestion en ligne du cytochrome c

Pour la digestion et l'analyse du cytochrome *c*, le montage expérimental précédemment décrit pour le BA*p*NA a été utilisé (figure V-27). En particulier, la précolonne de piégeage et la colonne analytique sont les mêmes. Comme déjà mentionné, la détection est réalisée en UV pour des raisons matérielles. La méthode analytique en cap-LC-UV n'a été mise au point que pour un digestat à la pepsine et non à la trypsine dont l'analyse a uniquement été mise au point par LC/MS en format conventionnel.

Il a donc été nécessaire de développer une méthode en cap-LC-UV pour l'analyse des peptides issus d'une digestion trypsique. Ainsi, la séparation a été effectuée par un gradient eau / acétonitrile acidifié à 0,1 % d'acide formique allant de 5 à 50 % en 20 minutes.

De plus, le protocole de digestion a toutefois été modifié par rapport à la digestion du BA*p*NA. Comme précédemment, l débit minimum pouvant être appliqué par la pompe de préconcentration étant de 100 nL.min^{-1}, un temps de digestion de 20 minutes en mode « stop-flow » a tout d'abord été choisi entre la protéine et la trypsine immobilisée. Comme déjà mentionné, le volume mort de l'IMER a été estimé à une valeur proche si ce n'est supérieur à 250 nL, ce qui correspond au volume de la boucle d'injection. Le volume de la boucle est donc transféré sur l'IMER par 250 nL de tampon de digestion et on peut donc penser que la majorité de l'échantillon est alors mise en contact avec la trypsine immobilisée.

La figure V-31 présente le chromatogramme UV après la digestion en ligne de 125 ng de cytochrome *c* sur l'IMER de trypsine miniaturisé comparé au chromatogramme obtenu après digestion trypsique en solution de la même quantité de cytochrome *c* et analysé par cap-LC-UV.

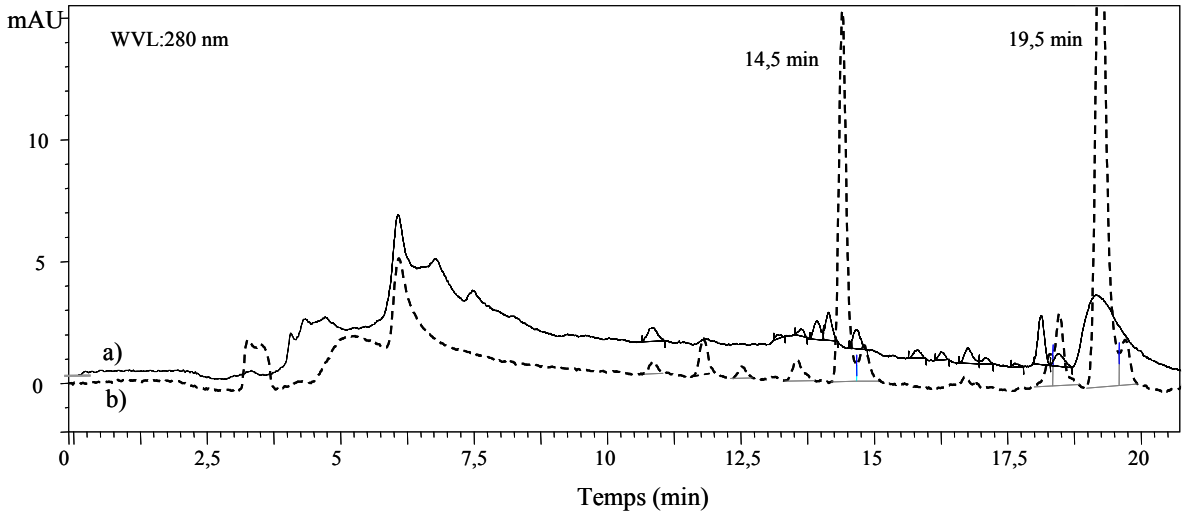


Figure V-31 : Chromatogrammes à 280 nm après digestions en ligne de 125 ng de cytochrome c sur l'IMER de trypsine miniaturisé (a) et après digestion trypsique en solution (E/S = 1/50) (b).

Comme indiqué précédemment, seules quelques observations peuvent être faites au vu du système chromatographique utilisé. Ainsi, quelques pics de faible intensité entre 10 et 18 minutes et un plus large pic à 19 minutes ont été détectés dans le cas de la figure V-31 a). Le large pic à 19 min correspond au cytochrome *c* non digéré compte tenu de sa forte absorbance caractéristique à 400 nm. Malheureusement, sans une détection par spectrométrie de masse, les pics n'ont pas pu être attribués à des peptides spécifiques du cytochrome *c*.

Toutefois, par comparaison avec le chromatogramme obtenu après digestion en solution (figure V-31 b), on peut observer des résultats assez analogues en termes de temps de rétention. Il apparaît que les pics observés sont plus intenses pour la digestion en solution, en particulier pour le pic à 14,5 min. Ces résultats peuvent être interprétés par une meilleure efficacité de digestion en solution par rapport à l'IMER miniaturisé. Toutefois, l'étude poussée réalisée pour la digestion à la pepsine n'a pas été effectuée pour la digestion trypsique et les pics spécifiques du cytochrome *c* n'ont pas été déterminés. Il est donc difficile de conclure sur les performances de l'IMER. Toutefois, afin d'évaluer l'efficacité de digestion de l'IMER et malgré la limitation spectrale de la lampe UV utilisée, l'aire du pic à 400 nm correspondant au cytochrome *c* à 19,5 min a été comparée à celle obtenue après la digestion en solution. Contrairement à ce qui était attendu, l'aire après digestion sur l'IMER est deux

fois inférieure à celle obtenue en solution. Une première hypothèse est qu'une partie du cytochrome c injectée est restée au niveau de l'IMER, soit par des interactions non spécifiques, soit la protéine est restée bloquée au niveau des mésopores du monolithe.

Ce résultat est toutefois encourageant et montre la faisabilité de la digestion du cytochrome *c* par l'IMER miniaturisé. En revanche, il est à noter que des problèmes de répétabilité ont été observés ensuite. En effet, pour des digestions réalisées exactement dans les mêmes conditions, seul un pic, 2 fois plus intense, attribué au cytochrome *c* non digéré a été détecté. Une vingtaine de digestions en ligne du BA*p*NA puis environ 5 digestions de cytochrome c ont été réalisées sur l'IMER miniaturisé avant d'observer ce problème. Ce problème de répétabilité peut être lié à la détérioration de l'IMER au niveau du monolithe lui-même ou bien des enzymes immobilisées.

V.2.4. Conclusion

En conclusion, cette étude préliminaire a montré le grand potentiel des monolithes à base de silice pour la synthèse de réacteurs enzymatiques en format capillaire. Une efficacité de digestion similaire à celle obtenue en format conventionnel a été obtenue sur le substrat de faible pois moléculaire, le BA*p*NA. Toutefois, la mauvaise répétabilité des digestions du cytochrome *c* suggère de revoir la synthèse et le procédé d'immobilisation. En effet, la maîtrise du procédé de synthèse sol-gel est délicate. Dans un second temps, le greffage de la trypsine doit être optimisé. Une méthode pour mesurer la quantité de trypsine immobilisée a déjà été décrite et pourrait être utilisée [5,6]. Elle est basée sur le test de Bradford. Celui-ci est une réaction colorimétrique entre les protéines et un colorant ; le bleu de Coomassie afin de mesurer la concentration protéique. Ce réactif, rouge/brun à l'état libre, prend une teinte bleue quand il est lié aux protéines et par conséquent possède un coefficient d'extinction molaire élevé dans le visible (à 595 nm) qui permet un dosage protéique très sensible. Pour appliquer ce test à la mesure de la trypsine immobilisée sur l'IMER développé, une partie du capillaire pourrait être placée dans une solution de soude, ce qui permettrait de rompre la liaison entre la trypsine et le support. La trypsine obtenue est alors mise en présence du réactif de Bradford et par comparaison avec des solutions étalons, la quantité de trypsine immobilisée dans le capillaire peut être estimée par mesure spectrophotométrique. Avec ce test, on aurait une meilleure maîtrise du greffage, ce qui ensuite permettrait d'appliquer l'expertise acquise sur un IMER de pepsine.

L'objectif étant de miniaturiser la totalité du système analytique, l'analyse par LC-MS/MS en format nano a été parallèlement développée. Le laboratoire disposant depuis peu d'un système d'analyse en format puce couplé à une détection par spectrométrie de masse, l'analyse d'un digestat du cytochrome *c* a été développée.

V.3. Analyse d'un digestat de cytochrome *c* par HPLC-Chip/MS

V.3.1. Description

Comme décrit au chapitre I, le système HPLC-Chip/MS est un microsystème analytique, intégrant une précolonne d'enrichissement d'échantillon connectée à une vanne de commutation 6 voies et une colonne de séparation directement terminée par une pointe « nanospray » pour une détection par spectrométrie de masse. La puce est schématisée sur la figure V-32.

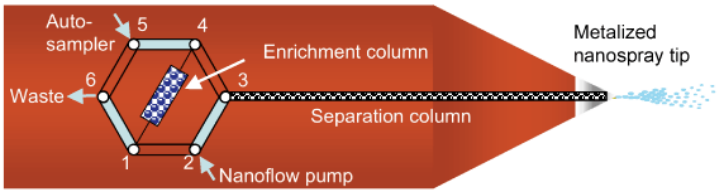


Figure V-32 : Schéma de la puce HPLC-Chip/MS Agilent.

La puce est à base de film de polyimide fabriquée par ablation laser. La phase stationnaire constituant la puce utilisée est une silice greffée C_{18} de diamètre 5 µm et de 300 Å de porosité. La longueur du canal de séparation est de 43 mm. Sa section n'est pas en réalité sphérique mais plutôt rectangulaire de dimension 75 x 50 µm. Le colonne d'enrichissement correspond à un réservoir de 40 nL rempli par de la silice greffée C_{18} et elle permet, comme précédemment décrit, l'étape de dessalage des peptides avant l'analyse par spectrométrie de masse.

V.3.2. Développement de la méthode d'analyse du digestat du cytochrome *c*

V.3.2.1. Conditions de séparation et de détection

Dans un premier temps et dans l'optique de coupler l'IMER précédemment développé, l'analyse a été mise au point sur un digestat trypsique de cytochrome *c*. Lors de la mise au point de l'analyse par LC-MS conventionnelle, un digestat de 20 µL contenant 5 µg de cytochrome *c* avait été utilisé. L'analyse du cytochrome *c* par HPLC-Chip/MS a été mise au point a partir d'une solution de 1 µL de digestat de cytochrome *c* contenant 5 ng de cytochrome *c*. Le protocole de digestion en solution est décrit en annexe 3.

Le spectromètre de masse utilisé étant le même que celui précédemment utilisé pour une analyse par LC en format conventionnel (trappe ionique Agilent 1100 SL); les conditions d'acquisition de la masse n'ont quasiment pas été modifiées. En effet, des infusions directes de digestat de cytochrome *c via* la source nanospray d'une puce dédiée aux infusions sont techniquement possibles mais les sels du tampon de digestion ne sont pas compatibles avec une détection par spectrométrie de masse. De plus, même si un dessalage est effectué avant l'infusion, par exemple avec un système tel que les embouts de pipette ZipTip®, de nombreux peptides sont obtenus après la digestion des protéines et l'optimisation devient alors complexe sans séparation chromatographique au préalable. Les seules modifications des paramètres de l'analyse par spectrométrie de masse ont concerné en fait les paramètres de la source d'ionisation. En particulier, la tension du capillaire dépend fortement de la phase mobile utilisée, elle est d'autant plus faible que la phase mobile contient un fort pourcentage d'acétonitrile. Comme précédemment, la séparation chromatographique a été assurée par une phase mobile constituée d'eau et d'acétonitrile acidifiés à 0,1 % d'acide formique. Le gradient utilisé a été modifié et la proportion d'acétonitrile varie de 5 à 55 % en 30 minutes à 300 $nL.min^{-1}$. Ainsi, la tension de capillaire a été fixée à 1850 V en début d'analyse de façon à obtenir un spray stable à 5 % d'acétonitrile. Puis, la tension du capillaire a été diminuée au cours de l'analyse, de sorte que le spray soit toujours stable durant l'analyse. Ainsi, la tension passe de 1820 V à 1600 V en diminuant de 50 V toutes les 6 minutes. La méthode d'analyse par HPLC-Chip/MS est décrite en détail en annexe 12.

V.3.2.2. Analyse du digestat

Dans un premier temps, 1 µL de digestat trypsique de 10 ng de cytochrome *c* est injecté sur la colonne d'enrichissement par 5 µL de la phase mobile constituée d'un mélange d'eau et d'acétonitrile (98/2 H_2O/MeCN) acidifiée à 0,1 % d'acide formique à 4 $\mu L.min^{-1}$. Cette étape de préconcentration est assurée par une première pompe capillaire HPLC. Elle permet en même temps le dessalage du digestat nécessaire avant l'analyse par spectrométrie de masse. Les peptides sont ensuite élués et séparés sur le canal de séparation par la phase mobile. La séparation est assurée par une deuxième pompe nano HPLC. Le courant ionique total obtenu est présenté sur la figure V-33.

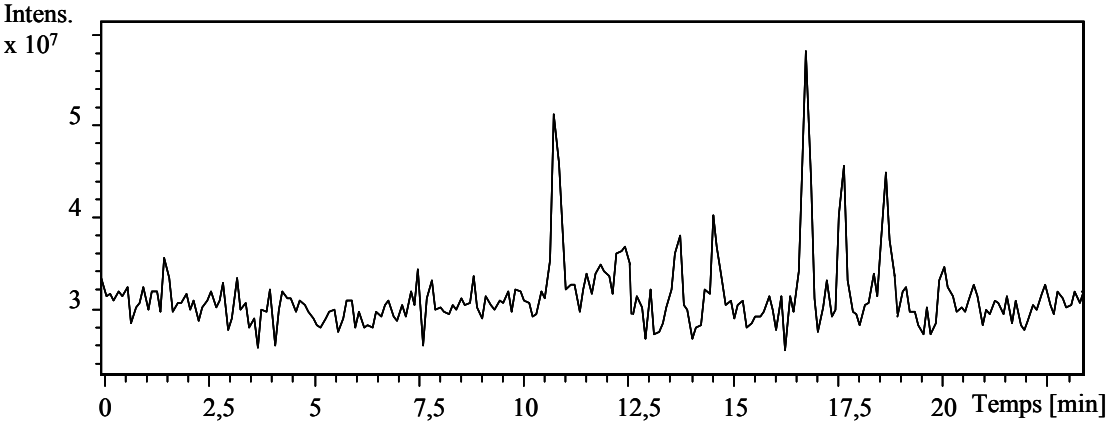


Figure V-33 : Courant ionique total obtenu après analyse par HPLC-Chip/MS de 1 µL de digestat trypsique en solution contenant 10 ng de cytochrome c.

L'acquisition en mode MS/MS a permis d'utiliser le logiciel MASCOT. Ainsi, un recouvrement de séquence de 52 % avec 8 peptides reconnus par MASCOT a été obtenu avec l'analyse présentée sur la figure V-33. Le digestat a été analysé deux autres fois et les mêmes peptides ont été détectés avec un recouvrement de séquence variant entre 40 et 52 %. Le tableau V-4 présente la liste des peptides détectés par MASCOT.

Tr (min)	*m/z* détectés par MASCOT	Charges	Masse (Da) du peptide correspondant	Séquences peptidiques	Positions	Coupure manquée
7,1	533,9 ; 800,1	3+ ; 2+	1597,8	**K**TGQAPGFTYTDANK	40-54	1
7,8	736,1	2+	1469,7	TGQAPGFTYTDANK	41-54	0
8,3	454,9	2+	906,5	MIFAGI**KK**	81-88	1
9,4	390,4 ; 584,9	3+ ; 2+	1167,6	TGPNLHGLFGR	29-39	0
9,7	390,3 ; 779,5	2+ ; 1+	778,4	MIFAGIK	81-87	0
10,5	541,9 ; 812,6	3+ ; 2+	1622,8	EETLMEYLENP**KK**	62-74	1
10,7	482,7 ; 964,6	2+ ; 1+	963,5	EDLIAYLK	93-100	0
11,4	748,6	2+	1494,7	EETLMEYLENPK	62-73	0
			Nombre de peptides totaux reconnus par MASCOT		**8**	

Tableau V-4 : Peptides identifiés par MASCOT après 3 analyses d'un digestat trypsique (E/S : 1/50) de 10 ng de cytochrome c (1 µL injecté). Sont indiqués, le temps de rétention, les rapports m/z détectés, les charges correspondant, les masses et séquences des peptides détectés, leur position dans la séquence du cytochrome c et la présence ou non d'un site de coupure manqué.

Les deux peptides spécifiques de rapports *m/z* 736,1 et 748, 6 précédemment étudiés pour caractériser les IMERs de trypsine ont bien été détectés par MASCOT.

V.3.2.3. Utilisation de l'outil de quantification

Afin de vérifier si l'outil de quantification mis au point en format conventionnel pouvait être appliqué à l'analyse par HPLC-Chip/MS et également pour estimer la sensibilité, la réponse des aires des deux peptides caractéristiques du cytochrome *c* a été reportée en fonction de la quantité de protéine injectée. Pour cela, des quantités croissantes de cytochrome *c* comprises entre 0,5 et 10 ng (entre 42,7 et 854 fmol) digérées en solution par la trypsine ont été analysées par HPLC-Chip/MS. La figure V-34 présente les aires des deux peptides spécifiques du cytochrome *c* de rapports *m /z* 736,1 et 748,6 en fonction de la quantité de cytochrome *c* digérée.

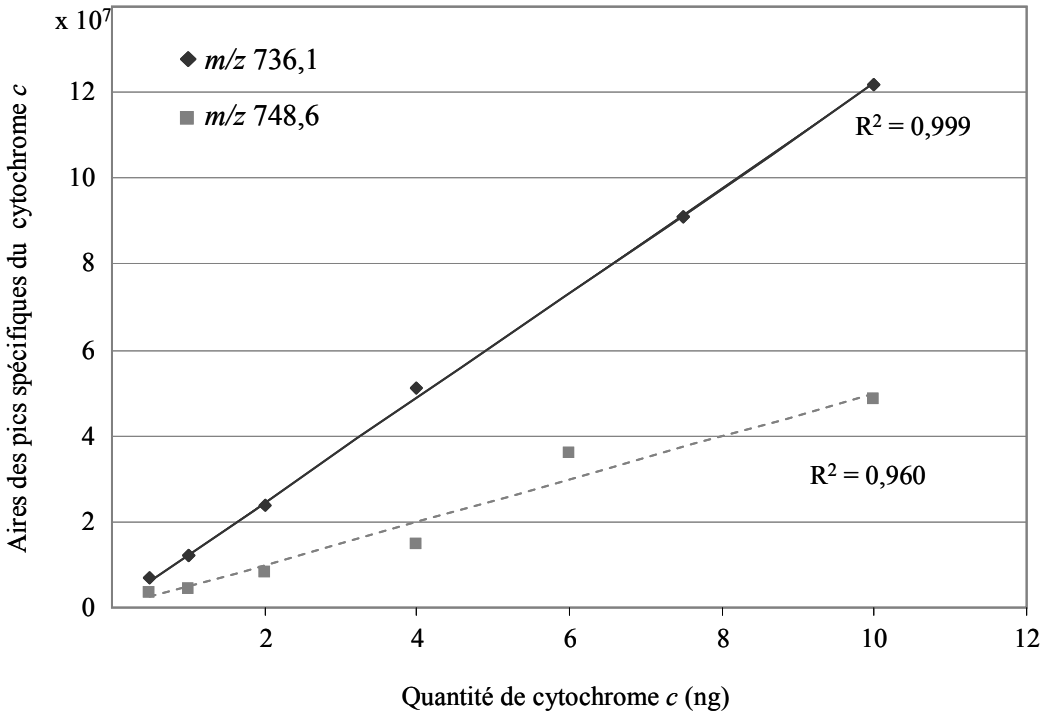


Figure V-34 : Aires des rapports m/z 736,1 et 748,6 correspondant aux deux peptides spécifiques du cytochrome c en fonction de la quantité de cytochrome c (entre 0,5 et 10 ng) digérée en solution par la trypsine (E / S = 1/50) et analyse par HPLC-Chip/MS

La figure V-34 montre que la variation des aires des pics des deux peptides spécifiques en fonction de la quantité de cytochrome *c* digérée entre 0,5 et 10 ng (42,7 à 854 fmol) peut être considérée comme linéaire même s'il est à noter que deux valeurs aberrantes ont été éliminées du graphe, à 6 et 8 ng pour les ions de rapports *m/z* 736,1 et 748,6 respectivement. Ces résultats démontrent la bonne stabilité du spray obtenu avec la puce/MS, ce qui présente un réel avantage par rapport aux sources nanospray classiques couplées à la nano-LC. L'outil de quantification peut donc être utilisé en première approximation en HPLC-Chip/MS dans cette gamme de concentration. Des quantités supérieures n'ont pas été testées.

Le logiciel MASCOT reconnaît le cytochrome *c* entre 2 et 7,5 ng avec des recouvrements de séquence allant de 52 à 26 %. En dessous de 2 ng (170 fmol), la protéine n'est plus reconnue, c'est la limite d'identification par MASCOT. Ainsi, grâce à l'outil de quantification développé, une meilleure sensibilité peut être atteinte. En effet, les droites d'étalonnage ont été établies jusqu'à 0,5 ng (42,7 fmol) et le rapport S/N est de 10 pour l'ion de rapport *m/z* 748,6 et de 30 pour l'ion de rapport *m/z* 736. La limite de détection (S/N =3) est estimée à 0,15 ng pour le *m/z* 748,5 (13 fmol) et à 0,01 ng (0,9 fmol) pour le *m/z* 736,1.

Le gain en sensibilité entre l'analyse par LC-MS en format conventionnel (20 µL injectés) et l'analyse par nanoHPLC-Chip/MS (1 µL injecté) est d'environ 600 pour le peptide de rapport *m/z* 748,6 et de 900 pour le peptide de rapport *m/z* 736,1.

La sensibilité obtenue pour l'analyse par HPLC-Chip/MS est ainsi de l'ordre de 10 $ng.mL^{-1}$ en prenant en compte le peptide le plus intense (*m/z* 736,1). Cette sensibilité est satisfaisante pour l'analyse de biomarqueurs mais peut être largement améliorée par le couplage de spectromètre de masse de nouvelle génération qui vient d'être acquis par le laboratoire.

V.4. Conclusion

L'objectif final de cette étude était la mise au point d'une méthode d'analyse en ligne d'une protéine ciblée en format miniaturisé.

Dans un premier temps, l'analyse a été développée en format micro et en format capillaire avec une détection UV. Le couplage de l'IS et de l'IMER de diamètre interne de l'ordre du millimètre avec l'analyse cap-LC-UV a confirmé la faisabilité du couplage et la grande sélectivité de l'immunoadsorbant.

Un réacteur enzymatique en format capillaire a ensuite été synthétisé. Le support d'immobilisation choisi est un monolithe de silice hybride inorganique-organique permettant le greffage covalent de l'enzyme. Même si l'objectif était la synthèse d'un IS et d'un réacteur de pepsine en capillaire, la trypsine a tout d'abord été immobilisée afin de caractériser simplement le réacteur ainsi développé.

L'IMER ainsi obtenu a montré un rendement de digestion du BA*p*NA similaire à celui obtenu en format conventionnel avec un taux de récupération proche de 100 %, indiquant que la trypsine a bien été immobilisée sur le monolithe de silice et qu'aucune interaction non spécifique n'est observée avec le support.

Toutefois, la synthèse de l'IMER reste à optimiser, notamment la synthèse du monolithe. Les résultats sont toutefois très prometteurs, en particulier par rapport aux monolithes organique puisque les interactions non spécifiques hydrophobes sont limitées.

Parallèlement, l'analyse d'un digestat de cytochrome *c* a été mise au point par nanoLC/MS, l'objectif étant d'y coupler en ligne l'IMER miniaturisé. De nouveau, l'outil de quantification a pu être utilisé. Un gain en sensibilité au minimum d'un facteur 600 a pu être observé par rapport à une analyse en format conventionnel.

V.5. Références

[1] J. Krenkova, Z. Bilkova, F. Foret, *J. Sep. Sci.* 28 (2005) 1675.
[2] J. Krenkova, N.A. Lacher, F. Svec, *Anal. Chem.* 81 (2009) 2004.
[3] T.R. Besanger, R.J. Hodgson, J.R.A. Green, J.D. Brennan, *Anal. Chim. Acta* 564 (2006) 106.
[4] R.J. Hodgson, Y. Chen, Z. Zhang, D. Tleugabulova, H. Long, X. Zhao, M. Organ, M.A. Brook, J.D. Brennan, *Anal. Chem.* 76 (2004) 2780.
[5] M. Kato, K. Sakai-Kato, H.M. Jin, K. Kubota, H. Miyano, T. Toyo'oka, M.T. Dulay, R.N. Zare, *Anal. Chem.* 76 (2004) 1896.
[6] J. Ma, Z. Liang, X. Qiao, Q. Deng, D. Tao, L. Zhang, Y. Zhang, *Anal. Chem.* 80 (2008) 2949.
[7] S. Hjertén, *J. Chromatogr., A* 347 (1985) 191.
[8] G.J.d.A. Soler-Illia, C. Sanchez, B. Lebeau, J. Patarin, *Chem. Rev.* 102 (2002) 4093.
[9] C. Rottman, G. Grader, Y. De Hazan, S. Melchior, D. Avnir, *J. Am. Chem. Soc.* 121 (1999) 8533.
[10] G.J.d.A.A. Soler-Illia, C. Sanchez, B. Lebeau, J. Patarin, *Chemical Reviews* 102 (2002) 4093.
[11] M. Halder, *The chemical Educator* 12 (2007) 33.
[12] L. Yan, Q. Zhang, J. Zhang, L. Zhang, T. Li, Y. Feng, L. Zhang, W. Zhang, Y. Zhang, *Journal of Chromatography A* 1046 (2004) 255.

CONCLUSION ET PERSPECTIVES

L'objectif premier de cette étude était la mise au point d'une méthode d'analyse rapide et ciblée d'une protéine à partir de fluides biologiques par immunoaffinité couplée en ligne à une digestion sur support d'enzymes immobilisées (IMER) et analyse par LC-MS/MS. Compte tenu de la complexité du système à développer, le cytochrome *c* a été choisi comme protéine modèle pour la mise au point d'un tel système.

Dans un premier temps, la digestion en ligne en réacteur enzymatique a été développée par immobilisation covalente de la trypsine sur un support solide. Un outil simple et rapide de caractérisation a été utilisé afin d'élaborer un IMER performant. Lors de l'application de l'IMER à la digestion en ligne du cytochrome *c*, un outil de quantification de la protéine basé sur la réponse de deux peptides spécifiques de la protéine a été développé. Après optimisation de ce microréacteur, les conditions de synthèses ont été appliquées à la préparation d'un autre réacteur enzymatique à base de pepsine. Ainsi, cette étude a démontré les nombreux avantages de la digestion en ligne sur supports d'enzymes immobilisées par rapport à la digestion en solution, en particulier en termes de temps de digestion.

Dans un second temps, un support d'extraction sélectif à base d'anticorps a été développé afin d'éliminer les interférents d'un échantillon aussi complexe que le plasma gênant l'analyse d'une protéine ciblée. Ainsi, après avoir mis au point la procédure d'immunoextraction, l'immunoadsorbant a été caractérisé en termes de capacité. Sa sélectivité vis-à-vis du cytochrome c a été également démontrée. Le couplage de l'IS avec le réacteur enzymatique a pu ensuite être réalisé. L'élution de la protéine de l'immunoadsorbant étant réalisée à pH acide, le couplage avec la pepsine active à faible pH a été proposé. De très bons résultats en termes de rendement et de répétabilité ont été obtenus et ont été clairement confirmés par l'analyse totale en ligne de la protéine modèle à un échantillon complexe, le plasma.

Ces résultats prometteurs ont permis d'envisager la miniaturisation de la totalité du système analytique permettant une diminution du volume d'échantillon et aussi du coût de synthèse des supports immobilisés. Face à la complexité de l'étude, l'analyse chromatographique a tout d'abord été miniaturisée, seule en format micro puis en format capillaire couplée à une détection UV. La sensibilité a été évaluée sur des peptides spécifiques du cytochrome *c* et malgré une détection UV par rapport une détection MS utilisée en format conventionnel, un gain en sensibilité a été obtenu démontrant le potentiel d'un système

miniaturisé. Le couplage entre l'IS et l'IMER conservés en format conventionnel, avec l'analyse par capLC-UV a confirmé la grande sélectivité de l'immunoadsorbant et le bon rendement global de la méthode mise au point.

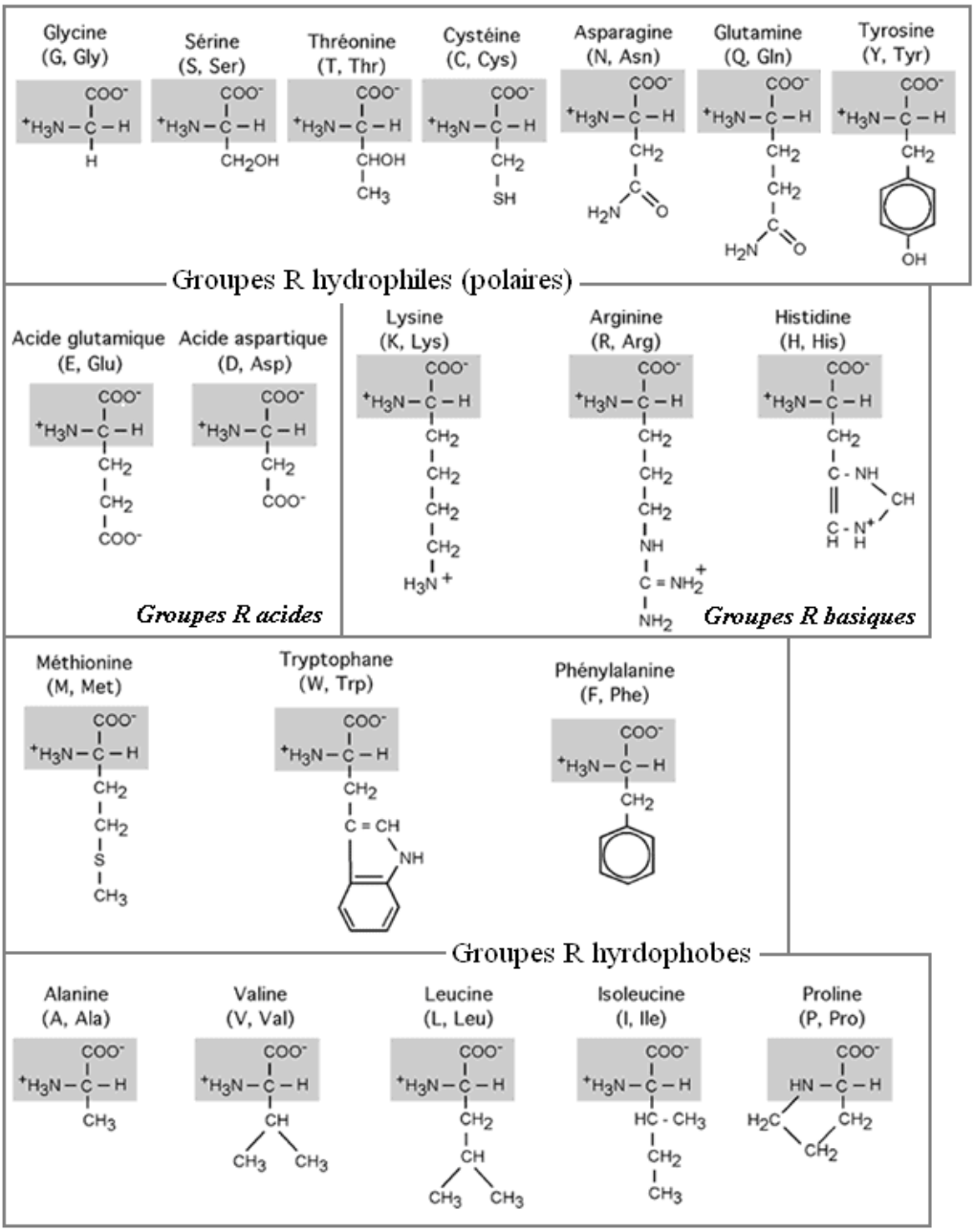
Compte tenu des grandes capacités des réacteurs développés, la miniaturisation des étapes d'immunoextraction et de digestion enzymatique a ensuite été envisagée. Grâce à l'outil simple de caractérisation développé, un réacteur de trypsine en format miniaturisé a été synthétisé puis évalué. A cet effet, un monolithe de silice a été synthétisé *in-situ* dans un capillaire de 100 µm avec immobilisation par liaison covalente de la trypsine sur le monolithe activé. Les performances de cet IMER ont été démontrées avec le substrat de faible masse moléculaire puisqu'un rendement de digestion similaire à celui trouvé en format conventionnel a été obtenu. Toutefois, la synthèse du monolithe reste encore à maîtriser et le taux de greffage de la trypsine sur l'IMER reste à optimiser avant d'envisager son application à la digestion de protéines.

Le grand potentiel de ces monolithes nous encourage à poursuivre leur développement, en particulier pour la synthèse d'un réacteur de pepsine et d'un immunoadsorbant en vu d'un couplage à l'analyse par nano-LC-MS/MS. Dans cette optique, l'analyse d'un digestat du cytochrome *c* a été parallèlement mise au point en format nanoLC chip-MS via une puce intégrant l'étape de préconcentration, l'étape de séparation et une pointe nanospray pour le couplage avec la spectrométrie de masse.

Enfin, cette étude présente une avancée vers l'intégration de l'immunoextraction couplée à la digestion enzymatique dans des microsystèmes puisque le procédé de synthèse du monolithe dans le microsystème est fondé sur le même principe à savoir le prétraitement des canaux, la polymérisation *in-situ* puis l'immobilisation des biomolécules. Ainsi, la poursuite de la synthèse et la caractérisation de supports bioanalytiques monolithiques est essentielle afin de développer un système d'analyse d'une protéine ciblée totalement miniaturisé. Ces dispositifs devront être évalués sur d'autres protéines d'intérêt. Si cette première approche sur une protéine modèle est très satisfaisante, l'adaptation à d'autres protéines endogènes nécessitera la prise en compte d'autres contraintes comme l'ajout d'étapes de réduction / alkylation nécessaires à une digestion efficace.

ANNEXES

Annexe 1 : Classification, noms et structures des 20 acides aminés



Annexe 2 : Conditions de séparation chromatographique en format conventionnel et analyse par spectrométrie de masse

a) Description de la chaîne d'analyse

Les analyses ont été effectuées avec une chaîne HPLC Agilent 1100 comprenant :

-une pompe binaire

-un dégazeur

- un passeur

-un four à colonne thermostaté

-un détecteur UV-visible à barrette de diode (DAD)

- un logiciel d'acquisition Chemstation

- un spectromètre de masse

b) Analyse du cytochrome *c* après digestion trypsique :

La colonne utilisée pour la séparation des peptides est une colonne de silice C_{18} (150 x 3 mm d.i.) avec une phase mobile constituée d'eau et d'acétonitrile acidifiée à 0,1 % par de l'acide formique. Le débit de la phase mobile est de 400 $\mu L.min^{-1}$.

Temps (minutes)	H_2O + 0,1 % HCOOH (%)	MeCN + 0,1 % HCOOH (%)
0	90	10
20	10	90
30	10	90

c) Analyse du cytochrome c après digestion par la pepsine :

La colonne utilisée pour la séparation des peptides et la phase mobile sont les mêmes que pour la digestion trypsique, il s'agit d'une colonne de silice C_{18} (150 x 3 mm d.i.) avec une phase mobile constituée d'eau et d'acétonitrile acidifiée à 0,1 % par de l'acide formique. Le débit est de 400 $\mu L.min^{-1}$.

Temps (minutes)	H_2O + 0,1 % HCOOH (%)	MeCN + 0,1 % HCOOH (%)
0	98	2
20	60	40
25	20	80

d) Paramètre d'acquisition du spectromètre de masse pour la détection du cytochrome *c* :

Le spectromètre de masse est un piège à ions 1100 type SL de chez Agilent. Il est doté d'une source électrospray. Le logiciel d'acquisition est MSD Trap. Les paramètres de la source et du spectromètre de masse sont les suivants :

Source : électrospray

- Gaz nébuliseur (N_2) : 40 psi
- Gaz séchant : 10 $L.min^{-1}$
- Température de la source : 350°C

Acquisition :

Mode positif :

- Skimmer : 40V
- Cap Exit : 130V
- Trap Drive : 75-80
- Capillary : 4000V
- End plate : 500

Mode : auto MS^2

- Nombre précurseurs : 2
- Threshold Abs : 10000
- Threshold Rel. : 5%
- Active exclusion : après trois spectres, pendant 1 minute
- MS/MS fragmentation : 1.3V avec Smart-Frag activé (50-200%)

Paramètre du piège à ions :

- Acquisition de 50 à 2200 (*m/z*, average : 4)
- Target : 30000
- Max.accu.Time : 150 ms

Annexe 3 : Conditions de digestion en solution du cytochrome *c* par la trypsine et la pepsine

a) Protocole de digestion en solution trypsique de 100 ng.µL^{-1} de cytochrome *c*

Echantillon	1 mL d'une solution de tampon Tris (50 mmol.L^{-1}, pH 8), 10 mmol.L^{-1} $CaCl_2$, 0,1 mg.mL^{-1} de cytochrome *c*.
Enzyme	22 µL d'une solution de tampon Tris (50 mmol.L^{-1}, pH 8) à 200 ng.µL^{-1} de trypsine (traitée TPCK)
Ratio E/S	1/50
Conditions de digestion	37°C, 16 heures

b) Protocole de digestion en solution par la pepsine de 250 ng.µL^{-1} de cytochrome *c*

Echantillon	1 mL d'une solution de tampon Tris (50 mmol.L^{-1}, pH 8), 10 mmol.L^{-1} $CaCl_2$, 0,25 mg.mL^{-1} de cytochrome *c*.
Enzyme	29 µL d'une solution d'acide formique (pH 2) à 1 µg.µL^{-1} de pepsine
Ratio E/S	1/25
Conditions de digestion	37°C, 16 heures

Les solutions de cytochrome *c* et d'enzyme sont mélangées, agitées au vortex pendant une dizaine de seconde puis incubées. La digestion est stoppée en effectuant une trempe. Les digestats sont conservés à -20 °C.

Annexe 4 : Paramètres utilisés pour la reconnaissance du cytochrome *c* par le logiciel MASCOT

a) Traitement du spectre de collision

Le logiciel MASCOT fonctionne via un fichier de données comportant toutes les masses des peptides détectés par le spectromètre de masse en mode MS/MS. Le protocole d'obtention de ce fichier est le suivant :

- Sélectionner la gamme de temps de rétention dans chromatogramme
- Dans Find / Parameters / autoMS(n) : le paramètre Intensity threshold a été fixé à 20 000 et le paramètre retention time window à 0,7 min
- Activer Find compounds, auto MS(n)
-Sélectionner les composés et File/export : exporter les masses en fichier .mgf

b) Utilisation de Mascot

MASCOT a besoin d'une série d'informations afin d'identifier au plus juste la protéine. Le site d'a ccès libre au logiciel MASCOT est : www.**matrixscience**.com / **Mascot** / **MS/MS Ion Search**. Puis, les paramètres utilisés sont décrits ci-dessous :

Database : **Swissprot**
Enzyme : **Trypsin / pepsinA**
Taxonomy : all entries
Missed cleavage : 1
Peptide tol. : 1.2 Da
MS/MS tol. : 0.6 Da
Peptide charge 1+, 2+, 3+
Instrument : **ESI-trap**

Si MASCOT reconnait le cytochrome *c*, le logiciel indique le **recouvrement de séquence (%)** et les **peptides identifiés.**

Annexe 5 : Rapport MASCOT obtenu après digestion trypsique en solution de 5 µg cytochrome *c*

{MATRIX SCIENCE} Mascot Search Results

Protein View

Match to: **CYC_HORSE** Score: **398**
Cytochrome c OS=Equus caballus GN=CYCS PE=1 SV=2
Found in search of 61206-03.mgf

Nominal mass (M_r): **11825**; Calculated pI value: **9.59**
NCBI BLAST search of CYC_HORSE against nr
Unformatted sequence string for pasting into other applications

Taxonomy: Equus caballus

Cleavage by Trypsin: cuts C-term side of KR unless next residue is P
Sequence Coverage: **77%**

Matched peptides shown in **Bold Red**

```
     1 MGDVEKGKKI FVQKCAQCHT VEKGGKHKTG PNLHGLFGRK TGQAPGFTYT
    51 DANKNKGITW KEETLMEYLE NPKKYIPGTK MIFAGIKKKT EREDLIAYLK
   101 KATNE
```

Show predicted peptides also

Sort Peptides By ◉ Residue Number ○ Increasing Mass ○ Decreasing Mass

Start - End	Observed	Mr(expt)	Mr(calc)	Delta	Miss	Sequence
9 - 14	381.8600	761.7054	761.4800	0.2255	1	K.KIFVQK.C (Ions score 19)
10 - 14	634.4400	633.4327	633.3850	0.0477	0	K.IFVQK.C (Ions score 24)
10 - 23	545.5400	1633.5982	1632.8116	0.7866	1	K.IFVQKCAQCHTVEK.G (Ions score 10)
10 - 23	817.8900	1633.7654	1632.8116	0.9538	1	K.IFVQKCAQCHTVEK.G (Ions score 21)
29 - 39	585.0300	1168.0454	1167.6149	0.4305	0	K.TGPNLHGLFGR.K (Ions score 51)
29 - 39	390.4500	1168.3282	1167.6149	0.7133	0	K.TGPNLHGLFGR.K (Ions score 33)
40 - 54	800.0300	1598.0454	1597.7736	0.2718	1	R.KTGQAPGFTYTDANK.N (Ions score 27)
40 - 54	533.8700	1598.5882	1597.7736	0.8145	1	R.KTGQAPGFTYTDANK.N (Ions score 15)
41 - 54	736.0800	1470.1454	1469.6787	0.4668	0	K.TGQAPGFTYTDANK.N (Ions score 34)
57 - 73	1041.4900	2080.9654	2080.0186	0.9468	1	K.GITWKEETLMEYLENPK.K (Ions score 50)
62 - 73	499.2000	1494.5782	1494.6912	-0.1130	0	K.EETLMEYLENPK.K (Ions score 8)
62 - 73	1495.6500	1494.6427	1494.6912	-0.0484	0	K.EETLMEYLENPK.K (Ions score 13)
62 - 73	748.6600	1495.3054	1494.6912	0.6143	0	K.EETLMEYLENPK.K (Ions score 41)
62 - 74	812.5500	1623.0854	1622.7861	0.2993	1	K.EETLMEYLENPKK.Y (Ions score 50)
74 - 80	806.5300	805.5227	805.4698	0.0530	1	K.KYIPGTK.M (Ions score 26)
74 - 80	403.9000	805.7854	805.4698	0.3157	1	K.KYIPGTK.M (Ions score 13)
81 - 88	454.3800	906.7454	906.5361	0.2094	1	K.MIFAGIKK.K (Ions score 33)
93 - 100	482.7800	963.5454	963.5277	0.0178	0	R.EDLIAYLK.K (Ions score 20)
93 - 100	482.7800	963.5454	963.5277	0.0178	0	R.EDLIAYLK.K (Ions score 17)
93 - 100	964.6100	963.6027	963.5277	0.0751	0	R.EDLIAYLK.K (Ions score 21)

Annexe 6 : Synthèse des IMERs à base de trypsine

Différents réacteurs de trypsine immobilisée ont été préparés par immobilisation covalente de trypsine sur des supports variés tels que la Sépharose activée CNBr, la Sépharose activée NHS et la silice activée glutaraldéhyde. L'immobilisation de la trypsine sur les supports de silice glutaraldéhyde [167] et de Sépharose activée [245] a été réalisée selon les procédures décrites par le laboratoire pour l'immobilisation d'anticorps. Chaque support a été conditionné dans une précolonne (20 x 2 mm d.i.).

a) Immobilisation de la trypsine sur le support de silice activée glutaraldéhyde

30 mg de silice activée glutaraldéhyde ont successivement été lavés par 1 mL d'une solution de KPB–NaCl et 1 mL d'une solution de KPB. Puis, 0,1 ou 1 mg de trypsine dans 1 mL d'une solution de PBS ont été ajoutés à la silice et incubés durant 30 heures à 4°C. Puis, après avoir éliminé le surnageant, 1 mL d'une solution de KPB–NaCl a été ajouté et la réaction est interrompue en ajoutant une quantité de $NaBH_3CN$ correspondant à une pointe de spatule. Après une nuit à 4 °C, les supports de silice préparés avec 0,1 et 1 mg de trypsine ont été conditionnés en précolonne et sont nommés Silice-T (0,1) et Silice-T (1) respectivement. Les IMERs ainsi développés sont connectés à une pompe de préconcentration LC-10AS (Shimadzu) pour les étapes de lavage. La silice immobilisée est lavée successivement par 5 mL à 0.5 mL min^{-1} d'une solution de KPB, une solution de KPB–NaCl puis un mélange KPB-éthylène glycol (90/10, v/v). Les fonctions aldéhyde non liées du support ont été bloquées par une solution d'éthanolamine (0.2 $mol.L^{-1}$) pendant 2 heures. Puis l'IMER a été lavé par une solution de KPB puis est conservé dans une solution de PBS contenant 0,1 % d'azide à 4°C.

Conditions des tampons de pH 7 pour un litre :

- KPB : 6,75 g de K_2HPO_4 + 8,34 g de KH_2PO_4 + 5,8 g de NaCl
- PBS : 1,089 g de Na_2HPO_4, 2 H_2O + 0,525 g de KH_2PO_4 + 8,764 g de NaCl

b) Immobilisation de la trypsine sur le support de Sépharose CNBr

Après lavage et gonflement de 25 mg de Sépharose activée CNBr dans 1 mL d'HCl (10^{-3} mol L^{-1}) puis 1 mL de tampon de couplage ($NaHCO_3$ 0.1 mol L^{-1}, NaCl 0.5 mol L^{-1}, pH 8.3), 0,1 et 1 mg de trypsine dans 1 mL de la solution de couplage ont été incubés durant 16 heures à 4°C. Les supports ont été conditionnés dans des précolonnes de 20 x 2 mm d.i. et sont nommés Séph(CNBr)-T (1) et Séph(CNBr)-T (0,1). Les sites de fixation non liés à la

trypsine sont bloqués par percolation d'une solution de tampon Tris 50 mmol.L^{-1} (pH 8) à 0.5 mL min^{-1} pendant 2 h à température ambiante. Ensuite, le gel a été lavé alternativement avec une solution à pH faible (tampon acétate 0.1 mol.L^{-1}, 0.4 mol.L^{-1} NaCl, pH 4) et de pH plus élevé (tampon de couplage, pH 8.3) pendant 10 minutes à 0.5 mL min^{-1} pour éliminer les enzymes non liées. Finalement, les IMERs sont conservés à 4 °C dans une solution de PBS à 0,1 % d'azide.

c) Immobilisation de la trypsine sur le support de Sépharose NHS

La procédure d'immobilisation de la trypsine sur le support de Sépharose activée NHS est similaire à celle de la Sépharose activée CNBr. Toutefois, le gel de Sépharose NHS étant déjà gonflé et conditionné dans de l'isopropanol, le gel est tout d'abord rincé par 1 mL d'une solution de HCl (10^{-3} mol.L^{-1}) avant l'incubation du tampon de couplage contenant la trypsine. Le volume de gel utilisé pour l'immobilisation de la trypsine est le même que celui correspondant à 25 mg de Sépharose activée CNBr gonflé.

Annexe 7 : Synthèse des IMERs à base de pepsine

Le protocole d'immobilisation de la pepsine a été adapté du protocole décrit par Kurimoto *et al.* [201]. Différentes quantités de pepsine entre 0,25 et 5 mg de pepsine dans 1 mL de la solution de couplage (CH_3CO_2Na, 0.1 $mol.L^{-1}$, pH 5.8, NaCl 0.5 $mol.L^{-1}$) ont été ajoutées à 25 mg de Sépharose activée CNBr préalablement gonflée par 1 mL de HCl 1 $mmol.L^{-1}$ (pH 3) et lavée par 1 mL de tampon de couplage. La solution de pepsine a ensuite été incubée durant toute une nuit à 4°C. La plupart des supports immobilisés ont été utilisés pour évaluer le taux de greffage de la pepsine. Les gels immobilisés par 1 et 5 mg de pepsine ont ensuite été conditionnés en précolonne (20 × 2 mm.d.i.) et sont nommés Séph-P (1) et Séph-P (5) respectivement. Les sites actifs du gel non liés sont bloqués par passage d'une solution de glycine 0,2 $mol.L^{-1}$, pH 5 à 0,5 $mL.min^{-1}$ pendant 2 h. Puis, le gel immobilisé est lavé successivement par 5 mL du tampon de couplage puis par 5 mL de HCl 1 $mmol.L^{-1}$, contenant NaCl 0,5 $mol.L^{-1}$ à 0,5 $mL.min^{-1}$. La procédure de lavage est répétée trois fois. Finalement, les IMERs de pepsine ont été stockés à 4°C dans une solution d'acide formique HCOOH à pH 2.

Annexe 8 : Synthèse des immunoadsorbants

L'immobilisation des anticorps monoclonaux (anti-cytochrome c) sur la Sépharose activée par le bromure de cyanogène a été réalisée selon un procédé déjà utilisé au laboratoire. 35 mg de sepharose activée CNBr sont gonflés par 1 mL de HCl 1 mmol.L^{-1}, puis lavés par 1 mL d'une solution de $NaHCO_3$ 0,1 mol.L^{-1}, NaCl 0,5 mol.L^{-1} de pH 8,3. 100 µg d'anticorps dilués dans 100 µL de PBS sont ajoutés à la Sepharose et incubés durant toute une nuit à 4 C°. Une fois le support greffé, il est conditionné en précolonne (20 x 2 mm d.i. ou 20 x 1 mm d.i.). Les autres sites actifs du support non couplés aux anticorps sont ensuite bloqués par passage d'une solution tampon Tris 0,1 mol.L^{-1} à pH 8 à (0,5 mL.min^{-1} ou 0,1 mL.min^{-1}) pendant 2 heures à température ambiante. Puis le support greffé a été lavé alternativement par un tampon à pH faible (acétate 0,1 mol.L^{-1}, NaCl 0,4 mol.L^{-1}, pH 4) et un tampon de pH élevé ($NaHCO_3$ 0,1 mol.L^{-1}, NaCl 0,5 mol.L^{-1}, pH 8,3). Cette étape de lavage est répétée trois fois. Enfin, l'immunoadsorbant est stocké à 4°C dans une solution de PBS contenant 0,1 % d'azide.

Annexe 9 : Analyse par micro-LC et cap-LC

a) Chaîne chromatographique utilisée

Chaîne Ultimate 3000 (Dionex) en modes µLC ou capLC, contenant :
- Pompe de préconcentration, 3 voies, débits minimum : 1 $\mu L.min^{-1}$
- Pompe analytique, 3 voies, équipée d'un diviseur de débit :
  - µ-LC (1:6)
  - cap-LC (1:15)
- Four à colonne
- Ultimate™ UV Detector 4 longueurs d'onde, cellule en Z :
  - Cellule 180 nL en µ-LC
  - Cellule 45 nL en cap-LC
- Logiciel d'acquisition : Chromeleon®

b) Analyse d'un digestat à la pepsine de cytochrome *c* par µ-LC

La colonne utilisée pour la séparation des peptides est une colonne de silice C_{18} (150 x 1 mm d.i.) (Acclaim®PepMap™, 100 Å, 3 µm) avec une phase mobile constituée d'eau et d'acétonitrile acidifiée à 0,1 % par de l'acide formique. Le débit est de 50 $\mu L.min^{-1}$.

Temps (minutes)	H_2O + 0,1 % HCOOH (%)	MeCN + 0,1 % HCOOH (%)
0	95	5
25	75	15
27	10	90
37	10	90

c) Analyse d'un digestat à la pepsine de cytochrome *c* par cap-LC

La colonne utilisée pour la séparation des peptides est une colonne de silice C_{18} (150 x 0,3 mm d.i.) (Acclaim®PepMap™, 100 Å , 3 µm) avec une phase mobile constituée d'eau et d'acétonitrile acidifiée à 0,1 % par de l'acide formique. Le débit est de 4 $\mu L.min^{-1}$.

Temps (minutes)	H_2O + 0,1 % HCOOH (%)	MeCN + 0,1 % HCOOH (%)
0	95	5
30	75	015
32	10	90
42	10	90

d) Analyse du BA*p*NA et du *p*-NA par cap-LC

La colonne utilisée pour la séparation des peptides est une colonne de silice C_{18} (150 x 0,3 mm d.i.) (Acclaim®PepMap^{TM}, 100 Å, 3 µm) avec une phase mobile constituée de tampon phosphate 5 mmol.L^{-1} (pH 7) et d'acétonitrile. Le débit est de 4 µL.min^{-1}.

Temps (minutes)	**Tampon phosphate pH 7 (%)**	**MeCN (%)**
0	70	30
10	50	50
12	10	90
22	10	90

e) Analyse d'un digestat trypsique de cytochrome c par cap-LC

La colonne utilisée pour la séparation des peptides est une colonne de silice C_{18} (150 x 0,3 mm d.i.) (Acclaim®PepMap^{TM}, 100 Å, 3 µm) avec une phase mobile constituée d'eau et d'acétonitrile acidifiée à 0,1 % par de l'acide formique. Le débit est de 4 µL.min^{-1}.

Temps (minutes)	**H_2O + 0,1 % HCOOH (%)**	**MeCN + 0,1 % HCOOH (%)**
0	95	5
20	50	50
22	10	90
32	10	90

Annexe 10 : Synthèse du réacteur de trypsine en format capillaire*

a) Activation du capillaire

L'étape de prétraitement du capillaire est réalisée en mode hydrodynamique. Le capillaire de 20 cm de long est placé dans un flacon de 2 mL contenant la solution à introduire, surélevé d'une dizaine de centimètres par rapport à un flacon vide disposé à l'autre extrémité du capillaire. Le tableau ci-dessous résume les différentes étapes.

Etape	Durées
HCl 0,2 mol.L^{-1}	30 min
H_2O	5 min
NaOH 1 mol.L^{-1}	2 h
H_2O	5 min
MeOH	30 min
Séchage sous azote à 160 °C	3 h

b) Synthèse du monolithe

Dans un premier temps, les réactifs sont mélangés dans un flacon de 2 mL. Ce mélange contient 8 mg de CTAB, 215 µL d'EtOH anhydre, 112 µL de TEOS, 118 µL d'APTES et 32 µL d'eau. Il est agité durant 15 à 30 secondes avant d'être introduit dans le capillaire de 100 µm d.i. prétraité. L'introduction de la solution de précurseurs doit être rapide et a été réalisée grâce à une seringue ou par capillarité, comme décrit ci-dessus. Le capillaire est ensuite bouché aux deux extrémités puis placé à 40 °C dans un four durant 24 heures, temps durant lequel le monolithe se forme et est séché. A ce stade de la synthèse, seul un capillaire rempli de 5 cm de longueur est conservé. Afin d'éliminer le surfactant, de l'éthanol est percolé à travers le capillaire durant 30 minutes à 500 nL.min^{-1} grâce à la micropompe 350 (Gilson), puis le monolithe est rincé à l'eau durant 30 minutes.

c) Activation du monolithe

L'activation du monolithe a été réalisée par un appareil d'électrophorèse capillaire. L'entrée du capillaire est alors placée dans un premier flacon contenant la solution à percoler et la sortie est connectée à un flacon servant de poubelle. En appliquant une pression constante de 8 bars, une solution de 10 % de glutaraldéhyde dans du tampon phosphate 100 mmol.L^{-1} (pH 8) est percolée durant 6 heures pour activer les groupements amine du monolithe. Puis, de la même façon, une solution de trypsine préparée à 2 mg.mL^{-1} dans le

tampon phosphate (pH 8) contenant 50 $mmol.L^{-1}$ de benzamidine afin de prévenir de l'autolyse de la trypsine et 5 $mg.mL^{-1}$ de cyanoborohydrure de sodium ($NaCNBH_3$) afin de stabiliser la liaison avec la trypsine est percolée durant 24 heures. Après rinçage de la trypsine non immobilisée par le tampon phosphate (pH 8) contenant 20 % d'acétonitrile, les sites non couplés aux enzymes sont bloqués par une solution de tampon Tris concentrée à 1 $mol.L^{-1}$ pendant 2 heures. Le réacteur de trypsine ainsi obtenu est conservé à 4°C dans une solution de tampon tris 50 $mmol.L^{-1}$ (pH 7,5) contenant 10 $mmol.L^{-1}$ de $CaCl_2$.

** J. Ma, Z. Liang, X. Qiao, Q. Deng, D. Tao, L. Zhang, Y. Zhang, Anal. Chem. 80 (2008) 2949.*

Annexe 11 : Microscopie à balayage électronique

a) Principe

La microscopie électronique à balayage (MEB ou SEM pour *Scanning Electron Microscopy*) est une technique de microscopie basée sur le principe des interactions électrons-matière.

Un faisceau d'électrons est projeté sur l'échantillon à analyser. L'interaction entre les électrons et l'échantillon génère des électrons secondaires, de basse énergie qui sont accélérés vers un détecteur d'électrons secondaires qui amplifie le signal. A chaque point d'impact correspond ainsi un signal électrique. L'intensité de ce signal électrique dépend à la fois de la nature de l'échantillon au point d'impact qui détermine le rendement en électrons secondaires et de la topographie de l'échantillon au point considéré. Il est ainsi possible, en balayant le faisceau sur l'échantillon, d'obtenir une cartographie de la zone balayée. Dans la pratique, les MEB actuels permettent d'atteindre une résolution de l'ordre de 20 nm et un grossissement qui peut aller jusqu'à 3×10^5 fois.

Les observations MEB reproduites dans ce rapport ont été réalisées au Laboratoire Colloïdes et Matériaux Divisés de l'ESPCI. L'appareil utilisé dans le cadre de notre étude est le MEB S-3600 N (Hitachi). La résolution maximale est de 3 nm à 25 kV. La tension d'accélération peut varier de 0,3 kV à 30 kV.

b) Préparation des échantillons

La qualité des images obtenues au MEB dépend de la qualité de l'échantillon analysé. Celui-ci doit être absolument propre, de dimension inférieure au centimètre et surtout, il doit être conducteur afin de pouvoir évacuer les électrons. Les monolithes synthétisés sont des matériaux isolants. Une étape de métallisation est donc nécessaire avant toute observation au MEB.

Une pastille de carbone adhésive (d = 7 mm) est collée sur un support métallique et une petite section du capillaire y est déposé. L'échantillon est ensuite métallisé en appliquant une couche d'or d'une épaisseur voisine de 2,5 nm. La métallisation est réalisée à l'aide d'un appareil Polaron 550 sous vide et sous balayage d'argon ce qui permet d'obtenir un dépôt d'épaisseur homogène et contrôlée sur toute la surface des échantillons.

Annexe 12 : Analyse par HPLC-Chip/MS

a) Description de la chaîne d'analyse

La chaîne analytique Agilent utilisée pour les analyses par HPLC-Chip/MS comprend :

-une pompe capillaire binaire 1200 Series

-une nano-pompe binaire 1200 Series

- un dégazeur

- un passeur

-une interface « ChipCube » contenant la puce analytique

- un logiciel d'acquisition Chemstation

- un spectromètre de masse

b) Conditions de séparation

La puce analytique intégre une précolonne d'enrichissement d'échantillon (40 nL) connectée à une vanne de commutation 6 voies et une colonne de séparation (43 mm x 75 µm) directement terminée par une pointe « nanospray ». La phase stationnaire constituant la puce utilisée est une silice greffée C_{18} de diamètre 5 µm et de 300 Å de porosité.

La phase mobile utilisée est constituée d'eau et d'acétonitrile acidifiée à 0,1 % par de l'acide formique. L'échantillon est transféré sur la précolonne d'enrichissement par 5 µL à 4 $\mu L.min^{-1}$ d'un mélange H_2O/MeCN (98/2) acidifié à 0,1 % HCOOH. Puis l'échantillon est élué par la phase mobile vers la colonne de séparation à 300 $nL.min^{-1}$, le gradient de phase mobilie utilisé est décrit dans le tableau ci-dessous.

Temps (minutes)	H_2O + 0,1 % HCOOH (%)	MeCN + 0,1 % HCOOH (%)
0	95	5
30	75	15
35	20	80

c) Conditions d'analyse par spectrométrie de masse

Comme précédemment, le spectromètre de masse est un piège à ions 1100 type SL de chez Agilent. Le logiciel d'acquisition est MSD Trap. Les paramètres de la source d'ionisation et du spectromètre de masse sont les suivants :

Source :

- Gaz séchant : 4 $L.min^{-1}$
- Température de la source 300°C
- Tension de capillaire : 1850 V à 5 % de MeCN, la tension est diminuée de 50 V toutes les 6 minutes en suivant le gradient en acétonitrile.

Les paramètres d'acquisition du piège à ions sont les mêmes que ceux décrits précédemment en annexe 2.

LISTE DES TABLEAUX

Chapitre I

Tableau I-1 : Principaux constituants du plasma humain [2]. 7
Tableau I-2 : Principales performances des analyseurs, adapté de [65] 30

Chapitre II

Tableau II- 1 : Exemples d'immunoextractions développées pour l'analyse des protéines dans des matrices biologiques. 61
Tableau II-2 : Liste des supports particulaires en formats conventionnels immobilisés par des enzymes. 82
Tableau II-3 : Liste des supports particulaires en formats miniaturisés immobilisés par des enzymes. 93
Tableau II-4 : Liste des supports monolithiques organiques greffés par des enzymes. 98
Tableau II-5 : Liste des supports monolithiques sol-gel utilisés pour l'immobilisation d'enzymes en format miniaturisé. 103

Chapitre III

Tableau III-1: Liste des peptides d'autolyse de la trypsine détectés après digestion en solution. 122
Tableau III-2 : Peptides identifiés par MASCOT après 3 digestions en solution à la trypsine (E/S : 1/50) de 5 µg de cytochrome c (50 µL injecté). L'analyse par LC-MS/MS a été répétée 2 fois pour chaque digestat. 123
Tableau III-3 : Peptides identifiés après analyse LC-MS/MS de 4 digestats à la pepsine de 5 µg de cytochrome c (20 µL injecté). 129
Tableau III-4 : Protocole de digestion et analyse en ligne du cytochrome c sur la colonne de trypsine StyrosZyme™ 133
Tableau III-5 : Description des différents microréacteurs enzymatiques utilisés. 139
Tableau III-6 : Protocole de digestion et analyse en ligne du BApNA sur les IMERs de trypsine préparés au laboratoire. 144
Tableau III-7 : Quantité de trypsine immobilisée, densité et taux de greffage après immobilisation de 1 mg de trypsine sur trois supports différents .nd : non déterminé. 153
Tableau III-8 : Protocole de digestion et analyse en ligne du cytochrome c sur les IMERs de trypsine préparés au laboratoire. 159
Tableau III-9 : Conditions de digestion en ligne du cytochrome c sur un IMER de pepsine. 166

Chapitre IV

Tableau IV-1 : Protocole d'extraction sélectif du cytochrome c sur l'immunoadsorbant anti-cytochrome c à base de silice activée glutaraldéhyde (100 µg d'anticorps sur 30 mg de silice activée) [5]. 184
Tableau IV-2 : Protocoles d'extraction sélectifs du cytochrome c sur l'IS 1 et sur l'IS 2. 185
Tableau IV-3 : Protocole d'analyse en ligne du cytochrome c par IS 1-IMER-LC-MS/MS 193
Tableau V-1 : Protocole de digestion du cytochrome c sur IMER de pepsine et analyse en ligne par µ-LC-UV 210
Tableau V-2 : Protocole de digestion du cytochrome c sur IMER de pepsine (1 mm d.i.) et analyse en ligne par cap-LC-UV 218
Tableau V-4 : Peptides identifiés par MASCOT après 3 analyses d'un digestat trypsique (E/S : 1/50) de 10 ng de cytochrome c (1 µL injecté). Sont indiqués, le temps de rétention, les rapports m/z détectés, les charges correspondant, les masses et séquences des peptides détectés, leur position dans la séquence du cytochrome c et la présence ou non d'un site de coupure manqué. 250

LISTE DES FIGURES

Chapitre I

Figure I-1 : Structure des acides L-α-aminés. R correspond aux chaînes latérales.....3
Figure I-2 : Formation d'une liaison peptidique. 4
Figure I-3 : Les quatre niveaux de structures des protéines. 5
Figure I-4 : Abondances de 70 protéines du plasma exprimées sur échelle en logarithme décimal qui s'étend sur 12 ordres de grandeur, d'après [3]. 8
Figure I-5 : Représentation de la gamme dynamique de concentrations des protéines dans le plasma humain [5]. 9
Figure I-6 : Schématisation de l'approche protéomique classique [13]. 11
Figure I-7 : Réaction globale de l'action enzymatique comportant la formation d'un complexe (ES) entre l'enzyme (E) et le substrat (S) qui se décompose ensuite pour donner le produit (P) et l'enzyme. 13
Figure I-8 : Equation de Michaelis-Menten. 13
Figure I-9 : Obtention de peptides à partir d'une protéine par digestion trypsique, [15]. 15
Figure I-10 : Spectres de masse MALDI du cytochrome c après 12 minutes de digestion trypsique (1/25) sans (a) ou avec (b) irradiations micro-ondes [24]. 17
Figure I-11 : Image d'une phase monolithique commerciale, la Chromolith® (Merck) représentant la structure bimodale. 20
Figure I-12 : Analyse d'un mélange de protéines par la méthode MudPIT (« Multidimensional Protein Identification Technology »). 22
Figure I-13 : Schéma du fonctionnement de la source électrospray en mode d'ionisation positive, d'après [50]. 24
Figure I-14 : Représentation schématique de l'émission des ions en phase gazeuse en électrospray d'après le modèle de Dole (a) et le modèle d'Iribarne et Thomson (b). 25
Figure I-15 : Représentation d'une puce-MS Agilent. Adapté de [60]. 27
Figure I-16 : Principe de la désorption / ionisation MALDI [64]. 28
Figure I-17 : Représentation d'un couplage MALDI-TOF en mode réflecteur comportant un système d'extraction retardé (DE)[64] 31
Figure I-18 : Schématisation de la technique SELDI-TOF. 32
Figure I-19 : Schéma du quadripôle à section hyperbolique (en haut) ou cylindrique (en bas) [69]. 33
Figure I-20 : Représentation d'un triple quadripôle. 33
Figure I-21 : Schéma d'un piège à ions [64]. 34
Figure I-22 : Schématisation d'une analyse MS simple dans le piège à ions constituée d'une étape d'accumulation des ions et d'une éjection résonante. Adapté de [70]. 35
Figure I-23 : Schématisation d'une analyse MS^n dans un piège à ions. (1), (2) : accumulation et sélection des ions à fragmenter. (3), (4) : excitation et fragmentation des ions moléculaires. (5) et (6) : accumulation et éjection des fragments. Adapté de [70]. 36
Figure I-24 : Nomenclature des fragmentations peptidiques. 37
Figure I-25 : Représentation schématique de la quantification par spectrométrie de masse avec la technique ICAT. Adapté de [73]. 39
Figure I-26 : principe de l'extraction sur phase solide. D'après [85]. 42
Figure I-27 : Détermination expérimentale du volume de rétention par chromatographie frontale (a) ou par chromatographie d'élution (b) [84]. 44
Figure I-28 : Couplage en ligne de l'extraction sur phase solide avec la chromatographie en phase liquide [84] 46

Chapitre II

Figure II-1 : Représentation schématique d'une molécule d'IgG [15]. 58
Figure II-2 : Principe de la production d'anticorps polyclonaux (A) et monoclonaux (B) [16]. 59
Figure II-3 : Protocole d'immunoextraction. 62
Figure II-4 : Réactions de polymérisation pour la synthèse d'un matériau par le procédé sol-gel. 65
Figure II-5 : Encapsulation de protéines dans un réseau de silice (a) Formation des particules de sol. (b) Introduction de la solution de protéines. (c) Le réseau de silice grandit et commence à encapsuler les protéines. (d) Les protéines sont immobilisées dans le gel [39]. 67
Figure II-6 : Spectres d'émission de la HSA en solution et dans différents matrices de silice sol-gel [45]. 68
Figure II-7 : Représentation de la réaction entre une enzyme et un support activé par du CNBr (a), un aldéhyde (b), un époxyde (c), du carbonyldiimidazole (d) et du NHS (e). 70
Figure II-8 : Chromatogrammes LC-MS représentant les courants ioniques totaux obtenus après immunoextraction, digestion et analyse en ligne d'un échantillon de PBS dopé par de la BSA à 2 µmol/L (en trait plein) et d'un échantillon d'urine dopé par 2,2 µmol / L de BSA (en pointillés) [28]. 73
Figure II-9 : Effet de l'introduction d'une étape de lavage dans une procédure d'immunoextraction sur un échantillon de sérum dopé par la protéine β_2M. Le chromatogramme ionique des deux principaux ions non spécifiquement liés à l'immunoadsorbant avant lavage (A) est comparé à celui après lavage (C). Il en est de même pour les chromatogrammes ioniques correspondant à l'analyte β_2M avant (B) et après lavage (D). Adapté de [23]. 73
Figure II-10 : Courbe de capacité d'un immunoadsorbant anti-BSA obtenue par injection de quantités croissantes de BSA. Aire du pic de BSA en fonction de la quantité injectée. Détection à UV 280 nm. [28] 74
Figure II-11 : Représentation schématique du système analytique couplant un réacteur enzymatique (IMER) à une colonne analytique par l'intermédiaire d'une colonne de piégeage (TC). Adapté de [77]. 78
Figure II-12 : Schéma du réacteur de pepsine intégré à l'électrophorèse capillaire (CE). (a) Introduction des substrats. (b) Digestion enzymatique. (c) Les produits de la digestion sont séparés dans le capillaire par CE [49]. 104
Figure II-13 : Montage couplant un IS, une colonne échangeuse d'ions, un réacteur de trypsine immobilisée et une colonne de piégeage à l'analyse par LC-MS [22]. 108
Figure II-14 : Schéma du procédé d'analyse en ligne couplant l'IS, la Poroszyme®, une colonne de piégeage et une analyse par LC-MS. A : solution de conditionnement de l'IS et de la Poroszyme® (PBS pH 7,4), B : solution de lavage de l'IS (NaCl 0.15M), C : solution d'élution (pH 2,7), D : solution de PBS à pH 10,8 utilisée pour ajuster le pH au niveau du réacteur de trypsine. E et F constituent la phase mobile de la LC-MS [28]. 109

Chapitre III

Figure III-1 : Structure primaire du cytochrome c du cœur de cheval [1]. 116
Figure III-2 : Structure tridimensionnelle du cytochrome c. Adapté de [2]. 116
Figure III-3 : Schéma du montage pour l'analyse d'un digestat par LC-MS/MS. 117
Figure III-4 : Influence du ratio enzyme / substrat (E/S) sur des ions des peptides issus de la digestion trypsique en solution du cytochrome c. Adapté de [3]. 118

Figure III-5 : Influence de la durée de digestion sur l'intensité de trois ions des peptides issus de la digestion trypsique en solution dans un tampon Tris (50 mmol.L^{-1}, pH 8 + 10 mmol.L^{-1} de $CaCl_2$) avec un ratio enzyme / substrat (E/S) de 1/100. Adapté de [3]. 119
Figure III-6 : Résultats obtenus après l'analyse d'un mélange issu de la digestion en solution à la trypsine (E/S : 1/50) de 5 µg de cytochrome c (50 µL injecté). (a) Chromatogramme du courant ionique total (TIC) en mode MS. (b) Spectre de masse obtenu à 11,4 minutes. (c) Spectre de collision de l'ion précurseur de m/z 748,6. 121
Figure III-7 : Chromatogramme de quatre ions extraits du courant ionique total (m/z 736,1, 812,6, 817,5 et 748,6) correspondant à quatre peptides du cytochrome c obtenus après analyse par LC-MS/MS d'un digestat trypsique (E/S : 1/50) de 5 µg de cytochrome c (50 µL injecté). 125
Figure III-8 : Diagramme représentant les aires des pics correspondant aux rapports m/z 736,1 et 748, 6 des deux peptides spécifiques du cytochrome c obtenus après les analyses répétées deux fois de 4 digestions à la trypsine (E/S : 1/50) de 5 µg de cytochrome c (50 µL injecté). 125
Figure III-9 : Aires des deux rapports m/z 736,1 et 748,6 correspondant aux deux peptides spécifiques du cytochrome c en fonction de la quantité de cytochrome c digérée en solution par la trypsine (E/S = 1/50) entre 0,17 et 3,5 nmol. 126
Figure III-10 : Courant ionique total en mode MS obtenu après l'analyse par LC-MS/MS d'un mélange issu de la digestion en solution à la pepsine de 5 µg de cytochrome c. 128
Figure III-11 : Somme des aires des pics correspondant aux différents rapports m/z des deux peptides spécifiques du cytochrome c de masses 1017,5 et 1386,8 Da en fonction de la quantité de cytochrome c digérée en solution par la pepsine (E / S = 1/25) entre 0,34 et 3,5 nmol (20 µL injecté), (n=3). 130
Figure III-12 : Schéma du montage de digestion en ligne sur le réacteur de trypsine comprenant un système de 3 vannes de commutation couplant la boucle d'injection, l'IMER de trypsine, une précolonne de piégeage et la colonne analytique connectée au spectromètre de masse. 131
Figure III-13 : Aires relatives des pics des deux peptides spécifiques du cytochrome c de rapports m/z 736,1 et 748,6 obtenus après digestion en ligne sur la StyrosZyme™ durant 20 minutes en fonction des volumes de transfert appliqués entre la boucle d'injection et le réacteur enzymatique. Débit 100 µL.min^{-1}. 134
Figure III-14 : Aires relatives des deux peptides spécifiques du cytochrome c après digestion de 5 µg de cytochrome c (50 µL) en solution (E/S : 1/50) et en ligne sur la colonne commerciale de trypsine immobilisée StyrosZyme™ (1) (n= 8 pour la digestion en solution, n= 3 sur la StyrosZyme™ (1)). 135
Figure III-15 : Aires relatives des deux peptides spécifiques du cytochrome c après digestion de 5 µg de cytochrome c (50 µL) sur les colonnes commerciales de trypsine immobilisée StyrosZyme™ (1) et StyrosZyme™ (2). 136
Figure III-16 : Aires relatives des deux peptides spécifiques du cytochrome c en fonction du nombre de digestions en ligne sur la colonne StyrosZyme™. 137
Figure III-17 : Greffage covalent d'une enzyme sur le support de silice activée par du glutaraldéhyde et sur les supports de Sépharose activés par du NHS et du CNBr. 138
Figure III-18 : Schéma de la digestion du N-α-Benzoyl-Arginine-p-NitroAnilide (BApNA) par la trypsine. 140
Figure III-19 : Chromatogrammes et spectres obtenus par détection UV à 310 nm et à 380 nm avec un détecteur à barrette de diodes après la séparation d'un mélange de p-NA et de BApNA à 0,05 mmol.L^{-1} (20 µL). 141
Figure III-20 : Principe du montage utilisé pour la digestion du BApNA sur l'IMER de trypsine. 142

Figure III-21 : Aires relatives du BApNA et du p-NA en fonction du volume de tampon de digestion percolé. 142
Figure III-22 : Chromatogrammes obtenus par détection UV à 310 nm et à 380 nm après la digestion en ligne de 0,2 nmol de BApNA sur l'IMER à base de Sépharose CNBr préparé avec 1 mg de trypsine. 145
Figure III-23 : Protocole de digestion du BApNA sur la colonne de trypsine commerciale StyrosZyme™. 147
Figure III-24 : Diagramme représentant les rendements de digestion de 0,2 nmol de BApNA sur les trois supports préparés avec 1 mg de trypsine, sur la colonne StyrosZyme™ et pour une digestion en solution avec un rapport E/S = 1/50, (n=3)....148
Figure III-25 : Quantité de p-NA retrouvée après digestion de quantités croissantes de BApNA (entre 0,01 et 40 nmol) sur les trois supports préparés avec 1 mg de trypsine dans la solution de greffage. 150
Figure III-26 : Quantité de p-NA retrouvée après digestion de quantités croissantes de BApNA (entre 0,01 et 40 nmol) sur les trois supports préparés avec 0,1 mg de trypsine dans la solution de greffage. 151
Figure III-27 : Quantité de trypsine immobilisée sur 25 mg de Sépharose activée CNBr en fonction de la quantité de trypsine présente dans la solution de couplage (0,1 ; 0,5 ; 1 ; 2,5 and 5 mg de trypsine dans 1 mL de solution de greffage). 154
Figure III-28 : Quantités de p-NA obtenues après la digestion de différentes quantités de BApNA sur 4 IMERs à base de Sépharose activée CNBr préparés par différentes quantités de trypsine dans la solution de greffage (0,1 ; 0,5 ; 1 et 5 mg). 155
Figure III-29 : Aires relatives des deux peptides spécifiques du cytochrome c de rapports m/z 736,1 et 748,6 obtenues après digestions en ligne de 2 µg de la protéine (20 µL) sur l'IMER Seph-T (1) en faisant varier le volume de transfert entre 50, 75 et 100 µL, (n=1). 158
Figure III-30 : Aires relatives des deux peptides spécifiques du cytochrome c de rapports m/z 736,1 et 748,6 obtenues après digestions en ligne de 2 µg de la protéine (20 µL) sur l'IMER Seph-T (1) en faisant varier la durée de digestion entre 5, 10 et 20 minutes, (n=1). 158
Figure III-31 : Aires relatives des pics correspondant aux peptides de rapports m/z 736,1 et m/z 748,6 obtenus après digestion de 5 µg de cytochrome c en solution (E/S : 1/50) durant 16h, en ligne durant 20 minutes sur la colonne StyrosZyme™ et sur les IMERs à base de Sépharose CNBr greffées par 0,1 et 1 mg de trypsine. Les digestions et analyses sont répétées trois fois. 160
Figure III-32 : Estimation de la répétabilité de la synthèse. Aires relatives des deux pics des peptides spécifiques du cytochrome c (m/z 736,1 et 748,6) obtenus après digestion en ligne de 5 µg de cytochrome c réalisée sur deux IMERs à base de Sépharose CNBr préparés à partir de 1 mg de trypsine. 161
Figure III-33 : Aires des pics des peptides de rapports m/z 748,6 et m/z 736,1 en fonction de la quantité de cytochrome c digérée sur l'IMER Seph-T (1)bis. 163
Figure III-34 : Recouvrements de séquence obtenus par MASCOT en fonction de la quantité de cytochrome c digérée sur l'IMER Séph-T (1)bis. 164
Figure III-35 : Réponses relatives des deux peptides spécifiques du cytochrome c après digestion en solution et digestion en ligne sur l'IMER Séph-P (1) de 5 µg de cytochrome c (n=3). 167
Figure III-36 : Aires relatives des deux peptides spécifiques du cytochrome c de masse 1386,8 et 1017,5 Da obtenus après digestion en ligne sur l'IMER de pepsine de 5 µg de cytochrome c préparé dans du tampon Tris (pH 8) ou dans l'acide formique (pH 2)....168

Figure III-37 : Aires des pics des peptides de masse 1386,8 et 1017,5 Da en fonction de la quantité de cytochrome c (entre 8,5 pmol et 3,5 nmol) digérée sur l'IMER Séph-P (1). 169
Figure III-38 : Aires relatives des pics des deux peptides spécifiques de masse 1386,8 et 1017,5 Da obtenus après 3 digestions en ligne de 5 µg de cytochrome c sur chacun des IMERs à base de Sépharose CNBr et greffés par 1mg de trypsine lors de 3 synthèses différentes. 170
Figure III-39 : Quantités de pepsine immobilisée sur 25 mg de Sépharose activée CNBr en fonction de la quantité de pepsine introduite dans la solution de couplage. 172
Figure III-40 : Aires relatives des deux peptides spécifiques de la digestion à la pepsine du cytochrome c après digestion en ligne de 5 µg (20 µL) de cytochrome c sur les IMERs de Sépharose CNBr greffés par 1 et 5 mg de pepsine dans 1 mL de la solution de couplage. 174
Figure III-41 Chromatogrammes des courants ioniques totaux obtenus après digestion en ligne de 20 µl d'un mélange contenant 1 $mg.mL^{-1}$ d'albumine et de myoglobine et 0,1 $mg.mL^{-1}$ de cytochrome c et après digestion en ligne d'un échantillon de tampon dopé par 0,1 $mg.mL^{-1}$ de cytochrome c. 175

Chapitre IV

Figure IV-1 : Principe de l'analyse totale d'une protéine ciblée à partir d'un échantillon complexe mettant en œuvre une immunoextraction, une digestion enzymatique, une étape de préconcentration des peptides sur la précolonne de piégeage et une analyse chromatographique associée à une détection par spectrométrie de masse. 179
Figure IV-2 : Spectre d'absorption UV du cytochrome c obtenu par injection directe d'1 µg de cytochrome c dans le détecteur UV au moyen d'acide formique pH 2. 182
Figure IV-3 : Schéma du couplage direct entre l'immunoadsorbant et le détecteur UV-visible pour la mise au point de la procédure d'immunoextraction. 182
Figure IV-4 : Aires des pics obtenus à 400 nm après injection de cytochrome c entre 0,5 et 4 µg (40 et 340 pmol) véhiculé par une solution d'acide formique (pH 2) à 20 $\mu L.min^{-1}$ vers le détecteur UV. 183
Figure IV-5 : Chromatogrammes enregistrés au cours de l'élution par de l'acide formique à pH 2 à 20 $\mu L.min^{-1}$ sur l'IS 1 (a) et à 100 $\mu L.min^{-1}$ sur l'IS 2 (b) après la percolation d'1 µg de cytochrome c (20 µL). Absorbance : 400 nm. Les flèches indiquent le début de l'élution. 186
Figure IV-6 : Spectres d'absorption UV de la myoglobine (a) et de l'albumine (b) obtenus par injection directe de 20 µL dans le détecteur UV dans une solution de PBS et de NaCl à 2 $mol.L^{-1}$ respectivement. Débit : 50 $\mu L.min^{-1}$. 187
Figure IV-7 : Chromatogrammes enregistrés au cours des étapes de percolation (a) et de lavage (b) après injections de myoglobine et d'albumine (20 µL) sur l'IS 1. Détection à 400 nm (a) et à 280 nm (b). Débit : 50 $\mu L.min^{-1}$. 187
Figure IV-8 : Courbe de capacité obtenue après percolation de quantités croissantes de cytochrome c sur l'IS 1 préparé à partir de 25 µg d'anticorps anti-cytochrome c. 188
Figure IV-9 : Courbe de capacité obtenue après percolation de quantités croissantes de cytochrome c sur l'IS 2 préparé à partir de 100 µg d'anticorps anti-cytochrome c. UA : unité arbitraire. 190
Figure IV-10 : Présentation du montage en ligne pour l'analyse d'une protéine ciblée après immunoextraction et digestion en ligne. 191
Figure IV-11 : Aires relatives cumulées des pics des rapports m/z correspondant aux deux peptides spécifiques du cytochrome c de masses 1386,8 et 1017,5 Da après digestion en ligne de 1 µg de cytochrome c sur l'IMER de pepsine (IMER-P) directement ou après

extraction sur l'IS 1. Le transfert entre l'IS1 et l'IMER est assuré par 120 µL d'acide formique (pH 2) à 20 µL.min^{-1} (n=3). 193
Figure IV-12 : Aires relatives des pics des peptides spécifiques du cytochrome c de masses 1386,8 et 1017,5 Da après digestion en ligne de 1 µg de cytochrome c sur l'IMER-P sans et avec immunoextraction par les IS 1 et IS 2 (n=3). 196
Figure IV-13 : Aires relatives cumulées des pics correspondant aux deux peptides du cytochrome c de masses 1386,8 et 1017,5 Da après digestion en ligne de 5 µg de cytochrome c sur l'IMER-P directement ou après extraction sur l'IS 2. Transfert entre IS 2 et IMER : 150 µL HCOOH à 100 µL.min^{-1} ou 10 µL.min^{-1} (n=3). 197
Figure IV-14 : Chromatogrammes d'extraction d'ions des deux peptides spécifiques du cytochrome c de masses 1386,8 et 1017,5 Da après l'analyse totale de 85 pmol de cytochrome c (1 µg) dopé dans un échantillon pur (a) et dans un échantillon de plasma dilué (1/5) (b) par couplage IS 1- IMER de pepsine- LC-MS/MS. 198
Figure IV-15 : Aires relatives des deux peptides spécifiques du cytochrome c de masses 1386,8 et 1017,5 Da pour l'analyse totale par IS 1/ IMER-P / LC-MS/MS d'un échantillon pur et d'un échantillon de plasma dopé par la même quantité de cytochrome c (85 pmol, 1 µg) (n=3). 199

Chapitre V

Figure V-1 : Représentation du couplage entre l'IMER et l'analyse par µ-LC. 205
Figure V-2 : Chromatogramme obtenu après analyse par µLC-UV d'une solution d'1 µg (85 pmol) de cytochrome c digérée en solution par la pepsine 280 nm. 206
Figure V-3 : Chromatogramme à 280 nm obtenu après digestion en ligne d'1 µg (85 pmol) de cytochrome c (1 µL) transféré sur l'IMER de pepsine par 30 µL d'acide formique à 1 µL.min^{-1} puis analyse par µ-LC-UV. 207
Figure V-4 : Aires des pics observés à 280 nm après digestion en ligne d'1 µL de tampon Tris contenant entre 0,5 et 1,5 µg (43 et 128 pmol) de cytochrome c sur l'IMER de pepsine par 30 µL d'acide formique à 1 µL.min^{-1} puis analyse par µ-LC-UV (n=3). UA : unité arbitraire. 208
Figure V-5 : Aires des deux pics correspondant à deux peptides du cytochrome c obtenus après digestion en ligne de 0,75 µg de cytochrome c (1 µL) sur l'IMER de pepsine par percolation d'acide formique (pH 2) : en faisant varier (a) les volumes entre 25 et 50 µL à 1 µL.min^{-1} et (b) les débits de 1 à 5 µL.min^{-1} (30 µL). Analyse par µ-LC-UV. UA : unité arbitraire. 209
Figure V-6 : Schéma du couplage entre l'IMER et l'analyse par cap-LC. 212
Figure V-7 : Chromatogramme obtenu à 280 nm après analyse par cap-LC-UV d'1 µL d'une solution contenant 0,25 µg (21 pmol) de cytochrome c digérée en solution par la pepsine. 213
Figure V-8 : Aires de deux peptides spécifiques du cytochrome c obtenues après digestion en solution de 0,25 µg de cytochrome c (1 µL), en fonction du volume d'acide formique percolé. L'analyse est effectuée par cap-LC et détection UV à 280 nm. 214
Figure V-9 : Chromatogramme obtenu à 280 nm après la digestion en ligne de 150 ng (13 pmol) de cytochrome c (1 µL) sur l'IMER de pepsine à 1 µL.min^{-1} d'acide formique (pH 2,5) puis analyse par cap-LC-UV. 215
Figure V-10 : Aires des pics observés à 280 nm après digestion en ligne de cytochrome c entre 75 et 500 ng (entre 6,4 et 43 pmol) sur l'IMER de pepsine par de l'acide formique (pH 2,5) à 1 µL.min^{-1} et analyse par cap-LC-UV. UA : unité arbitraire. 216
Figure V-11 : Aires des deux peptides spécifiques du cytochrome c obtenues après digestion en solution de 0,1 µg de cytochrome c, en fonction du volume d'acide formique

transféré (a) et du débit de digestion (b). L'analyse est effectuée par chromatographie capillaire et détection UV à 280 nm. 217
Figure V-12 : Chromatogrammes obtenus à 280 nm après digestion en ligne de 100 ng de cytochrome c (1 µL) sur l'IMER de pepsine à 1 µL.min^{-1} d'acide formique (pH 2,5) puis analyse par cap-LC-UV. a)110ème analyse b) 140ème analyse. 219
Figure V-13 : Représentation du montage expérimental pour le couplage de l'immunoadsorbant de l'IMER de pepsine pour l'analyse en ligne du cytochrome c par chromatographie liquide capillaire. 220
Figure V-14 : Chromatogrammes obtenus à 280 nm après digestion en ligne de 50 ng de cytochrome c sur l'IMER de pepsine à 1 µL.min^{-1} (a) ou 2 µL.min^{-1} (b) d'acide formique puis analyse par cap-LC-UV. 222
Figure V-15 : Chromatogrammes obtenus à 280 nm après digestion en ligne de 40 ng de cytochrome c sur l'IMER de pepsine seul (a) ou après immunoextraction sur l'IS 1 (b) et analyse par cap-LC-UV. 223
Figure V-16 : Chromatogrammes obtenus après digestions en ligne sur l'IMER de pepsine et analyses par cap-LC d'un échantillon pur (trait plein) et d'un échantillon de plasma dilué (pointillés) dopés par 40 ng de cytochrome c. 224
Figure V-17 : Chromatogrammes obtenus après analyse couplant l'IS 1 avec l'IMER de pepsine et l'analyse par cap-LC d'un échantillon pur (a) et d'un échantillon de plasma dilué (b) dopés par 40 ng de cytochrome c. 225
Figure V-18 : Chromatogrammes obtenus à 280 nm après analyse par chromatographie capillaire après digestion en ligne de 75 ng de cytochrome c dans un échantillon pur sans immunoextraction (a) ou avec immunoextraction sur l'IS 2 (b) et après analyse d'un échantillon de plasma dopés par 75 ng de cytochrome c couplant l'IS 2 et l'IMER (c). 226
Figure V-19 : Procédé de synthèse du monolithe hybride à base de TEOS et d'APTES. Adapté de [6]. 230
Figure V-20: Représentation du surfactant CTAB et de son adsorption sur une surface de silice [9]. 231
Figure V-21 : Mode d'introduction des différentes solutions dans le capillaire. 232
Figure V-22 : Photos des capillaires SG-1 et SG-3après synthèse du monolithe sol-gel hybride suivant deux modes de remplissages différents. 235
Figure V-23 : Photo du capillaire SG-4. 236
Figure V-24 : Image MEB d'une section de capillaire du monolithe SG-3. 236
Figure V-25 : Images MEB d'une section de capillaire du monolithe SG-2. 237
Figure V-26 : Principe d'activation du monolithe par du glutaraldéyde et immobilisation de la trypsine. 238
Figure V-27 : Schéma de l'analyse couplant l'IMER de trypsine miniaturisé (50 x 0,1mm d.i.) avec une analyse par LC capillaire et une détection UV. 240
Figure V-28 : Courbes d'étalonnage obtenues après analyses par LC capillaire de quantités croissantes de BApNA et du p-NA entre 1,25 et 50 pmol (n=3). 241
Figure V-29 : Chromatogrammes à 310 nm et à 380 nm après digestion sur l'IMER de trypsine miniaturisé de 25 pmol de BApNA et analyse en ligne du produit et du substrat résiduel par LC-capillaire 242
Figure V-30 : Rendements de digestion et taux de récupération obtenus après 7 digestions de 25 pmol de BApNA et analyse en ligne du produit et du substrat résiduel par LC capillaire. 243
Figure V-31 : Chromatogrammes à 280 nm après digestions en ligne de 125 ng de cytochrome c sur l'IMER de trypsine miniaturisé (a) et après digestion trypsique en solution (E/S = 1/50) (b). 245

Figure V-32 : Schéma de la puce HPLC-Chip/MS Agilent. 247
Figure V-33 : Courant ionique total obtenu après analyse par HPLC-Chip/MS de 1 µL de digestat trypsique en solution contenant 10 ng de cytochrome c. 249
Figure V-34 : Aires des rapports m/z 736,1 et 748,6 correspondant aux deux peptides spécifiques du cytochrome c en fonction de la quantité de cytochrome c (entre 0,5 et 10 ng) digérée en solution par la trypsine (E / S = 1/50) et analyse par HPLC-Chip/MS 251