



La quantification ciblée de protéines et peptides par chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse en tandem : développements analytiques et applications

Romain Simon

► To cite this version:

Romain Simon. La quantification ciblée de protéines et peptides par chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse en tandem : développements analytiques et applications. Autre. Université Claude Bernard - Lyon I, 2012. Français. NNT : 2012LYO10106 . tel-00875965

HAL Id: tel-00875965

<https://theses.hal.science/tel-00875965>

Submitted on 23 Oct 2013

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 L'UNIVERSITE DE LYON

Délivrée par

L'UNIVERSITE CLAUDE BERNARD LYON 1

ECOLE DOCTORALE DE CHIMIE

DIPLOME DE DOCTORAT (arrêté du 7 août 2006)

Soutenue publiquement le 11 Juillet 2012

par

M. Romain SIMON

**LA QUANTIFICATION CIBLEE DE PROTEINES ET PEPTIDES PAR CHROMATOGRAPHIE
LIQUIDE COUPLEE A LA SPECTROMETRIE DE MASSE EN TANDEM :
DEVELOPPEMENTS ANALYTIQUES ET APPLICATIONS**

Composition du jury :

M. Arnaud SALVADOR	Directeur de thèse
M. Jérôme LEMOINE	Co-directeur de thèse
M. Bernard MONSARRAT	Rapporteur
Mme Florence PINET	Rapporteur
Mme Claire ELFAKIR	Examinatrice
Mme Jeanne GARRIC	Examinatrice
M. Pierre Lanteri	Examineur

UNIVERSITE CLAUDE BERNARD – LYON I

Président de l'Université	M. F.N. GILLY
Vice-président du Conseil Scientifique	M. J.F. MORNEX
Vice-président du Conseil d'Administration	M. G. ANNAT
Vice-président du Conseil des Etudes de la Vie Universitaire	M. D. SIMON
Secrétaire Général	M. G. GAY

SECTEUR SANTE

Composantes

Faculté de Médecine Lyon Est	M. J.ETIENNE
Faculté de Médecine et de Maïeutique Lyon Sud Charles Mérieux	M. F.N. GILLY
Faculté de pharmacie – Institut des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques	Mme C.VINCIGUERRA
Faculté d'Odontologie	M. D. BOURGEOIS
Institut des Sciences et Techniques de Réadaptation	M. Y. MATILLON
Département de formation et de recherche en Biologie Humaine	M. P. FARGE
Comité de Coordination des Etudes Médicales	M. F.N. GILLY

SECTEUR SCIENCES ET TECHNOLOGIES

Composantes

Faculté des Sciences et Technologies	Directeur : M. F. DE MARCHI
UFR de Sciences et Techniques des Activités Physiques et Sportives	Directeur : M. C. COLLIGNON
Ecole Polytechnique Universitaire de Lyon	Directeur : M. P. FOURNIER
I.U.T. Lyon 1	Directeur : M. C. COULET
Institut des Sciences Financières et d'Assurance	Directeur : Mme V. MAUME-DESCHAMPS
I.U.F.M.	Directeur : M. R. BERNARD
Observatoire Astronomique de Lyon	Directeur : M. B. GUIDERDONI
CPE	Directeur : M. G. PIGNAULT

Remerciements

Parmi les nombreuses personnes à remercier, je souhaiterais commencer par Jean-Luc Fugit, Maître de Conférences à l'Université Jean Monnet de Saint-Etienne. En effet, grâce à ses enseignements en DEUG, il a su me redonner envie d'étudier la Chimie dans une période au cours de laquelle je ne savais plus trop vers quelle voie m'orienter. Sans lui, ce manuscrit n'existerait pas. Encore une fois, merci.

Je remercie également mes deux rapporteurs, Bernard Monsarrat et Florence Pinet, mais aussi mes trois examinateurs, Claire Elfaïr, Jeanne Garric et Pierre Lanteri pour avoir étudié ce manuscrit.

Bien évidemment, je remercie mes directeurs de thèse, Arnaud Salvador et Jérôme Lemoine à de nombreux titres : d'abord, pour m'avoir initié à la spectrométrie de masse en Master et ensuite, pour m'avoir transmis une partie de leurs connaissances dans ce domaine au cours de ma thèse. Je les remercie également de se démenner au quotidien afin d'acquérir des équipements de pointe, notamment après les péripéties que nous avons connues il y a deux ans. De nombreuses personnes aimeraient probablement avoir de tels appareils dans leur laboratoire et je les remercie à nouveau de m'avoir donné cette chance. Enfin, je les remercie également pour leur contribution à mon insertion professionnelle.

Ensuite, mes pensées vont vers Jean-Philippe Charrier et Tanguy Fortin de bioMérieux, mais aussi Jean-Jacques Lebrun, Cécile Cren-Olivé et Laure Wiest du Service Central d'Analyse à Solaise pour m'avoir accueilli et permis d'utiliser leurs appareils après l'incendie du laboratoire.

Je remercie aussi Arnaud Chaumot, Guillaume Jubeaux, Olivier Geffard, Renaud Tutundjian de l'Irstea pour la collaboration que nous avons eue au cours de cette thèse.

Je remercie également Claire Bordes, Pierre Lanteri et Yohann Clément de l'équipe Chemod pour leur aide et leurs conseils lors de l'analyse des résultats obtenus après le dosage de la cohorte de 673 échantillons.

Je n'oublie pas non plus l'ensemble des autres personnes que j'ai côtoyées au cours de ces années de thèse, et plus particulièrement : Amélie, Aurore, Fabien, Jérémy, Marion et aussi Quentin pour ses chants et ses danses.

Le meilleur arrivant toujours en dernier, je souhaite remercier plus particulièrement Catherine Fonbonne pour tout le travail qu'elle accomplit quotidiennement au laboratoire et pour toute l'aide qu'elle m'a apportée durant cette thèse.

Liste des abréviations

Abréviation	Nom
20-HE	20-Hydroxy Ecdysone
2D	Deux dimensions
ACN	Acétonitrile
ACP	Analyse en Composantes Principales
Apo E	Apolipoprotéine E
Apo E2	Apolipoprotéine E2
Apo E3	Apolipoprotéine E3
Apo E4	Apolipoprotéine E4
AQUA	Absolute QUAntification
ARNm	Acide RiboNucléique messenger
CID	Collision Induced Dissociation
cps	Coups Par Seconde
CV	Coefficient de Variation
DTT	Dithiothréitol
ELISA	Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay
ESI	ElectroSpray Ionization
ET	Ecart-Type
FA	Acide Formique
HILIC	Hydrophilic Interaction Liquid Chromatography
HPLC	High Pressure Liquid Chromatography
HSA	Human Serum Albumin
IAM	Iodoacétamide
IDA	Information Dependant Acquisition
LC	Liquid Chromatography
MeOH	Méthanol
MF	Farnesoate de Méthyle
m-NBA	Alcool Méta-NitroBenzylique
MRM ³	Multiple Reaction Monitoring Cubed
MS/MS	Spectrométrie de masse en tandem
PAGE	Electrophorèse sur Gel de PolyAcrylamide
PNRPE	Plan National de Recherche sur les Perturbateurs Endocriniens
PSA	Prostate Specific Antigen
PSAQ	Protein Standard Absolute Quantification
QCAT	Quantification conCATemer
RT-PCR	Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction
SDS	Dodécyle Sulfate de Sodium
SNP	Single Nucleotide Polymorphism
SPE	Solid Phase Extraction

Liste des abréviations

SRM	Selected Reaction Monitoring
TCEP	Tris-(2-CarboxyEthyl)Phosphine
t _r	Temps de Rétention
Vtg	Vitellogénine

Table des matières

des figures	14
des tableaux.....	19
) Les biomarqueurs	29
.1) Définitions	29
.2) Les différentes familles de biomarqueurs.....	30
.3) La validation de nouveaux biomarqueurs	31
) La quantification des protéines	32
.1) Par des méthodes à base d'anticorps	32
.1.1) Après électrophorèse sur gel de polyacrylamide en deux dimensions.....	32
.1.2) Dosage par ELISA	34
.2) Par spectrométrie de masse.....	35
.2.1) Principe de la quantification de protéines par spectrométrie de masse	35
.2.2) Description d'un spectromètre de masse	37
.2.2.1) Les sources d'ionisation.....	37
.2.2.1.1) La désorption / ionisation laser assistée par matrice (MALDI).....	38
.2.2.1.2) L'ionisation par électrospray.....	38
.2.2.2) Les analyseurs.....	41
.2.2.2.1) Caractéristiques des analyseurs.....	41
.2.2.2.2) Le quadripôle	42
.2.2.2.3) Le piège à ions.....	46
.2.3) La spectrométrie de masse en tandem (MS/MS).....	49
.2.3.1) Appareillage.....	49
.2.3.1.1) Le triple quadripôle.....	49
.2.3.1.2) Le Q-trap	50
.2.3.2) Les modes de balayage utilisés pour le développement d'un dosage	50
.2.3.2.1) Le balayage d'ions fragments.....	50
.2.3.2.2) Le mode SRM (Selected Reaction Monitoring)	51
.2.3.2.3) Le mode MRM ³ (Multiple Reaction Monitoring cubed)	51
.2.3.2.4) L'acquisition dépendant d'information (IDA)	53
) Les différentes quantifications possibles par spectrométrie de masse	54
.1) La quantification relative.....	54
.1.1) Le « label free »	54

.1.1.1)	La mesure d'aire sous le pic.....	54
.1.1.2)	Le décompte de spectres.....	55
.1.2)	Le marquage métabolique	55
.1.2.1)	Marquage à l'azote 15.....	55
.1.2.2)	L'approche SILAC (Stable isotope labeling by amino acids in cell culture)	56
.1.3)	Le marquage protéolytique.....	56
.1.4)	Le marquage chimique	56
.1.4.1)	Réaction sur les amines.....	57
.1.4.1.1)	Acétylation ou propionylation	57
.1.4.1.2)	Réactifs à base d'esters de 1-Hydroxy-2,5-pyrrolidinedione.....	57
.1.4.1.2.1)	Méthode ICPL(Isotope-Coded Protein Labels).....	57
.1.4.1.2.2)	Méthode mTRAQ®	57
.1.4.1.2.3)	Tandem Mass Tag et iTRAQ®	58
.1.4.2)	Réaction sur les thiols.....	59
.1.4.2.1)	ICAT (isotope-coded affinity tag) et dérivés	59
.1.4.2.2)	ALICE (Acid-Labile Isotope-Coded Extractants).....	59
.1.4.2.3)	HysTag	59
.2)	La quantification absolue	60
.2.1)	Etalonnage externe	61
.2.2)	Etalonnage interne	62
.2.2.1)	Principe	62
.2.2.2)	AQUA	62
.2.2.3)	QCAT (Quantification conCATemer).....	63
.2.2.4)	PSAQ.....	63
.2.3)	Les difficultés liées à la quantification absolue de protéines par spectrométrie de masse	63
.2.3.1)	La protéomique dans le sang.....	64
.2.3.2)	L'effet matrice	65
.2.3.3)	La spécificité du peptide quantifié	67
.2.3.4)	Evaluation du rendement de digestion	67
.2.3.5)	Evaluation de la concentration de l'étalon.....	69
)	Les stratégies mises en place pour améliorer la sensibilité des dosages.....	69
.1)	Analyse directe du plasma digéré	69
.2)	Déplétion des protéines majoritaires.....	70

.3)	Fractionnement de l'échantillon	72
.4)	Immuno-enrichissement	73
.4.1)	Au niveau protéique	73
.4.2)	Au niveau peptidique	75
.5)	Analyses multiplexées	78
.6)	Evaluation de la répétabilité et de la reproductibilité des dosages	79
)	Le choix des peptides protéotypiques.....	80
.1)	La fragmentation des peptides.....	80
.1.1)	Nomenclature.....	80
.2)	Le modèle du proton mobile	81
.3)	Les critères de choix	83
II :	DOSAGE DE LA VITELLOGENINE CHEZ <i>GAMMARUS FOSSARUM</i>	87
)	Introduction.....	89
)	Matériel et méthodes.....	92
.1)	Réactifs	92
.2)	Préparation des échantillons.....	92
.2.1)	Broyage et délipidation	92
.2.2)	Digestion.....	93
.3)	Analyse LC-MS/MS	93
.4)	Préparation des standards et des contrôles de qualité	94
.5)	Extraction en phase solide	94
.5.1)	Mise au point du protocole d'extraction.....	94
.5.2)	Protocole utilisé lors des dosages	95
)	Résultats et discussion	95
.1)	Sélection des peptides et des transitions SRM spécifiques à la Vtg	95
.1.1)	Identification des peptides candidats	95
.1.2)	Validation de la spécificité biologique des peptides détectés	99
.2)	Efficacité de la digestion enzymatique.....	103
.3)	Validation de la méthode de dosage.....	105
.3.1)	Linéarité.....	105
.3.1.1)	Dans le solvant d'extraction	105
.3.1.2)	Chez les mâles	109
.3.1.3)	Chez les femelles	111

.3.2)	Evaluation de l'effet matrice	113
.4)	Amélioration de la sensibilité du dosage	114
.4.1)	Mise au point du protocole d'extraction sur phase solide.....	114
.4.1.1)	Vérification de la linéarité	117
.4.1.2)	Application sur des échantillons mâles de <i>G.fossarum</i>	120
.5)	Applications.....	123
.5.1)	Vérification de la fonction de la vitellogénine chez <i>G. fossarum</i>	124
.5.2)	Modulation du taux de vitellogénine chez les femelles	125
.5.3)	Modulation du taux de vitellogénine chez les mâles	127
.5.4)	Mesure du taux de vitellogénine chez les mâles sur différents sites de prélèvement	129
)	Conclusion	130
III : DOSAGE D'UNE PROTEINE PLASMATIQUE HUMAINE VIA UN PEPTIDE CONTENANT UNE METHIONINE		133
)	Introduction.....	135
)	Matériel et méthodes.....	138
.1)	Réactifs	138
.2)	Préparation des échantillons.....	139
.2.1)	Digestion enzymatique	139
.2.2)	Oxydation de la méthionine	139
.2.3)	Extraction des peptides	139
.3)	Analyse LC-MS/MS	139
.4)	Préparation des standards et des contrôles de qualité	140
.4.1)	Gammes de peptides.....	140
.4.1.1)	Dans l'eau	140
.4.1.2)	Dans du plasma	140
.4.2)	Gammes de plasma	141
.5)	Mise en place d'un échantillon de référence.....	141
.6)	Dosage par ELISA	141
)	Résultats et discussion	142
.1)	Sélection des transitions SRM spécifiques à l'Apolipoprotéine E totale et à l'Apolipoprotéine E4.....	142
.2)	Mise en évidence de l'oxydation naturelle de la méthionine	143
.3)	Développement de l'oxydation totale de la méthionine	152
.3.1)	Choix du réactif.....	152

.3.2)	Optimisation de la durée de réaction.....	157
.4)	Linéarité de la réponse des peptides sélectionnés	162
.4.1)	Conditions chromatographiques	162
.4.2)	Linéarité des peptides de synthèse dans l'eau.....	165
.4.3)	Linéarité des peptides de synthèse dans le plasma	166
.4.4)	Gammes de plasma ϵ_4/ϵ_4 dans du plasma ϵ_3/ϵ_3	168
.5)	Dosage de l'Apo E et de l'Apo E4 dans le plasma.....	172
.5.1)	Mise en place d'un contrôle au cours des dosages.....	173
.5.2)	Résultat des dosages	175
)	Conclusion et perspectives.....	187
IV : APPORTS DE LA CHROMATOGRAPHIE LIQUIDE POUR LA QUANTIFICATION		191
)	Introduction.....	193
)	Matériel et méthodes.....	194
.1)	Réactifs	194
.2)	Préparation des échantillons.....	195
.2.1)	Digestion enzymatique	195
.2.2)	Extraction des peptides supplémentés dans le sérum pour la comparaison entre le MeOH et l'ACN en phase inverse	195
.2.3)	Extraction des peptides pour la comparaison entre la phase inverse et l'HILIC.....	195
.2.4)	Préparation des gammes.....	196
.2.4.1)	En solvant(eau)	196
.2.4.2)	En matrice (sérum ou urine).....	196
.2.5)	Préparation des échantillons pour l'évaluation du volume de matrice injectable en HILIC	196
.3)	Analyse LC-MS/MS	197
)	Résultats et discussion	198
.1)	Séparation avec la même pente de gradient de solvant éluant	199
.2)	Séparation avec la même capacité de pics.....	204
.3)	Etude de la réponse dans le sérum	213
.4)	Conclusion et perspectives sur l'utilisation du MeOH	214
.5)	Evaluation de la chromatographie liquide d'interactions hydrophiles (HILIC)	217
.5.1)	Principe de l'HILIC.....	217
.5.2)	Choix des phases stationnaire et mobile.....	219

.5.3)	Comparaison entre l'HILIC et la C ₁₈ pour un mélange complexe de peptides sans matrice	229
.5.4)	Déplacement de l'état de charge	232
.5.5)	Comparaison du signal obtenu pour un mélange complexe de peptides en phase inverse et en HILIC en présence de m-NBA.....	235
.5.6)	Linéarités sans matrice	239
.5.7)	Linéarités en matrice complexe	242
.5.7.1)	Evaluation du volume de matrice injectable	242
.5.7.2)	Linéarités dans l'urine	249
)	Conclusion	252
	GENERALE	255
		261
	A : SEQUENCE DE L'APOLIPOPROTEINE E ET DES PEPTIDES TRYPSIQUES POTENTIELS.	263
	B : ANALYSE STATISTIQUE DE DONNEES.	269
)	L'analyse de variance.....	271
)	L'analyse en composantes principales	275
	C : COMMUNICATIONS ECRITES ET ORALES.	281
)	Communications écrites.....	283
.1)	Publications dans des journaux à comité de lecture.....	283
.2)	Posters	284
)	Communications orales	286
	BIBLIOGRAPHIQUES.....	289

Liste des figures

1 : Nombre d'articles listés dans PubMed depuis 25 ans et contenant le terme « biomarker ».....	29
2 : Les étapes du développement d'un nouveau biomarqueur (d'après Rifai <i>et al.</i> ⁵).	31
3 : Principe du dosage de protéines par spectrométrie de masse.....	36
4 : Principe de l'ionisation par électrospray.....	39
5 : Schéma d'un quadripôle (d'après R.E. March ³⁶).	43
6 : Diagramme de stabilité d'un ion dans un quadripôle selon l'axe x ou y.....	44
7 : Diagramme de stabilité d'un ion dans un quadripôle selon les axes x et y.	44
8 : Agrandissement de la partie A de la Figure 7.....	45
9 : Diagramme de stabilité de 3 ions de masse m_1 , m_2 et m_3 dans un quadripôle.	45
10 : Schéma d'un piège à ions (d'après R.E. March ³⁶ , après modification).	46
11 : Diagramme de stabilité des ions dans un piège à ions (d'après R.E. March ³⁶).	47
12 : Agrandissement de la partie A de la Figure 11.....	47
13 : Schéma d'un piège à ions linéaire.	48
14 : Schéma de principe de la SRM (d'après Huttenhain <i>et al.</i> ³⁷).	51
15 : Principe de la MRM ³ (d'après Fortin <i>et al.</i> ³⁸).	52
16 : Courbes d'étalonnage en SRM et en MRM ³ du peptide rapporteur de la protéine TP 435 dans du sérum de femme entre 0 et 1000 ng / mL (d'après Fortin <i>et al.</i> ³⁸).	53
17 : Réaction entre une amine et un ester de N- hydroxysuccinimide.....	57
18 : Structure du réactif iTRAQ® (d'après Ross <i>et al.</i> ⁵³).	58
19 : Structure du réactif HysTag (d'après Olsen <i>et al.</i> ⁶⁰).	60
20 : Exemple de dosage par étalonnage externe.....	61
21 : Concentration de 70 protéines dans le plasma (d'après Anderson et Anderson ⁶⁷).	64
22 : Evaluation de l'effet matrice par l'infusion post-colonne (d'après Trufelli <i>et al.</i> ⁷⁴).	65
23 : Evaluation de l'effet matrice par les ajouts post-extraction (d'après Trufelli <i>et al.</i> ⁷⁴).	66
24 : Nomenclature de la fragmentation peptidique.	80
25 : Mécanisme de fragmentation d'un peptide impliquant l'azote (A) ou l'oxygène (B) de la liaison peptidique (d'après Paizs et Suhai ¹¹⁸).	82
26 : Séquence peptidique partielle de la vitellogénine chez <i>Gammarus fossarum</i>	96
27 : Chromatogramme reconstitué des peptides détectés de vitellogénine.....	97
28 : Spectre de fragmentation des peptides de séquence ILIPGVGK (A), IEILK (B) et VIGSVNSSPDR (C). Pour chaque spectre, l'ion précurseur est souligné en vert.	98
29 : Evolution de l'aire des peptides de Vtg en fonction du stade de mue chez la femelle et comparaison avec la quantité de Vtg présente chez le mâle (n = 3).	99
30 : Evolution de l'aire du peptide de séquence ILIPGVGK en fonction de celle des six autres peptides les plus intenses : VIGSVNSSPDR (A), IEILK (B), IVSVPSK (C), TPTTCWR (D), VDGQVITGSKPLK (E) et LEVVLQDK (F).	100
31 : Evolution de l'aire de la transition SRM 398,8 / 457,3 du peptide de séquence ILIPGVGK en fonction des deux autres transitions SRM les plus intenses de ce peptide.	101
32 : Variation de l'aire des cinq peptides les plus intenses chez les femelles en fonction de leur stade de mue (aire pondérée par le nombre d'ovocytes), chez les mâles et chez les juvéniles (n=3) (aire pondérée par le nombre d'individus).....	102

33 : Cinétique de digestion de la vitellogénine mesurée par le peptide de séquence ILIPGVGK (A) ou VIGSVNSSPDR (B).....	104
34 : Courbes d'étalonnage du peptide de séquence ILIPGVGK et de son homologue marqué dans le solvant d'extraction.....	106
35 : Courbe d'étalonnage du peptide marqué de séquence VIGSVNSSPDR* dans le solvant d'extraction.	108
36 : Courbes d'étalonnage du peptide de séquence ILIPGVGK et de son homologue marqué (A) et du peptide de séquence VIGSVNSSPDR* (B) chez les mâles.....	110
37 : Courbe d'étalonnage des peptides de séquence ILIPGV*GK et VIGSVNSSPDR* chez les femelles.	112
38 : Rendement d'extraction du peptide ILIPGVGK sur cartouche HLB en milieu basique ou acide.....	116
39 : Courbe d'étalonnage du peptide marqué de séquence ILIPGV*GK dans le solvant d'extraction après SPE (Volume injecté = 20 µL).....	118
40 : Courbe d'étalonnage du peptide marqué de séquence ILIPGV*GK chez mâles après SPE (Volume injecté = 60 µL).	119
41 : Chromatogrammes reconstitués du peptide ILIPGVGK (transition SRM 398,8 / 457,3) (A) et de son homologue marqué (transition SRM 401,8 / 463,3) (B) chez le mâle.	120
42 : Chromatogrammes reconstitués du peptide issu de la Vtg (A) et de son homologue marqué (B) chez un mâle.....	121
43 : Chromatogrammes reconstitués du peptide issu de la Vtg (A) et de son homologue marqué (B) à partir du même échantillon que sur la Figure 42 mais en utilisant un autre système LC-MS/MS...	121
44 : Chromatogrammes reconstitués obtenus avec l'ancien (A) et le nouveau gradient (B).	122
45 : Evolution de l'expression de la vitellogénine au cours du cycle de reproduction des femelles et du développement embryonnaire (n=5).....	124
46 : Evolution de l'expression de la vitellogénine chez les femelles après exposition à la 20-hydroxyecdysone (A) ou au farnesoate de méthyle (B) (n=15).	126
47 : Evolution de l'expression de la vitellogénine chez les mâles après exposition au farnesoate de méthyle (A) ou à la cyprotérone (B) (n=15).....	128
48 : Différence d'expression de la vitellogénine chez les mâles en amont ou en aval de sites pollués sur différentes rivières (n=15).....	129
49 : Relation entre les allèles présents et les protéines exprimées dans le cas de l'apolipoprotéine E.	135
50 : Séquences partielles des trois isoformes majoritaires de l'apolipoprotéine E.	136
51 : Chromatogrammes reconstruits du peptide synthétique de séquence LGADMEDVR non oxydé (A, C) et oxydé (B, D). La séparation a été réalisée sur une colonne Zorbax Eclipse plus C ₁₈ d'Agilent Technologies (Waldbronn, Allemagne) ayant des particules de 1,8 µm et de dimension 2,1 x 50 mm. L'élution a été réalisée à 600 µL / min avec un gradient linéaire de 5 à 20% d'ACN contenant 0,1% d'acide formique en 1,5 min.	144
52 : Chromatogrammes reconstruits des formes non oxydées (endogène en vert, étalon en gris) et mono oxydées (endogène en bleu et étalon en rouge) du peptide séquence LGADMEDVR issu de plasma ε3/ε4 avec les spectres MS ² correspondants (spectre de la forme mono oxydée endogène en haut et de la non oxydée en bas).	147
53 : Oxydation naturelle du peptide protéotypique de l'apolipoprotéine E4 dans le plasma (n = 68).	148

54 : Quantification de l'Apo E et de l'Apo E4 dans le plasma digéré avec ou sans anti-oxydant.	149
55 : Oxydation naturelle du peptide LGADMEDV*R lors de la digestion du plasma avec ou sans anti-oxydant.....	150
56 : Spectres de masse du peptide LGADMEDV*R dans l'eau acidifiée (A) ou après réaction pendant 30 min à température ambiante avec 3% de peroxyde d'hydrogène (B).	152
57 : Spectres de masse du peptide C(Cam)LAV*YQAGAR dans l'eau acidifiée (A) ou après réaction pendant 30 min à température ambiante avec 3% de peroxyde d'hydrogène (B).....	153
58 : Spectre de masse du peptide LGADMEDV*R après réaction pendant 20h à 0°C avec 7% de peroxyde d'hydrogène.	154
59 : Spectre de masse du peptide LGADMEDV*R après réaction pendant 4h à température ambiante avec 3% d'acide performique.	154
60 : Spectre de masse du peptide C(Cam)LAV*YQAGAR après réaction pendant 20h à 0°C avec 1% d'acide performique.....	155
61 : Spectre de masse du peptide C(Cam)LAV*YQAGAR après réaction pendant 20h à 0°C avec 1% d'acide performique contenant 0,5% de phénol.	156
62 : Spectres de masse des peptides LGADMEDV*R (A) et LGPLV*EQGR (B) après réaction pendant 20h à 0°C avec 1% d'acide performique contenant 0,5% de phénol.	156
63 : Cinétique d'oxydation des peptides LGADMEDV* R et LGPLV*EQGR (A), C(Cam)LAV*YQAGAR (B) et LGADMEDV*C(Cam)GR (C) par de l'acide performique contenant du phénol dans du sérum digéré.....	158
64 : Chromatogrammes reconstitués du peptide LGADMEDVR dans du plasma $\epsilon 4/\epsilon 4$ avant (A-B-C) ou après (D-E-F) oxydation à l'acide performique contenant du phénol. Chaque chromatogramme correspond à la forme non oxydée (A-D) ($t_r = 8.1\text{min}$), mono oxydée (B-E) ($t_r = 4.2\text{ min}$) ou doublement oxydée (C-F) ($t_r = 6.5\text{ min}$) sur la méthionine.	161
65 : Courbes de van Deemter obtenues après injection d'acétophénone sur trois colonnes de granulométrie différente (d'après de Villiers <i>et al.</i> ²⁶¹).....	164
66 : Courbes d'étalonnage des peptides LGPLVEQGR, LGPLV*EQGR (A) et LGADM(ox-ox)EDVR, LGADM(ox-ox)EDV*R dans l'eau après ajout d'acide performique et de phénol.....	165
67 : Courbe d'étalonnage du peptide LGPLV*EQGR dans du plasma après ajout d'acide performique et de phénol.	167
68 : Gammas de plasma $\epsilon 4/\epsilon 4$ dans du plasma $\epsilon 3/\epsilon 3$ (n = 9).....	168
69 : Dosage de l'Apo E et de l'Apo E4 dans l'échantillon de contrôle qualité (n = 51).	174
70 : Résultats des dosages de l'Apo E et de l'Apo E4 sur les échantillons témoins (en bleu) et les patients atteints de la maladie d'Alzheimer (en rouge) en fonction de leur génotype : $\epsilon 2/\epsilon 3$ (A), $\epsilon 3/\epsilon 3$ (B), $\epsilon 2/\epsilon 4$ (C), $\epsilon 3/\epsilon 4$ (D) et $\epsilon 4/\epsilon 4$ (E).	178
71 : Répartition des échantillons témoins et malades en fonction de l'âge des patients.	180
72 : Analyse en composantes principales de l'influence de l'âge sur le taux d'apolipoprotéine E...	181
73 : Analyse en composantes principales des résultats obtenus pour le génotype $\epsilon 3/\epsilon 3$	182
74 : Analyse en composantes principales des résultats obtenus pour le génotype $\epsilon 3/\epsilon 4$	183
75 : Résultats des dosages de l'Apo E et de l'Apo E4 chez les hommes (en bleu) et les femmes (en rouge) en fonction de leur génotype : $\epsilon 2/\epsilon 3$ (A), $\epsilon 3/\epsilon 3$ (B), $\epsilon 2/\epsilon 4$ (C), $\epsilon 3/\epsilon 4$ (D) et $\epsilon 4/\epsilon 4$ (E).	184
76 : Schéma de préparation des échantillons pour l'étude du volume de matrice injectable en HILIC.	197

77 : Diagrammes de Pareto sur les gains d'aire (A) et de hauteur (B) entre le méthanol et l'acétonitrile.	200
78 : Corrélation entre le gain d'aire et le point isoélectrique (A), la basicité en phase gaz (B) ou l'indice de Bull et Breese (C).	203
79 : Comparaison des gradients utilisés en acétonitrile (en bleu) et en méthanol afin de garder la même pente de solvant éluant (en noir) ou d'obtenir des temps de rétention similaires (en vert). .	205
80 : Chromatogrammes reconstitués de quatre peptides séparés avec une pente de 1,4 % de MeOH (A) ou d'ACN (B) par minute ou une pente de 3,6 % de MeOH par minute (C).	206
81 : Evolution de l'aire de quatre peptides en fonction du pourcentage de solvant organique (ACN ou MeOH) dans la phase mobile.	209
82 : Profils de pressions obtenus avec les conditions chromatographiques décrites au paragraphe II.3), page 197 pour l'acétonitrile (A) ou avec celles décrites au paragraphe III.2) page 204 pour le méthanol (B) comme modificateur organique.	212
83 : Chromatogrammes reconstitués des peptides LGPLV*EQGR (transition SRM 487,8 / 707,4) (A), EEFSPLR (transition SRM 439,2 / 472,3) (B), LSEPAELTDAVK (transition SRM 636,8 / 943,5) (C) et ILIPGVGK (transition SRM 398,8 / 457,2) (D) ajouté dans du sérum digéré à 0 ng / mL (1-3) ou proche de la limite de quantification (2-4) après séparation en utilisant l'ACN (en bleu) ou le MeOH (en vert).	213
84 : Mécanismes de rétention en HILIC (d'après Nguyen <i>et al.</i> , 2008 ³⁰).	218
85 : Chromatogrammes reconstitués de 6 peptides après séparation en présence de 10 mM de formiate d'ammonium et 0,1% d'acide formique dans la phase mobile sur une colonne de silice pure (A), zwitterionique (B) ou greffée par un groupement amide (C).	221
86 : Chromatogrammes reconstitués de six peptides après séparation en présence de 10 mM d'acétate d'ammonium et 0,1% d'acide formique dans la phase mobile sur une colonne de silice pure (A), zwitterionique (B) ou greffée par un groupement amide (C).	224
87 : Chromatogrammes reconstitués de six peptides après séparation en présence de 0,1 % d'acide formique dans la phase mobile sur une colonne de silice pure (A), zwitterionique (B) ou greffée par un groupement amide (C).	226
88 : Diagrammes de Pareto sur les gains d'aire (A) et de hauteur (B) entre l'HILIC et la phase inverse.	229
89 : Chromatogrammes reconstruits du peptide n°3 mono (rouge) et doublement (bleu) chargé en phase inverse (A) et en HILIC (B).	231
90 : Chromatogrammes reconstruits du peptide n°3 mono (rouge) et doublement (bleu) en HILIC avec 0 (A) ou 0,5% (B) de m-NBA dans la phase mobile.	234
91 : Diagrammes de Pareto sur les gains d'aire (A) et de hauteur (B) entre l'HILIC (en présence de 0,5% de m-NBA) et la phase inverse.	236
92 : Chromatogrammes reconstitués de quelques peptides étudiés après séparation en phase inverse (en haut) ou en HILIC avec 0,5% de m-NBA dans la phase mobile (en bas). Pour quatre peptides, deux transitions SRM sont représentées avec les gains d'intensité associés.	237
93 : Diagramme de Pareto sur les gains d'aire (en %) en phase inverse avec 0 ou 0,5% de m-NBA dans la phase mobile.	238
94 : Gammas des peptides LGPLV*EQGR (A), EEFSPLR (B) et ILIPGVGK (C) dans l'eau en phase inverse et en HILIC.	240

95 : Evolution de l'aire du pic chromatographique des peptides LGPLV*EQGR (A, D), EEFSPLR (B, E) et ILIPGVGK (C, F) en fonction du volume de solution injecté en phase inverse (A, B, C) ou en HILIC avec 0,5 % de m-NBA dans la phase mobile (D, E, F).	243
96 : Evolution de l'aire du pic chromatographique des peptides LGPLV*EQGR (A, D), EEFSPLR (B, E) et ILIPGVGK (C, F) en fonction du volume de sérum injecté en phase inverse (A, B, C) ou en HILIC avec 0,5 % de m-NBA dans la phase mobile (D, E, F).....	245
97 : Chromatogrammes reconstitués des neuf transitions SRM correspondant aux trois peptides LGPLV*EQGR, EEFSPLR et ILIPGVGK après injection de 0,5 µL (A, C) ou 10 µL (B, D) de sérum en phase inverse (A, B) ou en HILIC avec 0,5% de m-NBA dans la phase mobile (C, D). En HILIC, six interférents notés a, b, c, d, e et f sont représentés.	246
98 : Evolution de l'aire du pic chromatographique des peptides LGPLV*EQGR (A, D), EEFSPLR (B, E) et ILIPGVGK (C, F) en fonction du volume d'urine injectée en phase inverse (A, B, C) ou en HILIC avec 0,5 % de m-NBA dans la phase mobile (D, E, F).....	248
99 : Gammes des peptides LGPLV*EQGR (A), EEFSPLR (B) et ILIPGVGK (C) dans l'urine après séparation en HILIC ou en phase inverse.	250
100 : Séquence de l'apolipoprotéine E.....	265
101 : Matrice des valeurs propres et graphique correspondant à cette matrice.	277
102 : Projection des variables sur le cercle unité.....	278
103 : Projection des individus sur le plan défini par les deux premières composantes.	279

Liste des tableaux

1 : Résumé des stratégies mises en place pour abaisser les limites de quantifications par LC-MS/MS.	77
2 : Liste des 17 peptides recherchés avec le nombre de transitions SRM par peptide.	96
3 : Exactitudes (en %) associées aux gammes de peptide ILIPGVGK et ILIPGV*GK dans le solvant d'extraction.	107
4 : Exactitudes (en %) associées aux gammes de peptide VIGSVNSSPDR* dans le solvant d'extraction.	108
5 : Exactitudes (en %) associées aux gammes de peptide ILIPGVGK, ILIPGV*GK et VIGSVNSSPDR* chez les mâles.	111
6 : Exactitudes (en %) associées aux gammes de peptides ILIPGV*GK et VIGSVNSSPDR* chez les femelles.	113
7 : Effet matrice (en %) sur la réponse des peptides VIGSVNSSPDR* et ILIPGV*GK à deux niveaux de concentration chez les mâles et chez les femelles.	114
8 : Exactitudes (en %) associées aux gammes de peptide ILIPGV*GK dans le solvant d'extraction et chez les mâles après SPE.	119
9 : Liste des transitions SRM utilisées pour les peptides protéotypiques de l'Apolipoprotéine E totale et de l'Apolipoprotéine E4.	142
10 : Exactitudes associées aux courbes de la Figure 66.	166
11 : Exactitudes associées à la courbe de la Figure 67.	167
12 : Exactitudes et coefficients de variation associés aux gammes de la Figure 68.	169
13 : Exactitudes correspondant aux gammes de la Figure 68.	170
14 : Exactitudes et coefficients de variation intra-jour et inter-jour associés aux gammes de la Figure 68.	171
15 : Génotype des 40 plasmas utilisés pour réaliser l'échantillon servant de contrôle qualité.	173
16 : Moyennes et coefficients de variation des valeurs mesurées d'Apo E et d'Apo E4 sur les 51 préparations de l'échantillon contrôle qualité.	174
17 : Génotypes des 223 plasmas témoins et des 450 atteints de la maladie d'Alzheimer.	176
18 : Taux d'Apo E moyens mesurés chez les 449 individus atteints de la maladie d'Alzheimer en fonction du génotype.	176
19 : Taux moyens d'Apo E et d'Apo E4 chez les individus atteints de la maladie d'Alzheimer et chez les témoins en fonction du génotype.	179
20 : Liste des aires mesurées pour les 32 peptides en utilisant l'acétonitrile ou le méthanol comme phase mobile.	199
21 : Point isoélectrique, hydrophobicité et gain d'aire des 32 peptides étudiés.	202
22 : Largeurs moyennes des pics chromatographiques des 32 peptides étudiés et capacités de pics correspondant aux deux séparations.	204
23 : Aires mesurées et gain associés pour quatre peptides dans l'eau entre l'ACN et le MeOH (nouveau gradient).	207
24 : Propriétés physico-chimiques du méthanol, de l'acétonitrile et de l'eau.	207
25 : Evolution de la viscosité d'un mélange hydro-organique dans le cas de l'ACN et du MeOH à 25°C (d'après Colin <i>et al.</i> ²⁸⁹).	210

26 : Aires mesurées sans colonne en ACN et en MeOH avec les gains associés.....	211
27 : Comparaison des trois phases stationnaires en utilisant 10 mM de formiate d'ammonium dans la phase mobile.	222
28 : Comparaison des trois phases stationnaires en utilisant 10 mM d'acétate d'ammonium dans la phase mobile.	225
29 : Comparaison des trois phases stationnaires en utilisant 0,1% d'acide formique dans la phase mobile.....	227
30 : Intensités relatives des 6 peptides étudiés en fonction des phases mobiles et stationnaires. .	228
31 : Evolution des aires des ions mono et doublement chargés du peptide n°3 en phase inverse et en HILIC.....	231
32 : Evolution des aires des ions mono et doublement chargés du peptide n°3 en HILIC avec 0 ou 0,5% de m-NBA.....	234
33 : Exactitudes (en %) associées aux gammes de la Figure 94.	241
34 : Exactitudes (en %) associées aux gammes de la Figure 99.	251
35 : Liste des peptides tryptiques potentiels de l'apolipoprotéine E.	266
36 : Taux d'apolipoprotéine E mesuré chez les patients atteints de la maladie d'Alzheimer et portant le génotype $\epsilon 2/\epsilon 3$ ou $\epsilon 2/\epsilon 4$	271
37 : Première partie du rapport détaillé obtenu après utilisation de l'utilitaire d'analyse intitulé « analyse de variance : un facteur » sous Excel 2007.	272
38 : Seconde partie du rapport détaillé obtenu après utilisation de l'utilitaire d'analyse intitulé « analyse de variance : un facteur » sous Excel 2007.	272
39 : Tableau de Fisher-Snedecor pour un risque de 5%.....	274
40 : Valeurs des variables quantitatives discrètes utilisées.	276
41 : Matrice des corrélations entre les variables utilisées pour l'ACP.	277
42 : Matrice des facteurs.....	279

INTRODUCTION GENERALE

Aujourd'hui, il est important de disposer d'outils permettant d'attester de conditions anormales (physiologiques ou environnementales). Dans ce contexte, des marqueurs spécifiques de ces états anormaux doivent être trouvés et être présents dans des échantillons facilement accessibles. Ainsi, chez l'homme, on privilégiera des fluides comme le sang ou l'urine alors que pour un marqueur environnemental, il faudra se tourner vers des espèces sentinelles pouvant être rencontrées dans différentes régions. Parmi ces marqueurs, les protéines constituent une source de recherche importante car elles jouent des rôles primordiaux dans l'organisme comme le transport d'autres molécules d'un tissu à un autre. Il est donc indispensable de disposer de méthodes permettant de déterminer la concentration absolue de ces protéines dans la matrice sélectionnée. Actuellement, le dosage de marqueurs reconnus comme l'antigène spécifique de la prostate (PSA) chez l'homme dans le cas du cancer de la prostate se fait par des méthodes de référence telles que les méthodes immuno-enzymatiques. Cependant, le développement de nouveaux dosages par ELISA est très long à mettre au point et à valider (plusieurs mois) car il nécessite la production d'un (ou plusieurs) anticorps spécifique(s) de la protéine ciblée. Pour obtenir ces anticorps, un animal (généralement un lapin) est inoculé avec la molécule cible. Dans le cas des protéines, les chances de réussite pour obtenir un anticorps spécifique sont fortement augmentées lorsque la protéine entière est injectée dans l'animal. Des protéines pures sont cependant difficiles à obtenir. C'est pourquoi seulement un peptide de synthèse correspondant à une petite fraction de la protéine est parfois utilisé. Dans ce cas, l'obtention d'un anticorps spécifique de la protéine cible est encore plus délicate. Tout ceci engendre des coûts importants pour développer un dosage immuno-enzymatique. Bien que dans le domaine de la santé, ces coûts ne soient pas trop un frein car ils pourront être rentabilisés ultérieurement, ils représentent une grosse limitation dans le domaine environnemental. De ce fait, lorsqu'un anticorps dirigé contre une protéine est développé sur une espèce, il est généralement testé sur d'autres espèces pour voir s'il est possible de doser la même protéine mais le taux de réussite est généralement assez faible. Cette astuce est tout de même utilisée et peut être à l'origine de résultats peu fiables.

Lorsqu'un marqueur est connu et que l'anticorps est disponible, les méthodes immuno-enzymatiques sont privilégiées pour le dosage en routine car elles permettent d'avoir une quantification rapide et automatisable. En revanche, s'il faut doser des centaines ou des milliers de protéines simultanément (ce qui est le cas dans la recherche de candidats pour découvrir un nouveau biomarqueur), il est inconcevable de développer un anticorps pour chaque protéine. Dans ce cas, il est nécessaire de développer des méthodes alternatives de dosage. Dans ce contexte, la chromatographie en phase liquide couplée à la spectrométrie de masse en tandem (LC-MS/MS) est devenue une alternative crédible aux dosages immuno-enzymatiques. Dans cette approche, les protéines sont d'abord digérées par une enzyme afin de générer des peptides. Ensuite, ces peptides sont séparés par chromatographie en phase liquide et quantifiés par spectrométrie de masse en mode de suivi de réaction sélectionnée (« Selected Reaction Monitoring » en anglais qui donne l'abréviation SRM). Si l'on prend l'exemple du plasma, l'une des difficultés dans cette approche par rapport à l'analyse de petites molécules réside dans la grande gamme dynamique des protéines plasmatiques ce qui va gêner la détection des protéines minoritaires par spectrométrie de masse (ce qui n'est généralement pas le cas lors d'un dosage de petites molécules puisque les protéines qui présentent des propriétés physico-chimiques très différentes des analytes sont éliminées de la matrice). La quantification de protéines par LC-MS/MS est cependant une technique jeune et en plein essor. En effet, il y a

quelques années, les limites de quantification étaient de l'ordre du microgramme de protéine par millilitre de plasma. Actuellement, ces limites sont situées autour du nanogramme de protéine par millilitre de plasma, ce qui est encore au-dessus des limites atteintes avec les dosages immuno-enzymatiques. Tout moyen permettant d'améliorer la sensibilité des dosages par LC-MS/MS présente donc un fort intérêt. Les dosages de protéines par spectrométrie de masse souffrent d'autres limitations liées au fait que la quantification se fasse sur un peptide et non sur la protéine entière. D'abord, le dosage d'une même protéine peut se faire par le biais de différents peptides rapporteurs ce qui peut rendre difficile la comparaison des méthodes de dosage mises en place par différents laboratoires. En effet, la sensibilité finale de la méthode va notamment dépendre de la réponse intrinsèque du peptide en électrospray. Ce nombre de peptides potentiels peut cependant être assez faible pour des petites protéines ou peut même être égal à un. Dans ce cas, une autre difficulté se dresse si ce peptide peut subir des modifications post traductionnelles (comme des phosphorylations ou des glycosylations) ou des modifications chimiques. En effet, par LC-MS/MS, un rapport masse sur charge est mesuré. Ainsi, si le peptide est modifié, sa masse va changer et il ne sera alors plus détecté. Afin d'éviter cette absence de détection du peptide modifié, une étape supplémentaire de préparation d'échantillons doit alors être introduite pour que tous les peptides portent la même modification. Le peptide va ainsi se trouver sous une seule forme. La quantité de peptide détecté reflètera donc la quantité totale de la protéine cible présente dans le mélange et non pas seulement la quantité de protéine cible ne présentant pas la modification post traductionnelle sur le peptide rapporteur choisi.

Les objectifs de ce travail de thèse sont donc d'une part le développement de méthodes de quantification de biomarqueurs protéiques par spectrométrie de masse et d'autre part la recherche de moyens permettant de diminuer les limites de détection par LC-MS/MS. Concernant l'aspect du développement de méthodes de dosage, deux protéines ont été étudiées. D'abord, dans le cadre du Plan National de Recherche sur les Perturbateurs Endocriniens (PNRPE) lancé en 2005, une protéine (la vitellogénine) impliquée dans la reproduction d'un crustacé (*Gammarus fossarum*) a été dosée. Cette étude présente un intérêt majeur en écotoxicologie car les invertébrés sont peu étudiés bien qu'ils représentent plus de 95% des organismes vivants. De plus, aucune méthode directe de quantification absolue de cette protéine n'est disponible. L'un des grands défis de la méthode présentée est de doser de façon spécifique une protéine dans un organisme pour lequel le génome est très majoritairement inconnu. Le but ultime de ce dosage est ensuite de suivre l'évolution de l'expression de la vitellogénine afin de déterminer si des perturbateurs endocriniens ont été présents dans le milieu environnemental. L'objectif est donc plutôt de s'intéresser aux effets d'une pollution que de déterminer la nature du polluant, surtout si ce dernier a disparu.

La seconde protéine étudiée va permettre de traiter d'un cas problématique en spectrométrie de masse : il s'agit de la présence d'une méthionine dans le peptide étudié. En effet, les méthionines peuvent s'oxyder ce qui représente à ce jour une grosse limitation en spectrométrie de masse puisque cette oxydation n'est généralement pas maîtrisée. Par conséquent, elle va engendrer un biais dans le dosage. La méthode ainsi développée a été appliquée à la quantification d'une protéine plasmatique (l'apolipoprotéine E) et à l'un de ses isoformes majoritaires (l'apolipoprotéine E4) qui présenterait un intérêt majeur dans la maladie d'Alzheimer. Cependant, le seul peptide disponible après digestion par de la trypsine pour quantifier l'isoforme E4 contient une méthionine. L'objectif de l'étude a donc été de s'affranchir du problème lié à la méthionine et de réaliser un dosage de cette

protéine dans une cohorte de patients atteints de la maladie d'Alzheimer (n = 673) afin de déterminer si la concentration plasmatique de cette protéine permet de dépister la maladie d'Alzheimer.

Enfin, la dernière partie de ce travail a consisté en l'étude de l'impact de la chromatographie liquide, et plus particulièrement de l'influence de la phase mobile sur la sensibilité du dosage par spectrométrie de masse. En effet, la séparation chromatographique est souvent négligée. Cette étude a été divisée en deux parties : d'abord l'influence du solvant (acétonitrile ou méthanol) en phase inverse, qui est le mode de séparation utilisé par défaut. Ensuite, un autre mode de séparation a été évalué : il s'agit de la chromatographie liquide d'interactions hydrophiles (HILIC) qui a déjà montré un grand potentiel dans l'analyse de petites molécules. En revanche, à ce jour, aucune étude sur l'intérêt de ce mode de séparation pour la quantification absolue de peptides n'a été réalisée.

Avant de présenter ces résultats, nous allons dans un premier temps revenir sur le principe de la quantification de protéines par spectrométrie de masse.

CHAPITRE I : ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE

L'objectif de ce chapitre est de présenter l'intérêt des biomarqueurs protéiques et leur quantification en s'attachant plus particulièrement à ceux analysés par spectrométrie de masse. Dans une première partie, la notion de biomarqueur sera donc définie puis les différentes étapes permettant de valider un biomarqueur seront abordées. Ensuite, le rôle de la spectrométrie de masse dans la quantification sera développé. Enfin, la méthodologie pour quantifier une protéine par spectrométrie de masse sera détaillée.

I) Les biomarqueurs

Les biomarqueurs présentent un intérêt croissant au cours de ces dernières décennies comme l'atteste la Figure 1. En effet, la recherche du nombre de publications contenant le terme « biomarker » dans PubMed au cours des vingt-cinq dernières années montre que ce nombre est en accroissement permanent :

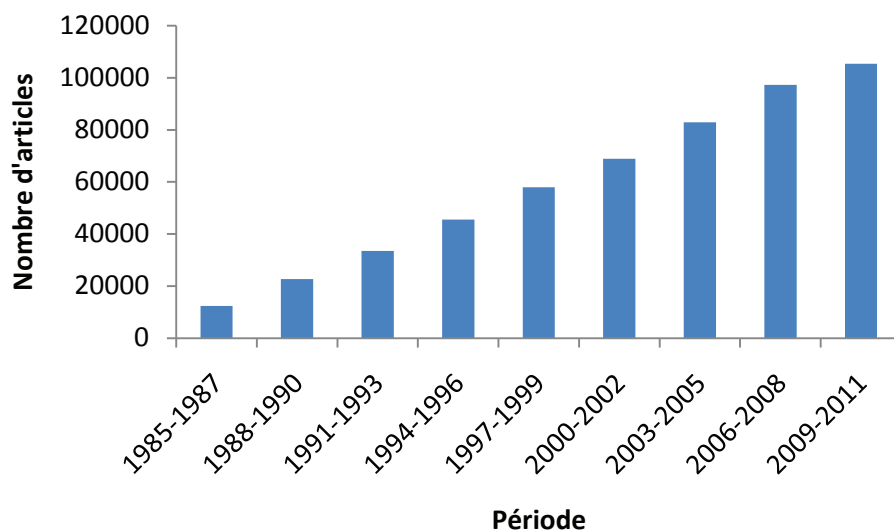


Figure 1 : Nombre d'articles listés dans PubMed depuis 25 ans et contenant le terme « biomarker ».

Afin de comprendre l'intérêt croissant concernant la recherche sur les biomarqueurs, revenons d'abord sur leur définition.

I.1) Définitions

Dans le domaine de la santé, un biomarqueur est une caractéristique qui est mesurée objectivement et évaluée comme un indicateur de processus biologique normal, pathologique ou de réponse

pharmacologique à un agent thérapeutique. Un biomarqueur peut permettre (i) une détection plus précoce d'une maladie, (ii) d'augmenter la sélection des patients qui répondent préférentiellement à des cibles thérapeutiques et (iii) un suivi en temps réel ou même une prédiction de l'efficacité d'un traitement¹.

Un test idéal de diagnostic de biomarqueur doit être rapide, facile à réaliser et permettre la détection précoce d'une maladie, préférentiellement avec 100% de sensibilité et de spécificité. La sensibilité est définie par :

$$\text{sensibilité} = \frac{\text{nombre de vrais positifs} \times 100}{\text{nombre de vrais positifs} + \text{nombre de faux négatifs}}$$

Et la spécificité est donnée par :

$$\text{spécificité} = \frac{\text{nombre de vrais négatifs} \times 100}{\text{nombre de vrais négatifs} + \text{nombre de faux positifs}}$$

Pour avoir le plus grand impact, un biomarqueur doit être accessible par un prélèvement le moins invasif possible (par exemple dans l'urine ou le sang). Le dosage doit également permettre de suivre des milliers d'échantillons à haut débit et à un coût raisonnable en utilisant des équipements accessibles².

Dans le domaine environnemental, le rôle d'un biomarqueur est de dépister une pollution ou de suivre son évolution. Ce dépistage et ce suivi se font en mesurant l'impact des polluants sur la faune et la flore. Un exemple de biomarqueur environnemental de la perturbation endocrinienne sera présenté dans le deuxième chapitre de ce manuscrit.

I.2) Les différentes familles de biomarqueurs

On distingue quatre grandes catégories de biomarqueurs :

- L'Acide DésoxyriboNucléique (ADN) : il permet d'évaluer des prédispositions génétiques à une maladie (variants génétiques ...), la présence de méthylations³.
- L'Acide RiboNucléique (ARN) : la quantité d'ARN exprimée peut servir d'indicateur. Les différences d'épissage peuvent également être utilisées comme biomarqueur.
- Les petites molécules (métabolites, hormones...) : elles reflètent l'activité de la cellule⁴
- Les protéines : elles sont le reflet de l'expression des gènes et sont retrouvées dans des matrices facilement accessibles comme le sang. Leur taux d'expression ou leurs modifications post-traductionnelles (taux de phosphorylation, de glycosylation, protéines inactives...) peuvent être révélateurs d'une pathologie. Par exemple, un taux élevé d'antigène spécifique de la prostate (PSA) est corrélé à un risque très important de développer un cancer de la prostate.

Ce travail de thèse s'est intéressé exclusivement aux biomarqueurs de nature protéique. La validation des biomarqueurs se déroule en plusieurs étapes que nous allons à présent détailler.

I.3) La validation de nouveaux biomarqueurs

Parmi les différentes matrices biologiques où l'on peut retrouver des biomarqueurs, le sang est une matrice assez facilement accessible. Il y a trois principales difficultés dans la découverte d'un biomarqueur protéique dans le sang : la complexité du plasma, la faible abondance de biomarqueurs spécifiques de maladies et la grande variabilité biologique (*i.e.* deux individus sains peuvent présenter des concentrations assez variables de la même protéine). Le groupe de S.A. Carr a décrit un processus détaillé pour la validation de biomarqueurs à travers six étapes successives : la découverte, la qualification, la vérification, l'optimisation, la validation clinique et la commercialisation⁵. Une partie de ces étapes est représentée dans la Figure 2 :

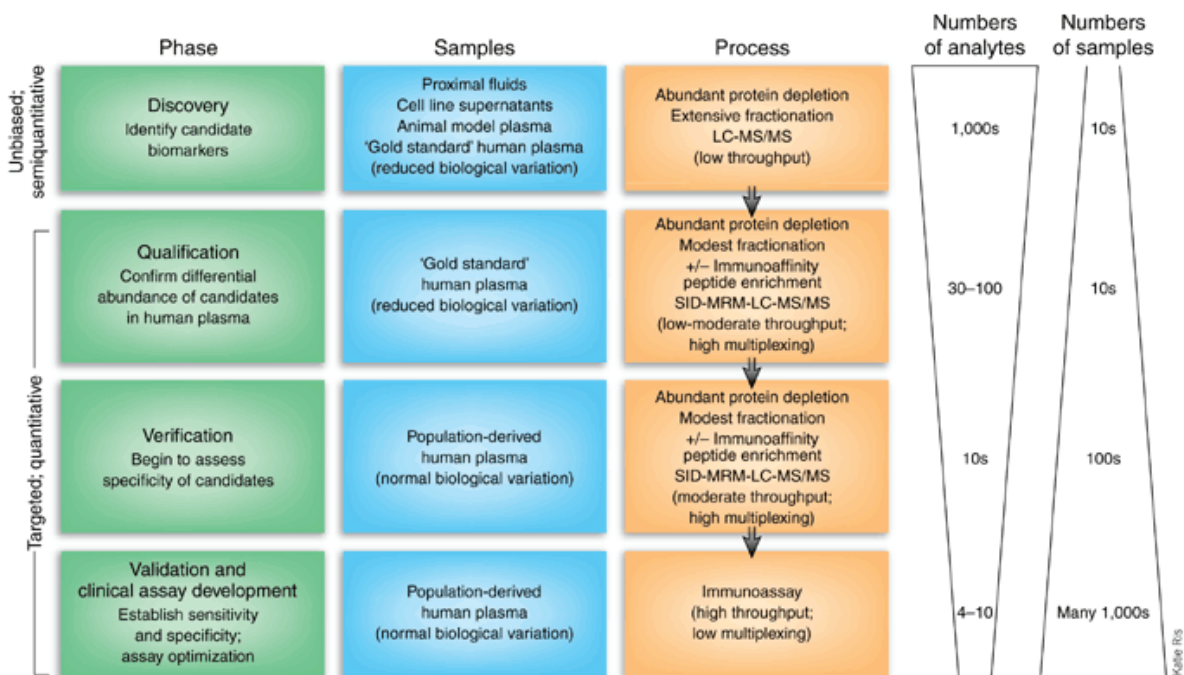


Figure 2 : Les étapes du développement d'un nouveau biomarqueur (d'après Rifai *et al.*⁵).

La phase de découverte permet de lister les protéines qui sont exprimées de façon différente entre un état sain et un état malade. Elle se fait généralement sur l'analyse de peu d'échantillons (quelques dizaines) et permet de lister jusqu'à plusieurs centaines de protéines candidates. Les échantillons utilisés peuvent être des modèles (des souris ou des lignées cellulaires) ou une variété de fluides et de tissus humains. A ce niveau, des méthodes de quantification relative sont employées. L'ensemble de ces méthodes sera détaillée ultérieurement.

L'étape de qualification permet de réduire le nombre de candidats avec peu d'échantillons en recherchant les protéines découvertes précédemment dans du plasma. Cette étape permet de vérifier la présence des candidats biomarqueurs dans le plasma (qui est le milieu à partir duquel se fera la recherche finale) et de confirmer la différence d'expression observée précédemment. Elle permet également d'utiliser des méthodes plus robustes afin de diminuer la variabilité technique. Des méthodes plus robustes sont nécessaires puisque les variations mesurées dans le plasma (si ces variations existent) seront plus faibles que celles déterminées précédemment.

L'étape de vérification se fait sur plusieurs centaines de patients qui englobent les variations génétiques, environnementales et biologiques de la population qui sera testée. Cette étape permet de confirmer que des différences existent toujours entre les échantillons témoins et malades lorsque la variabilité biologique est plus importante. A l'issue de la vérification, il ne reste alors généralement plus que quelques candidats. Les résultats devront ensuite être validés à plus grande échelle.

Eventuellement, une étape d'optimisation de la méthode est ajoutée à ce niveau. Elle permet d'abaisser les limites de détection tout en conservant une bonne reproductibilité et un haut débit d'analyse. Des anticorps dirigés contre les quelques candidats peuvent alors être développés à cette étape.

Ensuite, l'étape de validation permet de tester la méthode finale sur plusieurs milliers d'échantillons qui vont refléter toutes les variations possibles d'une population. Cette étape permet d'établir la sensibilité (*i.e.* la probabilité qu'un échantillon malade soit reconnu en tant que tel) et la spécificité (*i.e.* la probabilité qu'un échantillon sain soit reconnu en tant que tel) du candidat sur une cohorte présentant la plus grande variation possible.

Enfin, si un candidat est retenu, il pourra être commercialisé à des fins cliniques et diagnostiques.

Que la finalité du biomarqueur soit d'ordre environnemental ou du domaine de la santé publique, la quantification de celui-ci est réalisée selon le même procédé. Pour des raisons de coût, de spécificité et de sensibilité, les méthodes finales de référence font appel aux méthodes immuno-enzymatiques. Ces dernières années, du fait des récents développements technologiques (sensibilité, vitesse de balayage...), la spectrométrie de masse est devenue une alternative crédible aux dosages immuno-enzymatiques. Le principe de ces deux méthodes va être développé dans le paragraphe suivant.

II) La quantification des protéines

II.1) Par des méthodes à base d'anticorps

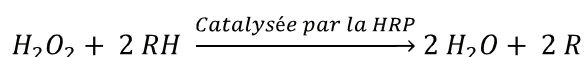
II.1.1) Après électrophorèse sur gel de polyacrylamide en deux dimensions

Cette technique a été introduite par O'Farrell en 1975⁶ et consiste en la séparation de protéines selon leur point isoélectrique (qui est le pH auquel la protéine est globalement non chargée) dans une première dimension puis selon leur masse dans une seconde dimension.

Pour séparer les protéines selon leur point isoélectrique, une différence de potentiel est appliquée entre deux électrodes et les protéines chargées migrent à travers un gel dont le pH varie d'une extrémité à l'autre. Ainsi, lorsque la protéine arrive dans la zone de pH correspondant à son point isoélectrique, elle devient neutre et sa migration s'arrête. On parle de focalisation isoélectrique (IEF). Dans un second temps, un agent dénaturant comme le dodécyle sulfate de sodium (SDS) est ajouté. Le SDS va se fixer sur les protéines proportionnellement à leur masse moléculaire. Ensuite, une autre différence de potentiel entre deux électrodes est appliquée perpendiculairement à la première. Puisque le SDS est chargé négativement et qu'un grand nombre de molécules de SDS est fixé sur une protéine, le nombre de charges initialement présentes sur la protéine a peu d'influence sur la séparation. Par conséquent, la séparation dans la seconde dimension dépend de la charge totale liée au nombre de molécules de SDS fixées et donc de la masse de la molécule d'intérêt. Les protéines migrent alors à travers un gel et sont ralenties selon leur rapport masse sur charge : plus une protéine a un rapport masse sur charge élevé et plus elle sera ralentie. Avec des gels en deux dimensions (gels 2D) à haute résolution, jusqu'à 10 000 protéines peuvent ainsi être séparées⁷.

Après séparation, les protéines doivent être révélées. Différentes techniques de coloration existent comme le bleu de Coomassie ou l'argent. La quantité de protéine est alors proportionnelle à l'intensité de la bande colorée : de 10 à 200 ng de protéine par mm² pour le bleu de Coomassie et de 0,04 à 2 ng / mm² pour l'argent.

Pour une analyse plus sensible et plus spécifique, les protéines peuvent être détectées par des anticorps. Dans ce cas, après leur séparation, les protéines sont transférées sur une membrane (par exemple en polyvinylidène difluorure (PVDF)) : on parle alors de « Western blot ». Les membranes sont ensuite incubées en présence d'un anticorps primaire dirigé contre la protéine d'intérêt. Ensuite, un anticorps secondaire dirigé contre la région constante de l'anticorps primaire est ajouté. Cet anticorps secondaire est couplé à une enzyme comme la peroxydase de Raifort, encore appelée horseradish peroxydase (HRP). La HRP va catalyser la formation d'eau à partir de peroxyde d'hydrogène en présence d'un réducteur qui sera alors oxydé comme le montre le bilan réactionnel suivant :



Si la formation de l'oxydant R est accompagnée d'une émission de photons, ces derniers pourront être révélés sur un film photographique et quantifiés par densitométrie sachant que la quantité de photons émis sera directement proportionnelle à la quantité de protéine présente dans le milieu.

Les limitations des séparations sur gel 2D concernent d'une part les protéines hydrophobes comme les protéines membranaires qui sont difficiles à solubiliser et d'autre part, les protéines très basiques. Ces dernières lient le SDS par des liaisons électrostatiques à cause de la charge résiduelle des groupements basiques et non par des liaisons hydrophobes ce qui va modifier leur migration⁸. Un gros inconvénient supplémentaire des gels 2D est la durée d'analyse qui est comprise entre 48 et 72h par échantillon.

II.1.2) Dosage par ELISA

Cette méthode dont l'acronyme signifie « Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay » a été développée au début des années 1970 parallèlement par un groupe suédois⁹ et un groupe hollandais¹⁰. Cette méthode fait appel à l'utilisation d'un anticorps. Ainsi, Engvall et Perlmann ont quantifié l'immunoglobuline G dans du sérum de lapin après avoir couplé leur anticorps à la phosphatase alcaline alors que van Weemen et Schuurs ont quantifié l'hormone chorionique gonadotrophique humaine dans de l'urine en couplant l'anticorps à la peroxydase de Raifort.

Il existe trois méthodes de dosages par ELISA :

(i) l'ELISA en sandwich : une quantité connue d'anticorps (dits anticorps de capture) dirigés contre la protéine d'intérêt est fixée sur une surface (par exemple, le puits d'une plaque 96 puits). L'échantillon est ajouté ce qui va engendrer la fixation de l'analyte sur l'anticorps de capture. Un second anticorps lié à une enzyme et dirigé contre la protéine d'intérêt est alors ajouté. Un substrat est additionné et va être converti par l'enzyme liée au second anticorps. Cette conversion est accompagnée de l'émission de photons qui seront détectés. Le nombre de photons émis est donc proportionnel à la concentration de la protéine d'intérêt.

(ii) l'ELISA indirect : l'antigène est mis au contact d'une surface sur laquelle il va se fixer. L'anticorps dirigé contre la protéine d'intérêt est ajouté et va se lier à cette protéine. Puis, un second anticorps dirigé contre le premier anticorps est ajouté. Le second anticorps est également lié à une enzyme. Un substrat de l'enzyme est aussi additionné et les photons émis sont détectés.

(iii) l'ELISA par compétition : un antigène marqué est ajouté dans l'échantillon contenant l'antigène à doser. L'ensemble est transféré dans une plaque contenant un défaut d'anticorps dirigés contre l'antigène. Il va donc y avoir une compétition entre l'antigène à doser et l'antigène marqué pour se fixer sur les anticorps. Après élimination des réactifs non fixés (antigènes marqués et non marqués en excès), le signal est mesuré. Puisque le signal provient exclusivement de l'antigène marqué, plus le signal est important, plus d'antigène marqué est lié aux anticorps. Or, plus la quantité d'antigène marqué liée est importante, moins la quantité initiale d'antigène issu de l'échantillon est grande. En d'autres termes, le signal mesuré diminue lorsque la quantité d'analyte à doser augmente.

Actuellement, les dosages par ELISA constituent les méthodes de référence pour la quantification absolue de protéines. Ceci est dû en partie à leur grande spécificité, leur limite de quantification basse (inférieure au ng de protéine par mL de plasma), et leur facilité d'automatisation.

Cependant, ces méthodes souffrent de quelques lacunes. En effet, la plus grande difficulté dans la mise en place d'un dosage par ELISA est rencontrée lorsque l'anticorps dirigé contre la protéine d'intérêt n'est pas disponible, ce qui est le cas pour la majorité des protéines. De plus, 50 à 60% des anticorps commerciaux disponibles n'ont pas été suffisamment validés pour être utilisés à des fins cliniques¹¹. Il faut également garder à l'esprit que, dans le cas où l'anticorps n'est pas disponible, le développement d'un test va coûter plusieurs dizaines de milliers d'euros et prendre au minimum un an (pour une seule protéine)¹². Enfin, lorsque des anticorps sont disponibles, les dosages par ELISA peuvent rencontrer quelques difficultés. Par exemple, des résultats variables peuvent être obtenus en utilisant deux anticorps différents dirigés contre la même protéine. Par exemple, Rawlins et Roberts ont comparé six anticorps pour doser la thyroïdostimuline (TSH) dans le sérum. Leurs résultats

indiquent que le taux mesuré varie de 0,0014 à 0,0203 mIU/L pour un même échantillon¹³. L'échantillon à doser peut également contenir des auto-anticorps. Dans ce cas, des anticorps présents dans l'échantillon vont reconnaître l'épitope de la protéine à doser. Par conséquent, la protéine ne va pas se lier à l'anticorps ajouté lors du dosage puisque le site de liaison sera occupé par l'auto-anticorps. Les résultats du dosage seront alors augmentés (dans le cas d'un ELISA par compétition) ou diminués (dans le cas d'un ELISA en sandwich). Ces auto-anticorps ont notamment été mis en évidence lors du dosage du PSA¹⁴.

Un autre biais lors d'un dosage par ELISA en sandwich peut se produire lorsqu'un anticorps présent dans l'échantillon va se fixer d'une part sur l'anticorps greffé sur une surface et d'autre part sur l'anticorps ajouté après l'échantillon. En d'autres termes, l'anticorps interférent va se comporter comme la protéine à doser ce qui va engendrer une surestimation du taux de protéine d'intérêt. Ce phénomène a déjà été rencontré lors du dosage de la thyroglobuline¹⁵.

Enfin, il peut arriver que les anticorps fixés sur le support soient saturés par l'analyte ce qui empêche la formation du sandwich. On parle alors d'effet « d'hameçon » car lorsque la concentration d'analyte augmente, le signal commence à saturer puis à diminuer. La forme de la courbe reportant l'intensité du signal en fonction de la concentration ressemble alors à un hameçon. Dans ce cas, la concentration déterminée est sous estimée. Cet effet a été reporté entre autres lors du dosage de la prolactine dans le sérum¹⁶.

Afin de bien valider et conforter sa méthode ELISA, disposer de méthodes alternatives est indispensable. Comme nous l'avons mentionné précédemment, une autre méthode également très spécifique peut être utilisée pour doser les protéines : il s'agit de la spectrométrie de masse. En effet, nous avons montré au laboratoire que les résultats obtenus en spectrométrie de masse étaient similaires à ceux obtenus par ELISA¹⁷. Le principe de cette approche va maintenant être décrit.

II.2) Par spectrométrie de masse

II.2.1) Principe de la quantification de protéines par spectrométrie de masse

En spectrométrie de masse, les protéines ne sont pas quantifiées sous forme de protéine mais sous forme de peptides qui sont obtenus après l'action d'une enzyme de digestion. De la même façon qu'une protéine, un peptide est un enchaînement d'acides aminés liés entre eux par des liaisons amides mais un peptide est constitué de moins de cinquante acides aminés alors qu'une protéine en comporte plus de cent. Entre les deux, le terme de polypeptide est employé.

Le principe de la quantification des protéines par spectrométrie de masse est décrit sur la figure suivante :

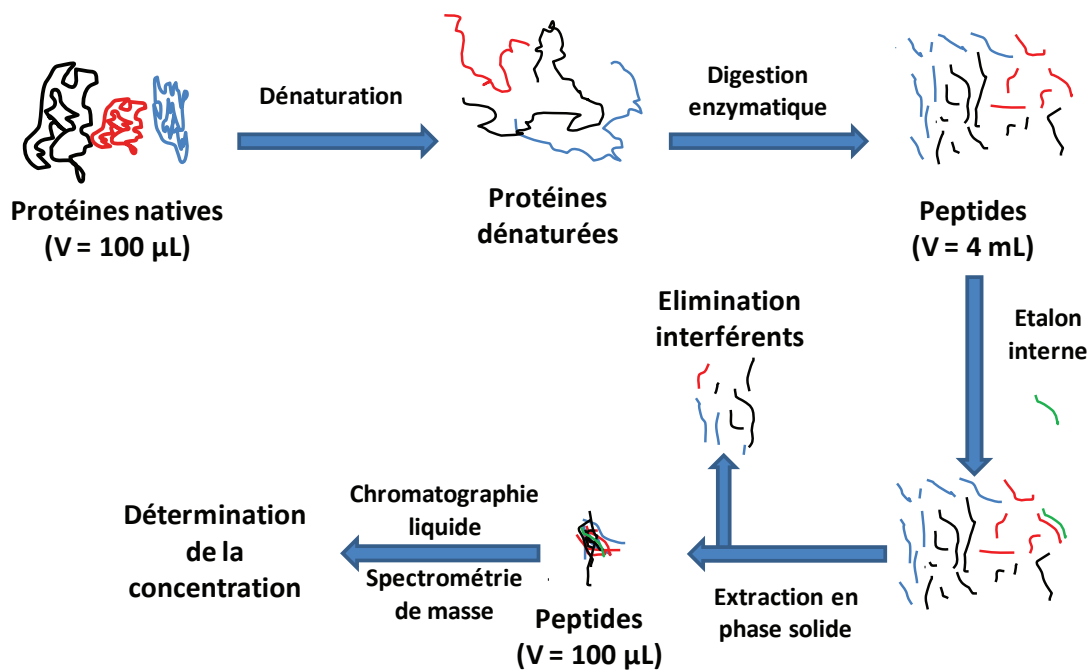


Figure 3 : Principe du dosage de protéines par spectrométrie de masse.

Afin de générer des peptides, la protéine doit être digérée par une enzyme. Cependant, les protéines possèdent des structures secondaires et tertiaires qui vont limiter l'accès de l'enzyme aux sites d'hydrolyse. Ces structures sont permises par des liaisons hydrogènes et par des ponts disulfures. Les protéines doivent donc d'abord être déstructurées : il s'agit de l'étape de dénaturation. La rupture des liaisons hydrogènes peut se faire en chauffant l'échantillon (autour de 95°C), en présence d'agents chaotropes (tels que l'urée ou l'hydrochlorure de guanidine), de détergents (comme le dodécyle sulfate de sodium (SDS) ou le déoxycholate de sodium) ou de solvants organiques.

La dénaturation thermique est cependant évitée puisqu'elle engendre la formation d'agrégats de protéines. En effet, l'énergie thermique apportée va permettre de rompre les liaisons hydrogènes au sein de chaque protéine. Ainsi, la protéine va se délier et les sites hydrophobes qui étaient enfouis au cœur de la protéine vont être exposés à des sites hydrophobes d'autres protéines ce qui va former des agrégats. Pour éviter la formation de ces agrégats, cette dénaturation doit être réalisée en présence de SDS. Ce protocole est très courant lors de l'analyse par électrophorèse sur gel de polyacrylamide mais est évité si l'échantillon doit être analysé par spectrométrie de masse sans être au préalable purifié sur un gel. En effet, les détergents non volatils comme le SDS ne sont pas compatibles avec la spectrométrie de masse. Cependant, pour pallier ce problème, des détergents clivables en présence d'acide (tels que le 4-[(2-méthyl-2-undécyl-1,3-dioxolan-4-yl) méthoxyl]-1-propane sulfonate de sodium, nommé ALS-1) ont été introduits en 1999¹⁸.

La dénaturation par solvant organique peut être problématique puisque les protéines peuvent précipiter en présence de ces solvants.

La dénaturation par des agents chaotropes, notamment par l'urée est donc la plus largement utilisée en l'absence d'électrophorèse sur gel. Il faut cependant éviter de chauffer les échantillons puisque l'urée peut s'hydrolyser en isocyanate. Ce dernier peut alors entraîner la carbamylation des amines libres sur les protéines¹⁹.

D'autre part, afin de faciliter l'accès de l'enzyme de digestion aux sites de clivage, les ponts disulfures éventuellement présents doivent être rompus. Pour ce faire, des agents réducteurs tels que le dithiothréitol (DTT) ou la tris-(2-carboxyéthyl)phosphine (TCEP) sont ajoutés. Afin d'éviter la formation de nouveaux ponts disulfures, les fonctions thiol libérées sont bloquées par alkylation (après réaction avec un agent alkylant tel que l'iodoacétamide (IAM)).

Enfin, l'enzyme de digestion, généralement la trypsine issue du pancréas de porc est ajoutée. La trypsine est une protéine de 24 kDa. Son activité optimale se situe à un pH avoisinant 8,1 et à une température de 37°C. La quantité massique de trypsine recommandée varie de 1/20 à 1/100 par rapport à la quantité totale (en masse) de protéines. Les échantillons sont alors incubés pendant une durée allant généralement de 8 à 16h selon la complexité de l'échantillon et la faculté de la protéine d'intérêt à se digérer plus ou moins facilement²⁰. Des concentrations d'enzyme plus élevées produisent des temps de réaction plus courts mais vont augmenter la concentration des peptides issus de l'autolyse de l'enzyme. Ceci résulte en une perte de sensibilité du dosage à cause d'une augmentation de l'effet matrice.²¹ L'origine de cet effet matrice ainsi que les façons de l'évaluer seront détaillées plus loin. Ce problème peut cependant être évité par l'utilisation de trypsine méthylée qui empêche l'autolyse de la trypsine. De plus, cette trypsine peut être utilisée à des températures plus élevées²². Cependant, compte-tenu de son prix élevé (77 euros pour 100 µg ; sachant qu'environ 200 µg de trypsine sont ajoutés pour digérer 100 µL de plasma), la trypsine non modifiée est préférée. A l'issue de la digestion enzymatique, le mélange peptidique est alors séparé par chromatographie en phase liquide puis analysé par un spectromètre de masse.

II.2.2) Description d'un spectromètre de masse

La spectrométrie de masse est une technique permettant de mesurer le rapport masse sur charge d'un ion en phase gazeuse. Un spectromètre de masse est constitué d'une source, d'un analyseur et d'un détecteur. L'ensemble est relié à un ordinateur afin de traiter le signal détecté. Puisque la réponse du détecteur dépend de la quantité d'ions présents, une quantification par spectrométrie de masse sera permise.

II.2.2.1) Les sources d'ionisation

Le rôle de la source d'ionisation est de générer des molécules chargées en phase gazeuse afin qu'elles puissent être analysées par la suite. Il existe de nombreuses sources d'ionisation. Certaines sont plus adaptées à l'analyse de petites molécules. C'est le cas par exemple des sources à impact électronique²³ ou à ionisation chimique²⁴ lors d'un couplage avec la chromatographie en phase gazeuse. Pour l'analyse de peptides, deux sources d'ionisation sont principalement utilisées : le MALDI (« Matrix Assisted Laser Desorption Ionization ») et l'ESI (« Electrospray Ionization »).

II.2.2.1.1) La désorption / ionisation laser assistée par matrice (MALDI)

En 1988, Karas et Hillenkamp²⁵ introduisent une nouvelle source d'ionisation pour l'analyse de molécules de plusieurs milliers de Daltons : la source MALDI. Cette technique nécessite la présence d'une matrice qui joue un rôle primordial. Cette matrice est composée de petites molécules organiques telles que l'acide α -cyano-4-hydroxycinnamique (appelé CHCA) ou l'acide 2,5-dihydroxybenzoïque (appelé DHB). Dans un premier temps, l'échantillon est mélangé avec la matrice et est déposé sur une plaque. L'évaporation du solvant résulte en la cristallisation de la matrice qui enferme l'analyte. Dans un second temps, la plaque est mise sous vide et une impulsion laser (généralement avec une longueur d'onde située dans l'UV) va être envoyée sur l'échantillon. Ce rayonnement va être absorbé par la matrice ce qui va provoquer d'une part l'ionisation de la matrice, et d'autre part sa sublimation. Lors de son passage en phase gazeuse, la matrice entraîne également l'analyte. L'ionisation de l'analyte se produit soit en phase solide, soit en phase gazeuse. En MALDI, on observe généralement des espèces monochargées. Cette source couplée à un analyseur de type temps de vol est encore très utilisée de nos jours en protéomique puisqu'elle permet d'identifier assez facilement les protéines présentes dans un échantillon.

L'ionisation par MALDI a été plus récemment appliquée en imagerie²⁶. Dans ce cas, des coupes de tissu sont directement déposées sur la plaque puis la matrice est ajoutée. Puisqu'un faisceau laser est à l'origine de l'ionisation et qu'il peut être dirigé précisément sur l'échantillon, une analyse de l'échantillon point par point permet de reconstruire une image en fonction de l'intensité des ions détectés.

II.2.2.1.2) L'ionisation par électrospray

Le principe de l'ionisation par électrospray (ESI) a été présenté il y a un peu plus de 40 ans par Dole²⁷. En 1984, Yamashita et Fenn²⁸ ont combiné avec succès l'ESI avec la MS mais la vraie percée de l'ESI a pris place en 1989 quand Fenn *et al.* l'ont appliquée à l'analyse de larges biomolécules²⁹. Ce travail a été honoré par le prix Nobel de chimie en 2002. Un énorme avantage de l'électrospray pour l'analyse de grosses molécules est la possibilité de générer des espèces multichargées. En effet, après ionisation, la molécule d'intérêt traverse un analyseur qui va déterminer le rapport masse sur charge de cette molécule. Or la plupart des analyseurs ne permettent pas la mesure de rapports masse sur charge supérieurs à 4 000. En d'autres termes, si seulement des espèces mono chargées étaient générées dans la source d'ionisation, les limites de mesure de la masse seraient de 4 000 Da ce qui ne permettrait pas d'analyser de nombreuses protéines ou de grands peptides sur la plupart des analyseurs.

Le principe de l'électrospray est représenté sur la Figure 4 :

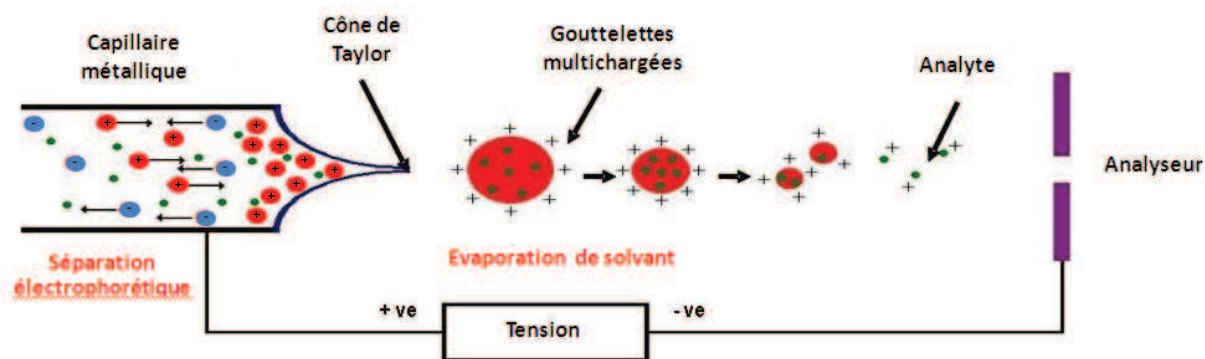


Figure 4 : Principe de l'ionisation par électrospray.

La première étape dans le procédé ESI est la séparation de charge qui est réalisée avec un fort champ électrique à la pointe de l'électrode (capillaire métallique). L'efficacité de la séparation de charge peut être mesurée par le courant de spray, qui est dépendant de la conductivité du solvant. Le procédé de séparation de charge est dominé par la migration électrophorétique des espèces ioniques dans le solvant et résulte en la formation de gouttelettes chargées. En mode positif, les cations sont attirés vers la pointe de l'électrode où il y a la formation d'un cône appelé cône de Taylor. Les molécules neutres se dirigent également vers la pointe grâce au débit de phase mobile imposé. Le champ électrique (V_{onset} , en Volt) nécessaire pour l'apparition de gouttes enrichies en cations est défini par la relation suivante :

$$V_{onset} = 2 \times 10^5 \cdot \sqrt{\gamma \cdot r_c} \cdot \ln \frac{4d}{r_c}$$
 avec γ la tension de surface du solvant (en N/m), r_c le rayon du capillaire (en m) et d la distance jusqu'à la contre électrode (en m)³⁰.

Cette tension est de l'ordre de 2 à 5 kV. Les solvants adaptés pour l'ESI sont polaires à moyennement polaires : les plus utilisés sont l'eau, le méthanol (MeOH) et l'acétonitrile (ACN). Lors d'un couplage avec la chromatographie en phase liquide, des solvants non polaires avec une faible conductivité peuvent être utilisés seulement avec une addition post-colonne de solvants polaires. L'eau seule n'est pas un excellent solvant pour l'ESI par rapport à l'ACN. Ceci est partiellement dû au fait que la viscosité de l'eau est plus grande et que donc, la mobilité électrophorétique des ions est plus faible, menant à une séparation de charges inefficace et à des difficultés pour produire un spray stable.

Le rayon des gouttes formées à la sortie du cône de Taylor est proportionnel à :

$$\sqrt{\rho \cdot D^2 \cdot \gamma}$$
 avec ρ la densité de la solution, D le débit de la phase mobile et γ la tension de surface du solvant.

Une fois que les gouttes sont formées, elles diminuent en taille à cause de l'évaporation du solvant. Le débit auquel le solvant s'évapore de la goutte est fonction de la pression de vapeur du solvant. Ceci a pour effet d'augmenter la concentration des cations dans la goutte. Ces cations ont tendance à se repousser entre eux par répulsion coulombique. La condition où ces répulsions coulombiques à la surface de la goutte dépassent les forces de tension de surface est appelée la limite de Rayleigh. A cette limite, on a :

$Q_r^2 = 64\pi^2 \epsilon_0 \gamma R_r^3$ avec Q_r la charge (en Coulombs) à la surface de la goutte qui est juste suffisante pour dépasser la force de tension de surface, ϵ_0 est la permittivité du vide et vaut $8,85 \cdot 10^{-12} \text{ C}^2 \cdot \text{N}^{-1} \cdot \text{m}^{-2}$ et R_r (en m) est la taille de la goutte portant suffisamment de charges pour satisfaire l'instabilité de Rayleigh.

Cette relation indique que la limite de Rayleigh augmente lorsque la tension de surface du solvant augmente. En effet, pour du MeOH pur, elle vaut : $Q_r^2 = 1,25 \cdot 10^{-10} R_r^3$. Pour de l'ACN, elle est légèrement supérieure. Pour l'eau, elle est trois fois plus grande donc pour un volume de goutte donné, il faut que la goutte contienne beaucoup plus de charges avant de se décomposer. En d'autres termes, pour des gouttes de volume et de charge égale, celle composée de solvant organique polaire se décomposera avant, alors que celle composée d'eau doit encore s'évaporer avant d'atteindre l'instabilité de Rayleigh. Les ions en phase gazeuse seront donc émis plus facilement à partir d'une goutte riche en MeOH ou en ACN qu'à partir d'une goutte riche en eau.

En électrospray, la génération des espèces chargées en phase gazeuse peut se faire selon quatre procédés :

- L'ionisation par la séparation de charges : les analytes qui existent en solution comme ions se retrouvent directement ionisés dans les gouttes.
- La formation d'adduits : elle se produit avant la séparation de charge. En mode négatif, les adduits peuvent être formés avec les ions chlorure lorsque des solvants chlorés comme le chloroforme sont utilisés (bien que ce solvant ne soit pas recommandé comme nous l'avons vu précédemment). En mode positif, les analytes forment des adduits avec du sodium, du lithium, de l'ammonium ou d'autres cations.
- L'ionisation par réactions en phase gaz : puisque de larges quantités de molécules chargées sont générées, la réponse ESI-MS peut être affectée par des interactions en phase gaz. Les molécules protonées en solution transfèrent leur proton aux molécules de plus forte basicité en phase gaz. Des analytes neutres qui s'évaporent peuvent donc être chargés en phase gaz. La basicité en solution et l'affinité protonique en phase gaz ne sont pas nécessairement liées.
- L'ionisation par oxydation ou réduction électrochimique au niveau du capillaire métallique : des réactions électrochimiques peuvent convertir un analyte non chargé en ion. Cependant, ces réactions peuvent être délétères si elles consomment l'analyte d'une façon destructive, produisent des ions qui s'ajoutent au fond spectral, ou entrent en compétition avec l'analyte pour l'excès de charge³¹.

Il existe deux mécanismes pour l'émission des analytes en phase gaz à partir des gouttelettes : le mécanisme d'évaporation d'ions (IEM) proposé par Iribarne et Thomson en 1976 et 1979^{32,33} et le mécanisme de résidu de charge (CRM) proposé par Dole en 1968²⁷. Dans le mécanisme d'évaporation d'ions, les ions sont générés en phase gazeuse par émission à partir de la surface de la goutte quand le champ électrique devient suffisamment haut. Ce mécanisme arrive lorsque la goutte a un diamètre inférieur ou égal à 20 nm. Dans le mécanisme de résidu de charge, l'évaporation de la goutte et les fissions successives continuent jusqu'à ce que les nano gouttes ne contiennent plus qu'une seule molécule³⁴.

Par rapport aux sources MALDI, les sources ESI présentent donc l'avantage de pouvoir être très facilement couplées directement avec un flux continu (comme l'éluat de la colonne chromatographique). Puisque la quantification de peptides se fait par couplage direct avec la chromatographie liquide, la source de référence pour cette application est l'ESI. La source MALDI est quant à elle majoritairement utilisée lorsqu'une identification de peptides dans un mélange inconnu est demandée.

Après avoir été générés dans la source, les ions produits vont atteindre l'analyseur. La pression régnant dans un analyseur diffère selon le type d'analyseur mais est inférieure à 10^{-5} Torr. Dans le cas de l'ESI, l'ionisation se déroule à pression atmosphérique. Les ions traversent donc une interface entre la source et l'analyseur. Cette interface a pour rôle de transmettre les ions vers une région où le vide est plus important. De plus, l'interface permet d'éliminer les molécules de solvant encore présentes et un maximum de molécules neutres qui risquent de provoquer un encrassement de l'appareil. Enfin, l'interface va également permettre de focaliser le faisceau d'ions avant qu'il n'atteigne l'analyseur.

II.2.2.2) Les analyseurs

Le rôle d'un analyseur, en combinaison avec le détecteur va être de déterminer le rapport masse sur charge des ions qui le traversent. Il existe également différents analyseurs dont le choix doit se faire en fonction de l'application (qualitative et / ou quantitative). Plusieurs critères vont définir cet analyseur : la résolution, l'exactitude de la mesure du rapport masse sur charge, la sensibilité, la gamme dynamique, la gamme de masse analysable et la vitesse d'analyse.

II.2.2.2.1) Caractéristiques des analyseurs

L'un des critères les plus importants est la résolution R . Il s'agit de la capacité que possède l'analyseur à séparer deux ions ayant un rapport masse sur charge proche. Elle est calculée comme étant le rapport entre la masse m d'un ion et Δm , la largeur à mi-hauteur du pic : $R = \frac{m}{\Delta m}$.

Par abus de langage, on utilise le terme masse, mais il s'agit du rapport masse sur charge. Plus la résolution est élevée, et plus l'analyseur fera la distinction entre deux ions de rapport masse sur charge proche. Plus la résolution est importante, plus l'analyse sera spécifique puisque les ions de masse proche pourront être séparés. Une résolution élevée est par exemple indispensable pour séparer le massif isotopique d'une espèce multichargée.

Le massif isotopique correspond à tous les ions de la même molécule mais contenant des isotopes différents de chaque élément. Par exemple, pour un peptide (qui est constitué de carbone, d'hydrogène, d'azote, d'oxygène et éventuellement de soufre), l'ion monoisotopique aura un rapport masse sur charge m/z . Dans ce cas, la masse m est issue des isotopes les plus abondants de chaque atome (1,00783 Da pour l'hydrogène, 12 Da pour le carbone...). Le pic suivant aura pour rapport

masse sur charge $(m+1)/z$. Le terme $(m+1)$ vient principalement du carbone 13 (qui représente environ 1,1% du carbone total) mais également du deutérium (0,01% de l'hydrogène total)... Ainsi, pour une espèce doublement chargée, l'analyseur devra être capable de séparer deux ions ayant un écart de masse de 0,5 Da. Ou pour un ion dix fois chargé, l'écart de masse ne sera plus que de 0,1 Da. Pour un ion ayant un rapport masse sur charge de 1 000, il faudra donc une résolution de 2 000 dans le premier cas et de 10 000 dans le second cas pour séparer l'ion de masse m et celui de masse $(m+1)$. En quantification, le fait d'avoir une résolution importante permet de minimiser le risque de quantifier un interférent. En effet, si deux molécules génèrent deux ions de masse très proche, et que ces deux ions ne sont pas séparés par l'analyseur à cause d'une résolution insuffisante, la quantité de matière dosée sera la quantité totale des deux molécules. Le résultat sera donc faussé.

L'exactitude en masse est également importante notamment pour déterminer la formule brute de composés. En effet, lorsque la masse est déterminée avec une grande exactitude, très peu de molécules peuvent correspondre à la masse mesurée ce qui réduit considérablement les recherches dans les bases de données afin d'identifier les espèces présentes dans le mélange.

Il faut également considérer la transmission des ions au sein du spectromètre de masse. Cette transmission va en effet jouer sur la sensibilité de l'analyse. Une meilleure transmission des ions permettra de détecter des quantités d'analytes plus faibles.

Un autre paramètre non négligeable est la gamme dynamique de l'analyseur. Il s'agit de l'étendue de la linéarité d'une courbe d'étalonnage. En effet, lorsqu'une quantification est désirée, il faut que la réponse soit proportionnelle à la concentration de l'analyte. Si de grandes différences de concentration sont attendues, la gamme dynamique doit être importante.

La gamme de masse analysable est également un critère à prendre en compte en fonction des applications désirées. En effet, certains analyseurs sont capables de transmettre des ions de masses très variées (plusieurs dizaines de milliers de daltons) alors que d'autres sont limités à 1 000 Da.

La majorité des applications quantitatives en masse fait appel à l'utilisation de quadripôles. Les pièges à ions apportent également certains avantages. Ces deux analyseurs vont donc être décrits.

II.2.2.2.2) Le quadripôle

Le principe du quadripôle a été décrit par Paul et Steinweger en 1953³⁵. Un quadripôle est composé de quatre barreaux hyperboliques parallèles sur les lesquels est appliqué de façon alternative un potentiel positif ou négatif :

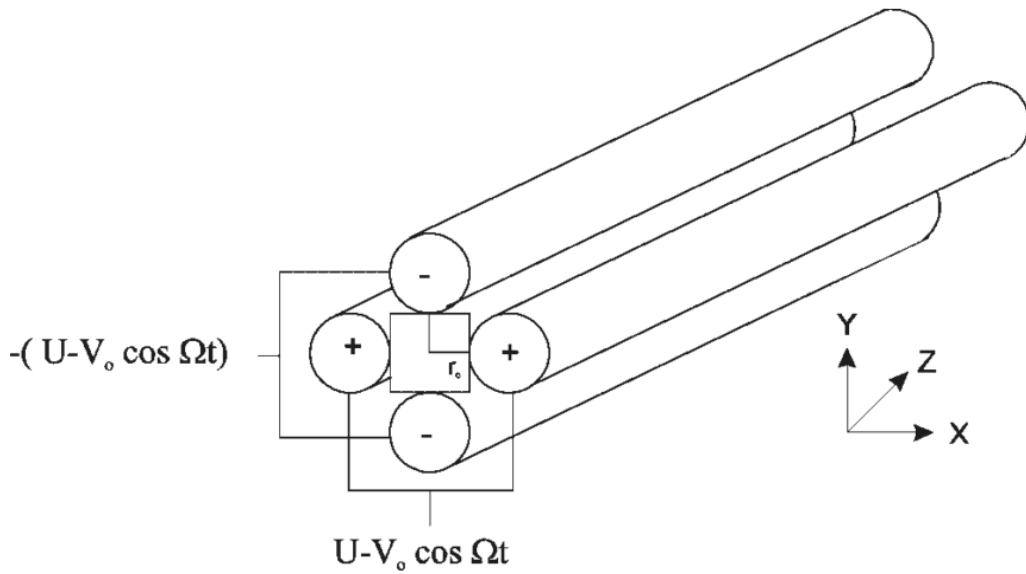


Figure 5 : Schéma d'un quadripôle (d'après R.E. March³⁶).

Le potentiel appliqué ($\phi_0 = U - V \cos \omega t$) est composé d'une tension continue U et d'une tension alternative d'amplitude maximale V et de fréquence angulaire ω . Lorsque les ions pénètrent dans le quadripôle, ils se déplacent selon l'axe z grâce à leur vitesse initiale. Au temps t_1 , la polarité des barreaux situés sur l'axe y est négative (cf. Figure 5). Les ions positifs vont donc être déviés selon cet axe y . Puisque le potentiel appliqué sur les barreaux est constitué d'une tension alternative, la polarité des barreaux au temps t_2 va être inversée. De ce fait, les ions positifs seront déviés selon l'axe x . Cette polarité est alternée au cours du temps ce qui a pour effet de donner aux ions une trajectoire oscillante. Ainsi, l'ion va soit traverser le quadripôle en ayant cette trajectoire oscillante (on dit alors que l'ion est stable), soit aller percuter l'un des quatre barreaux (il est alors instable). Pour prédire quels ions seront stables, il faut revenir aux forces d'attraction et de répulsion que subissent les ions dans le quadripôle. Ces forces notées F_x pour l'axe x et F_y pour l'axe y dépendent de la tension appliquée sur les barreaux :

$F_x = m \cdot a = m \cdot \frac{d^2x}{dt^2} = -z \cdot e \cdot \frac{\delta\phi}{\delta x}$ (1) et $F_y = m \cdot a = m \cdot \frac{d^2y}{dt^2} = -z \cdot e \cdot \frac{\delta\phi}{\delta y}$ (2) avec m la masse de l'ion, a l'accélération, $-q = z \cdot e$ sa charge et ϕ dépend du potentiel appliqué ϕ_0 :

$$\phi_{(x,y)} = \frac{\phi_0 \cdot (x^2 - y^2)}{r_0^2} = \frac{(U - V \cos \omega t) \cdot (x^2 - y^2)}{r_0^2} \quad (3)$$

Ainsi, en dérivant et en réarrangeant les équations (1) et (3), on obtient :

$$\frac{d^2x}{dt^2} + \frac{z \cdot e}{m \cdot r_0^2} \cdot (U - V \cos \omega t) \cdot x = 0$$

De même, avec les équations (2) et (3) :

$$\frac{d^2y}{dt^2} - \frac{z \cdot e}{m \cdot r_0^2} \cdot (U - V \cos \omega t) \cdot y = 0$$

Enfin, en posant :

$$u = x \text{ ou } y; \quad \xi = \frac{\omega t}{2}; \quad a_u = \frac{8zeU}{mr^2\omega^2} \text{ et } q_u = \frac{4zeV}{mr^2\omega^2}$$

avec $a_u = a_x \text{ ou } -a_y$ et $q_u = q_x \text{ ou } -q_y$

On obtient les équations du mouvement de Mathieu établies en 1866 et permettant de définir quels ions traverseront le quadripôle :

$$\frac{d^2u}{d\xi^2} + (a_u - 2q_u \cos 2\xi)u = 0$$

Ainsi, dans un diagramme de a_u en fonction de q_u , il existe des zones dites zones de stabilité définies par certaines valeurs de U et V pour lesquelles x et y restent inférieurs à r . Dans ces zones de stabilité, les ions de rapport masse sur charge donné traverseront le quadripôle. Les zones de stabilité selon l'axe x ou y sont représentées sur la Figure 6 :

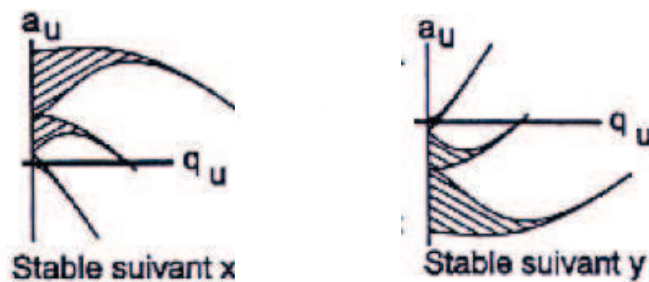


Figure 6 : Diagramme de stabilité d'un ion dans un quadripôle selon l'axe x ou y .

La superposition de ces deux diagrammes permet de définir les zones dans lesquelles un ion pourra traverser le quadripôle selon l'axe z afin de rejoindre le détecteur :

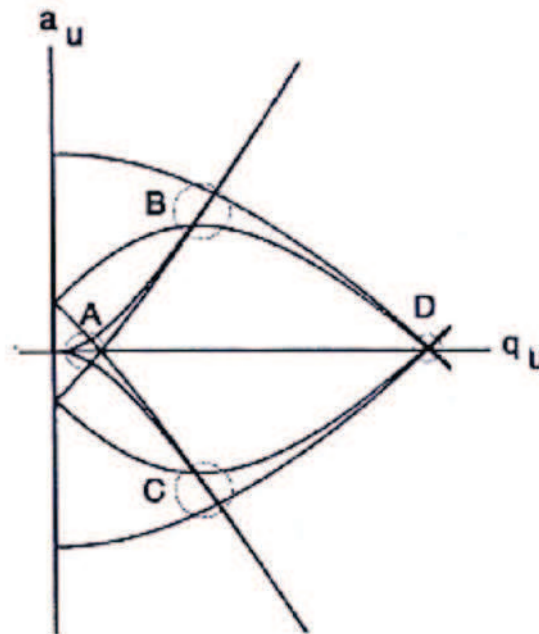


Figure 7 : Diagramme de stabilité d'un ion dans un quadripôle selon les axes x et y .

Quatre zones de stabilité (A, B, C et D) sont ainsi déterminées. En général, la zone A est la plus couramment utilisée. Le diagramme de stabilité rencontré généralement est la partie de la zone A pour laquelle a_u est positif (zone grisée dans la Figure 8) :

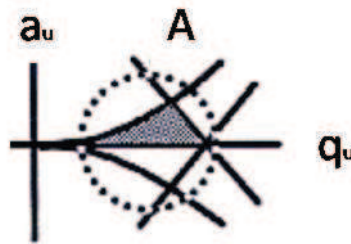


Figure 8 : Agrandissement de la partie A de la Figure 7.

Cette zone de stabilité est valable pour un rapport masse sur charge donné. Puisque a_u et q_u sont des valeurs respectivement proportionnelles à U et V , cette zone peut être représentée en fonction de U et V . De plus, ce qui est vérifié pour les valeurs de U positives l'est également pour les valeurs négatives. C'est pourquoi la représentation classique est celle donnée dans la Figure 9 pour des ions de rapport masse sur charge allant de m_1 à m_3 :

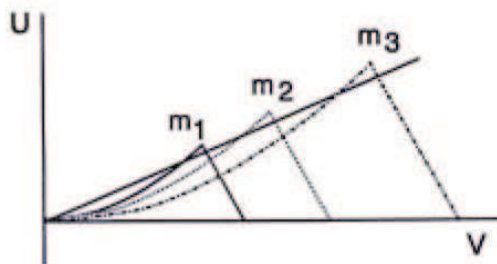


Figure 9 : Diagramme de stabilité de 3 ions de masse m_1 , m_2 et m_3 dans un quadripôle.

Pour effectuer un balayage dans un quadripôle, il faut donc faire varier simultanément U et V en gardant le rapport U/V constant. Plus ce rapport sera élevé, plus la sélectivité du filtre en masse sera importante (et donc meilleure sera la résolution). En revanche, la transmission des ions va être réduite ce qui va engendrer une diminution de la sensibilité. Le quadripôle est donc un analyseur séquentiel, il analyse les ions masse après masse d'abord m_1 pendant une durée t_1 , puis m_2 pendant une durée t_2 ... Une grande partie des ions arrivant à l'entrée du quadripôle est donc perdue (la trajectoire des ions de masse m_1 n'est pas stable pendant la durée d'analyse des ions m_2).

Un quadripôle permet donc soit d'analyser un seul ion, soit de balayer une plage de masse de façon séquentielle afin de reconstituer un spectre de masse.

En revanche, si la tension continue U est fixée à 0V, et que V n'est pas trop élevée, tous les ions auront une trajectoire stable. Dans ce cas, le quadripôle sert uniquement de guide d'ions. On dit qu'il fonctionne en radiofréquence seulement.

Le quadripôle est un analyseur à basse résolution (de l'ordre de 2000 pour un ion ayant un rapport m/z de 1 000). Différents quadripôles en tandem seront utilisés lors de ce travail de thèse. Pour certains, le rapport masse sur charge maximal analysable sera de 1 000 alors qu'il sera de 3 000 pour d'autres. De plus un autre analyseur hybride sera utilisé. Il est constitué d'un quadripôle couplé à un piège à ions linéaire. Voyons donc à présent le fonctionnement d'un piège à ions.

II.2.2.2.3) Le piège à ions

Le piège à ions quadripolaire a été décrite en même temps que le quadripôle par Paul et Steinwedel³⁵. Il y a en effet de fortes analogies entre ces deux types d'analyseur. Le piège est constitué de trois électrodes comme le montre la Figure 10 : une électrode circulaire au centre (notée E2) et deux électrodes en forme de soucoupe inversée de part et d'autre de l'électrode circulaire (notées E1 et E3).

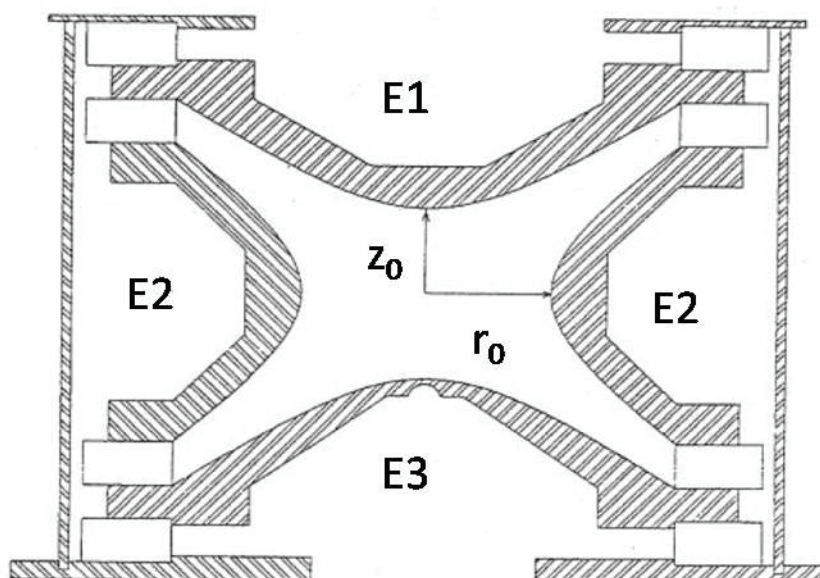


Figure 10 : Schéma d'un piège à ions (d'après R.E. March³⁶, après modification).

Un potentiel est appliqué sur l'électrode circulaire. Ce potentiel est semblable à celui appliqué sur les barreaux d'un quadripôle : il est composé d'une tension continue U et d'une tension alternative d'amplitude V . La différence majeure avec le quadripôle est que dans un piège, tous les ions sont piégés simultanément quelque soit leur rapport masse sur charge. Les équations de Mathieu permettent de prédire les zones dans lesquelles les ions seront stables au sein du piège :

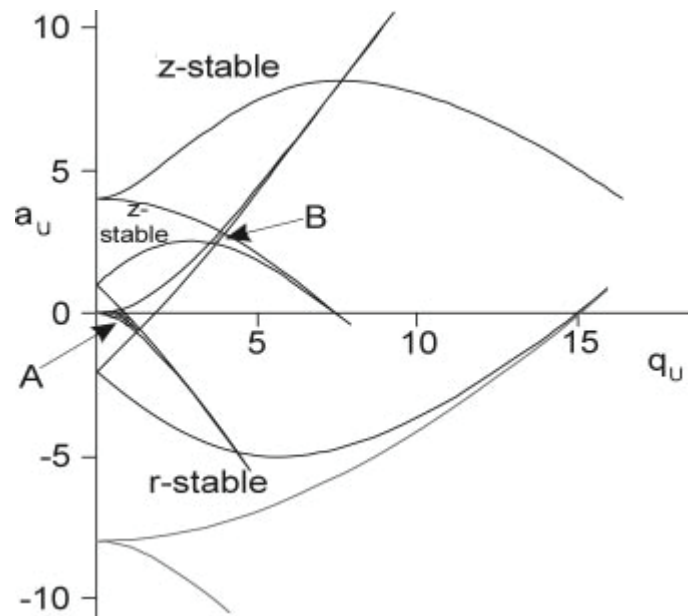


Figure 11 : Diagramme de stabilité des ions dans un piège à ions (d'après R.E. March³⁶).

Aux fortes valeurs de a_u les ions ont une trajectoire stable selon l'axe z , tant que q_u reste faible. De même, la trajectoire est stable selon l'axe r si q_u est faible et si a_u est très inférieur à zéro. Comme pour le quadripôle, nous ne considérerons que la zone A dans laquelle la trajectoire est stable selon les axes r et z . Cette zone est agrandie sur la Figure 12 :

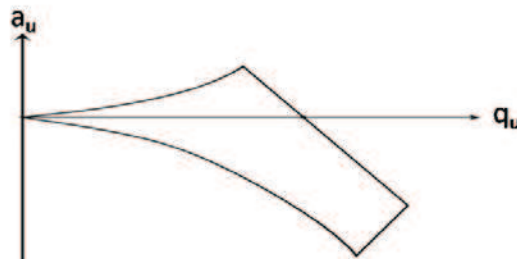


Figure 12 : Agrandissement de la partie A de la Figure 11.

Contrairement au quadripôle, on peut noter ici que cette zone n'est pas symétrique par rapport à l'axe q_u . Ce qui est vrai pour une tension continue positive ne l'est donc pas forcément pour une tension continue négative. Ce diagramme de stabilité est valable pour un ion de rapport masse sur charge donné. Comme montré sur la Figure 9 avec le quadripôle, on peut superposer un diagramme de stabilité pour chaque masse. Ainsi, pour piéger l'ensemble des ions, il faut se placer à $U = 0$ Volt, avec une valeur V relativement faible. Ensuite, pour réaliser un balayage en masse, la valeur de V est augmentée progressivement ce qui a pour effet d'expulser du piège les ions avec des masses croissantes.

L'analyseur présenté ici est un piège à ions en « trois dimensions ». Il existe d'autres géométries comme le piège linéaire qui sera utilisé ultérieurement. Ce type de piège est présenté sur la figure suivante :

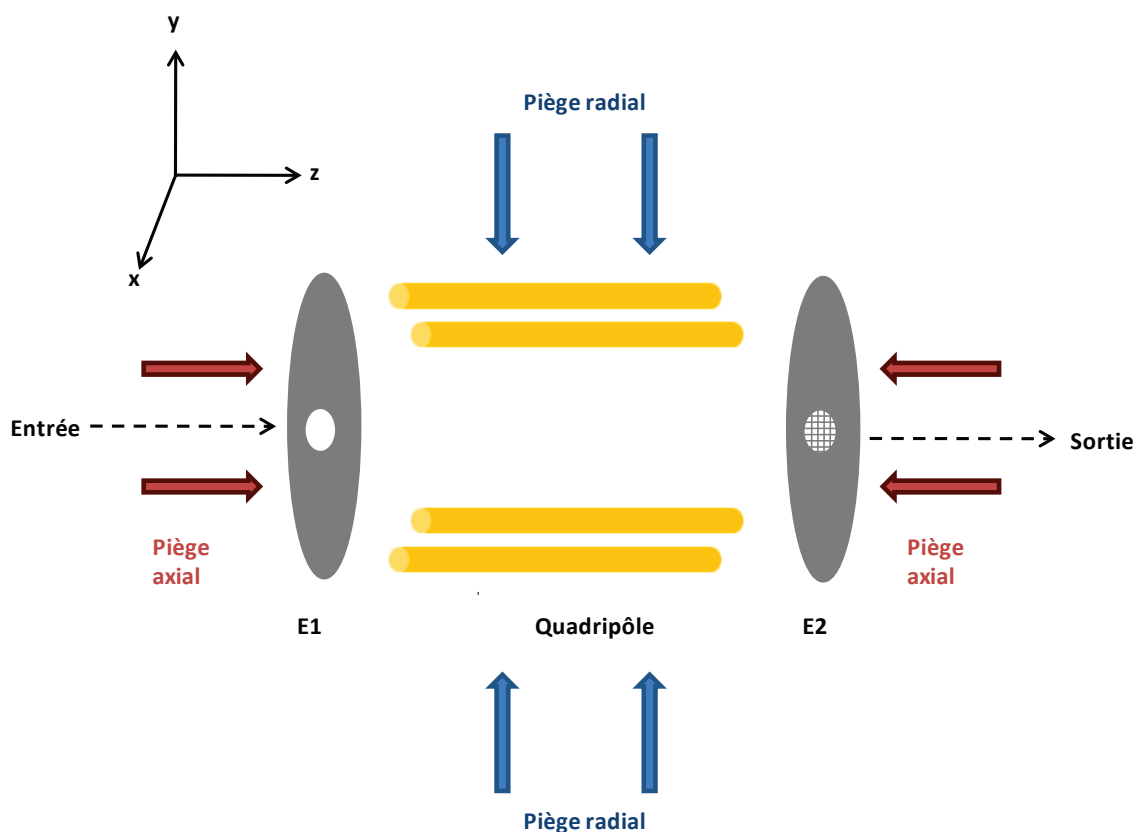


Figure 13 : Schéma d'un piège à ions linéaire.

Ce piège est un quadripôle possédant deux électrodes (E1 et E2) à ses extrémités. Dans un premier temps, les ions pénètrent dans le quadripôle à travers l'électrode E1 dont le potentiel est faible. Le potentiel de la seconde électrode E2 est quant à lui élevé afin d'empêcher la sortie des ions. Ensuite, le potentiel de l'électrode E1 est également augmenté de façon à ce que les ions soient piégés selon l'axe z (piège axial). Dans ce cas, les ions sont piégés en faisant des allers-retours selon cet axe z. Pour permettre le piège radial, le quadripôle fonctionne en radiofréquence seulement (*cf.* paragraphe II.2.2.2.2) page 42). Le diagramme de stabilité des ions est le même que celui d'un quadripôle mais l'éjection des ions se fait en augmentant progressivement V (et en gardant $U = 0V$).

La résolution dans un piège à ions est légèrement supérieure à celle rencontrée dans un quadripôle (de l'ordre de 4 000 pour un ion de rapport masse sur charge de 1000) mais l'exactitude sur la mesure de masse est du même ordre de grandeur. La grosse limitation des pièges à ions apparaît lorsqu'une fragmentation des ions est demandée comme c'est généralement le cas en quantification. En effet, ils ne sont alors plus trop adaptés à cette application puisqu'ils doivent piéger des ions avant de pouvoir générer un signal. Le temps nécessaire à ce piégeage (de l'ordre de quelques dizaines à centaines de millisecondes) n'est généralement pas compatible avec une quantification sensible et simultanée de plusieurs dizaines à centaines de composés. En revanche, couplés avec un analyseur comme le quadripôle, les pièges à ions peuvent apporter un réel gain de spécificité qui va se traduire par un gain de sensibilité comme nous le verrons plus tard. Lorsque plusieurs analyseurs sont couplés, on parle de spectrométrie de masse en tandem.

II.2.3) La spectrométrie de masse en tandem (MS/MS)

Cette approche permet d'avoir une information sur la masse de l'ion d'intérêt mais également sur la masse d'ions issus de la fragmentation de cet ion. L'ion intact est appelé ion précurseur (ou ion parent) et les fragments sont appelés ions fragments (ou ions fils). La spectrométrie de masse en tandem se déroule en trois étapes : (i) la sélection de l'ion précurseur, (ii) la fragmentation de cet ion, (iii) l'analyse des fragments. La spectrométrie de masse en tandem (encore appelée MS/MS ou MS²) est généralement réalisée en couplant plusieurs analyseurs. Cependant, des analyseurs comme le piège à ions permettent à eux seuls de faire ce type d'analyse mais le temps d'analyse est alors assez important puisqu'en plus du piégeage de l'ion parent, il faut ajouter quelques millisecondes pour sa fragmentation et à nouveau plusieurs centaines de millisecondes pour piéger et analyser un ou plusieurs fragments. Pour la quantification, deux types d'appareillages sont généralement utilisés : le triple quadripôle ou le Q-trap à géométrie linéaire.

II.2.3.1) Appareillage

II.2.3.1.1) Le triple quadripôle

Il s'agit de l'appareil de référence pour la quantification. Comme son nom l'indique, un triple quadripôle est constitué de trois quadripôles placés en série. Le premier (nommé Q1) est l'analyseur classique décrit au paragraphe II.2.2.2), page 42. Son rôle est donc de déterminer les rapports masse sur charge des ions qui le traversent. Le second quadripôle (nommé q2) a quant à lui un rôle différent. En effet, il va servir de cellule de collision : dès qu'un ion a traversé le Q1, il va subir des collisions avec un gaz inerte (généralement de l'azote) dans le q2. Ces collisions vont avoir pour effet d'augmenter l'énergie interne de l'ion précurseur. Si cette énergie est suffisamment importante, l'ion parent va subir une ou plusieurs fragmentations. Ce mécanisme peut être représenté de la manière suivante :

$(AB)^+ \xrightarrow{N_2} (AB)^{+*} \rightarrow A^+ + B$ avec $(AB)^+$, l'ion précurseur ; $(AB)^{+*}$, l'ion précurseur excité, A^+ , l'ion fragment et B un fragment neutre. On parle alors de dissociation induite par collision (CID).

Ensuite, après avoir traversé le q2, les fragments arrivent à l'entrée du troisième quadripôle (nommé Q3). Ce dernier a le même rôle que le Q1, à savoir laisser passer et déterminer le rapport masse sur charge des ions sortant du q2. Le premier et le troisième quadripôle peuvent donc soit analyser une seule masse soit balayer une plage de masses.

Puisque le balayage d'une plage de masses dans un triple quadripôle se fait de façon séquentielle, beaucoup d'ions sont perdus ce qui résulte en une baisse de la sensibilité. Ce problème peut être évité en remplaçant le dernier quadripôle par un piège à ions linéaire. L'appareil prend alors le nom de Q-trap.

II.2.3.1.2) Le Q-trap

Cet appareil diffère du triple quadripôle par le fait que le troisième quadripôle est un piège à ions linéaire. Cet appareil peut donc fonctionner comme un triple quadripôle conventionnel. Cependant, la présence du piège à ions permet soit d'analyser les fragments avec une meilleure résolution et une meilleure sensibilité qu'un quadripôle, soit de fragmenter un ion par ajout d'une autre tension alternative. Cette tension doit avoir la même fréquence que la fréquence de résonance de l'ion d'intérêt mais une amplitude V assez faible afin de ne pas expulser l'ion précurseur du piège. Ce dernier va alors résonner et entrer en collision avec le gaz présent dans le piège (azote par exemple). Le surplus d'énergie interne apporté à l'ion parent sera alors dissipé lors de sa fragmentation.

Puisque le triple quadripôle et le Q-trap permettent de fragmenter un ion précurseur, des modes de balayage irréalisables sur un simple quadripôle sont alors possibles.

II.2.3.2) *Les modes de balayage utilisés pour le développement d'un dosage*

Parmi les différents modes de balayage, il existe la perte de neutre ou le spectre d'ions précurseurs. Cependant, ils sont plutôt utilisés à des fins d'analyse qualitative et ne seront donc pas détaillés. Seuls deux modes utilisés pour la quantification absolue de peptides (la SRM et la MRM³) ainsi qu'un mode permettant de confirmer la présence des peptides (le spectre d'ions produits) seront abordés.

II.2.3.2.1) Le balayage d'ions fragments

Dans un triple quadripôle, le premier quadripôle sélectionne un seul ion parent (rapport masse sur charge $(m/z)_1$ fixé). Ce dernier va être fragmenté dans le q2. Le troisième quadripôle va quant à lui effectuer un balayage séquentiel sur une plage de masses. Le signal obtenu sera alors un spectre de masse contenant tous les fragments appartenant aux ions précurseurs ayant le rapport masse sur charge $(m/z)_1$. Ce mode de balayage permet donc de confirmer la présence d'un peptide puisque les fragments obtenus seront le reflet de la séquence du peptide. Des exemples de spectre de fragmentation de peptides seront présentés ultérieurement.

Dans un Q-trap, le balayage d'ions fragments peut être réalisé à l'aide du piège à ions linéaire. Dans ce cas, le premier et le deuxième quadripôle ont le même rôle que précédemment. En revanche, le piège linéaire va accumuler tous les fragments issus du q2 puis effectuer un balayage de ces fragments.

II.2.3.2.2) Le mode SRM (Selected Reaction Monitoring)

Le principe de la SRM est illustré sur la figure suivante :

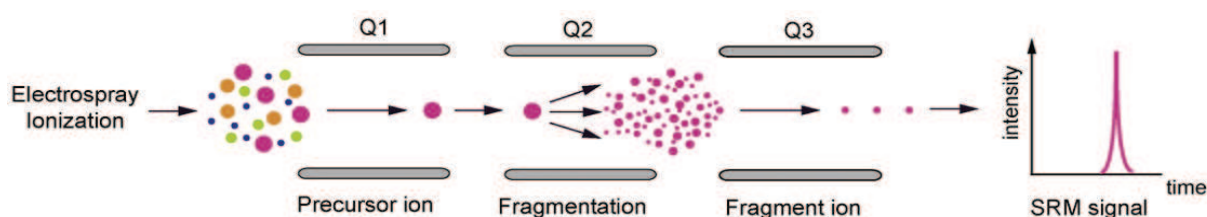


Figure 14 : Schéma de principe de la SRM (d'après Huttenhain *et al.*³⁷).

Dans ce cas, le premier quadripôle sélectionne un ion parent. Celui-ci va être fragmenté dans le q2. Quant au troisième quadripôle, il ne va sélectionner qu'un seul ion fragment. Chaque couple ion précurseur de rapport masse sur charge $(m/z)_1$ et ion fragment de rapport masse sur charge $(m/z)_2$ est appelé transition SRM. Ce mode est très adapté à la quantification et est le plus utilisé puisque la détection sera très spécifique du peptide d'intérêt. De plus, la fréquence d'acquisition est assez élevée (moins de cinq millisecondes par transition SRM sont suffisantes pour acquérir un point sur les appareils de dernière génération).

II.2.3.2.3) Le mode MRM³ (Multiple Reaction Monitoring cubed)

Introduit en 2009 par l'équipe du laboratoire³⁸, ce mode est réalisable sur un Q-trap mais pas sur un triple quadripôle. Le principe de la MRM³ est montré sur la Figure 15 :

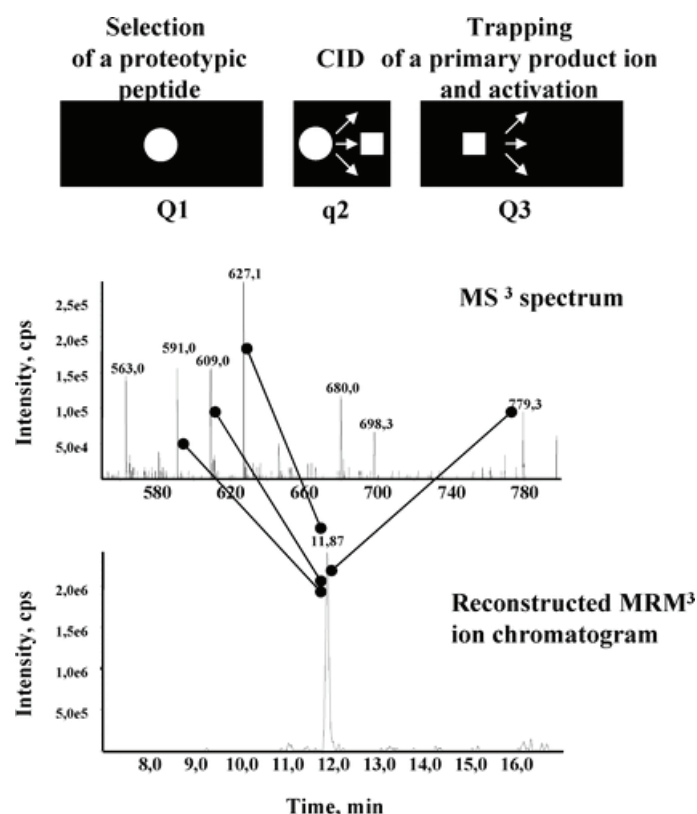


Figure 15 : Principe de la MRM³ (d'après Fortin *et al.*³⁸).

Dans cet appareil, le premier quadripôle sélectionne un ion parent qui va être fragmenté dans le deuxième quadripôle. Le piège linéaire va isoler un ion fragment puis le fragmenter à nouveau. Des ions « petits-fils » sont ainsi générés. Ensuite, un balayage de tous ces ions fragments de seconde génération est réalisé. Enfin, les ions spécifiques de la molécule étudiée sont sélectionnés puis sommés afin de reconstituer un chromatogramme. En MRM³, il y a donc une sélectivité en masse supplémentaire apportée par rapport à la SRM. Il en résulte la disparition du bruit de fond observé en SRM lors d'analyse de peptides en matrice complexe. Ainsi, le rapport signal sur bruit est augmenté et la sensibilité pour la quantification de protéines dans des matrices complexes comme le plasma est améliorée comme le montre la Figure 16 :

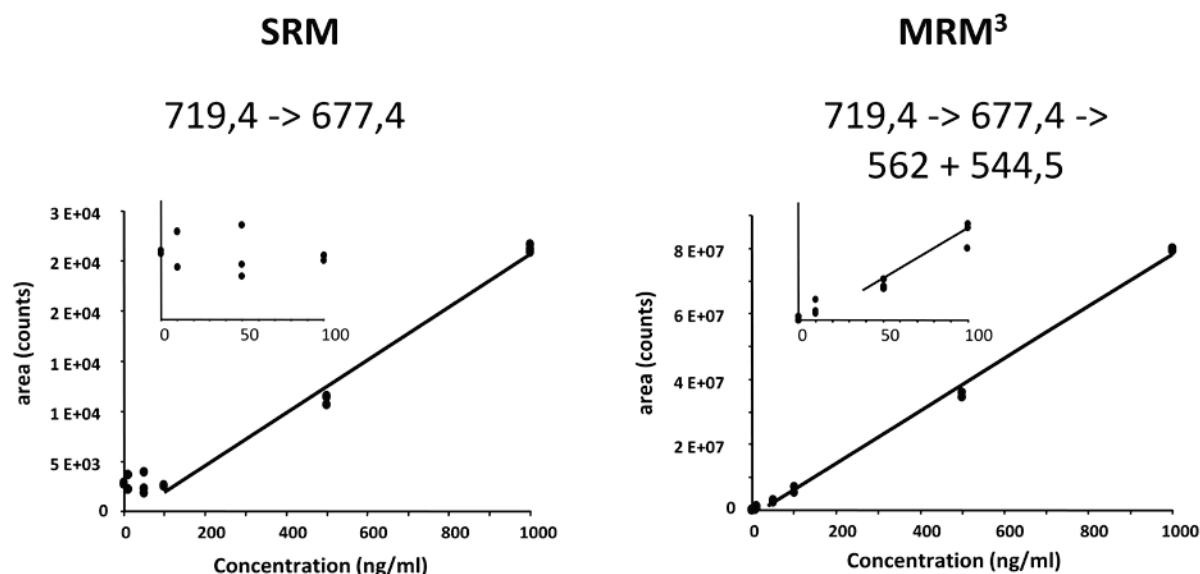


Figure 16 : Courbes d'étalonnage en SRM et en MRM³ du peptide rapporteur de la protéine TP 435 dans du sérum de femme entre 0 et 1000 ng / mL (d'après Fortin *et al.*³⁸).

En SRM, la réponse n'est linéaire qu'à partir de 100 ng / mL alors qu'en MRM³, elle l'est à partir de 50 ng / mL. Pour cette protéine, un gain de sensibilité d'un facteur deux a donc été obtenu. Pour d'autres protéines, un gain d'un facteur cinq peut être atteint. Cependant, l'inconvénient majeur de la MRM³ réside dans le temps nécessaire pour acquérir un point. En effet, de part l'utilisation du piège linéaire, il faut un intervalle de temps d'au minimum 200 ms entre chaque expérience (contre moins de 10 ms pour un triple quadripôle). Ceci peut donc être un frein lorsqu'une quantification multiplexée (plusieurs dizaines de peptides) est envisagée.

II.2.3.2.4) L'acquisition dépendant d'information (IDA)

Ce type d'expérience est très utile lors de la recherche de peptides. En effet, si on souhaite confirmer la présence de 40 peptides par leur spectre de fragmentation, ceci ne pourra pas être réalisé en une seule injection puisqu'il faut au moins 200 ms pour réaliser un tel spectre. C'est alors que les expériences IDA trouvent leur intérêt. En IDA, un scan de surveillance est réalisé (par exemple, la recherche de quelques transitions SRM correspondant aux 40 peptides étudiés). Si aucune transition SRM n'est détectée, un nouveau scan de surveillance est réalisé et ainsi de suite jusqu'à la détection d'un signal. Lorsqu'une transition SRM est observée avec une intensité suffisante, un autre mode de balayage est déclenché (par exemple, un spectre d'ions fragments). Ensuite, de nouveaux scans de surveillance sont effectués jusqu'à la détection d'un autre signal. Si trois transitions SRM sont suivies par peptides, il faut donc moins de 1200 ms (3 transitions SRM x 40 peptides x 10 ms) pour effectuer un scan de surveillance. Ce temps permet donc de vérifier la présence des 40 peptides recherchés en une seule injection.

Après avoir vu les modes de fonctionnement d'un spectromètre de masse pour l'acquisition du signal, nous allons détailler les différentes méthodes de quantification.

III) Les différentes quantifications possibles par spectrométrie de masse

La quantification des protéines par spectrométrie de masse peut être relative ou absolue. La quantification relative permet de comparer le taux d'expression des protéines entre au moins deux conditions, généralement grâce à un marquage isotopique différent de chaque échantillon. La quantification absolue est quant à elle réalisée par ajout d'un étalon marqué par des isotopes stables et de concentration connue.

III.1) La quantification relative

Cette approche consiste à comparer les aires sous les pics d'au moins deux séries d'échantillons : généralement une série témoin et une ou plusieurs séries présentant des particularités différentes (par exemple patient atteint d'une maladie dans le cadre d'un biomarqueur clinique, population animale ayant vécu en présence d'un contaminant pour un biomarqueur environnemental...). Cette quantification peut se faire avec ou sans marquage de l'échantillon.

III.1.1) Le « label free »

Avec le « label free », il suffit de traiter l'échantillon comme décrit au paragraphe II.2.1) page 35, à savoir le dénaturer, l'alkyler et effectuer une digestion enzymatique. Il n'y a pas besoin de réactions supplémentaire comme ce sera le cas pour les méthodes par marquage chimique qui seront développées plus loin. De même, il n'y a pas besoin d'ajouter un étalon interne. C'est la méthode la moins onéreuse puisqu'elle ne nécessite aucun marquage isotopique. Il existe deux méthodes de quantification en « label free » : la mesure d'aire sous le pic chromatographique (ou mesure de l'intensité du pic) et le décompte de spectres.

III.1.1.1) La mesure d'aire sous le pic

Dans cette approche, un balayage en masse est réalisé afin de pouvoir mesurer l'aire de chaque ion. Un spectre de fragmentation est également obtenu afin d'identifier le peptide présent. Une

alternative, nommée MS^E consiste à faire un balayage à faible énergie de collision suivi d'un autre à haute énergie de collision³⁹. Dans tous les cas, quelques précautions doivent être prises afin de pouvoir comparer différents lots d'échantillons. Il faut tout d'abord que le temps de rétention de chaque composé soit répétable. Le bruit de fond provenant d'interférents chimiques doit être limité. De plus, il faut un retraitement de données permettant la normalisation de l'abondance des pics.

III.1.1.2) *Le décompte de spectres*

Tout comme lors de la mesure de l'aire sous le pic, un balayage en masse est effectué. Ensuite, un spectre de fragmentation est réalisé sur les ions majoritaires du balayage effectué au préalable (par exemple, sur les dix plus intenses). Cette approche part du principe que le nombre de spectres de fragmentation réalisés pour un peptide est d'autant plus important que le peptide est abondant puisque les ions minoritaires ne sont jamais fragmentés.

Le groupe de Mathias Mann a ainsi proposé une méthode pour estimer la quantité de chaque protéine : il s'agit du calcul de l'indice d'abondance protéique (PAI). Pour une protéine donnée, cet indice est le rapport entre le nombre de peptides observés sur le nombre de peptides potentiels (sur une gamme de masse donnée)⁴⁰. Cet indice a ensuite été modifié exponentiellement pour prendre le nom d'emPAI par la relation : $\text{emPAI} = 10^{\text{PAI}} - 1$. Une bonne corrélation a été obtenue entre cet indice et la concentration absolue de 46 protéines provenant de neuroblastes de souris ($r = 0,93$)⁴¹.

D'autres techniques de décompte de spectres ont introduit des facteurs correctifs permettant de tenir compte de la probabilité d'observer un peptide⁴² ou de la taille totale de la protéine⁴³.

Différents logiciels commerciaux ou libres sont disponibles afin de quantifier les analytes en « label-free ». Une liste de ces logiciels peut être trouvée dans la revue de Neilson *et al.*⁴⁴.

III.1.2) *Le marquage métabolique*

III.1.2.1) *Marquage à l'azote 15*

Il est basé sur l'incorporation aux protéines de ¹⁵N. Par exemple, le groupe de Chait⁴⁵ a comparé l'expression de protéines dans deux lots de levures : un lot témoin et un lot incubé dans un milieu de culture enrichi en azote 15. Lors du métabolisme des levures, les atomes d'azote 14 sont progressivement remplacés par de l'azote 15. Les levures enrichies en ¹⁵N sont ensuite mélangées avec les levures servant de témoin. Les protéines obtenues sont séparées puis digérées par de la trypsine. Le ratio entre un peptide marqué à l'azote 15 et son homologue non marqué donne une information quantitative sur l'expression de la protéine dans chaque lot de levures. En effet, le peptide marqué aura les mêmes propriétés physico-chimiques que le peptide non marqué. Ces deux formes subiront donc les mêmes rendements lors de la préparation de l'échantillon et également le même effet matrice lors de l'ionisation. La comparaison de l'aire des pics chromatographiques de ces

deux peptides donnera donc une information sur la quantité relative du peptide (et au final de la protéine) dans chaque lot. Un inconvénient de cette technique est que seulement deux lots peuvent être comparés.

III.1.2.2) *L'approche SILAC (Stable isotope labeling by amino acids in cell culture)*

Dans cette technique, deux milieux de culture sont comparés⁴⁶. Ces deux milieux correspondent à deux états physiologiques différents. Dans l'un des deux milieux sont ajoutés des acides aminés marqués par des isotopes stables (¹⁵N, ¹³C). Ces acides aminés seront incorporés au sein des protéines lors de leur synthèse. Les échantillons sont ensuite mélangés et traités ensemble (purification éventuelle, digestion enzymatique et analyse par LC-MS/MS). Une quantification relative d'un milieu par rapport à l'autre peut donc être réalisée. Plusieurs milieux peuvent être comparés si on met un seul type d'acide aminé marqué dans chaque milieu. Il faut toutefois que les peptides détectés contiennent cet acide aminé. C'est pourquoi on utilise généralement de la lysine ou de l'arginine qui sont présentes dans chaque peptide après digestion de la protéine cible par de la trypsine (excepté le peptide situé en position C-terminale).

III.1.3) Le marquage protéolytique

Deux lots d'échantillons peuvent être comparés dans ce cas. Le premier est digéré avec le protocole classique. Dans le second, de l'eau lourde (H₂¹⁸O) remplace l'eau lors de la digestion à la trypsine. Ceci résulte en l'incorporation de deux atomes d'oxygène 18 au niveau de la lysine ou de l'arginine. Le premier provient de l'hydrolyse de la liaison peptidique et le second serait le résultat de l'utilisation du peptide libéré comme pseudo substrat⁴⁷. L'inconvénient par rapport aux approches précédentes est que les deux lots sont mélangés après la digestion enzymatique. Les pertes potentielles de protéines préalables ne sont donc pas corrigées.

III.1.4) Le marquage chimique

Plusieurs fonctions sont accessibles pour un marquage chimique au sein d'une protéine :

- les amines présentes en position N-terminale (de la protéine mais également de chaque peptide après digestion enzymatique) ou sur les chaînes latérales des lysines,
- les acides carboxyliques présents en position C-terminale (de la protéine mais également de chaque peptide après digestion enzymatique) ou sur les chaînes latérales des acides aspartiques et glutamiques,
- les thiols présents sur les chaînes latérales des Cystéines.

III.1.4.1) Réaction sur les amines

III.1.4.1.1) Acétylation ou propionylation

Cette méthode consiste à introduire un anhydride acétique (ou propionique) dans un lot de protéines digérées et son homologue deutéré dans un second lot de protéines. Les lysines peuvent être protégées au préalable par conversion en homo-arginines⁴⁸. L'incrément de masse de cinq Daltons ainsi généré peut permettre une quantification relative des deux séries d'échantillons.

III.1.4.1.2) Réactifs à base d'esters de 1-Hydroxy-2,5-pyrrolidinedione

Plus connus sous le nom de dérivés de N-hydroxysuccinimide, ils réagissent avec les amines libres afin de former une amide :

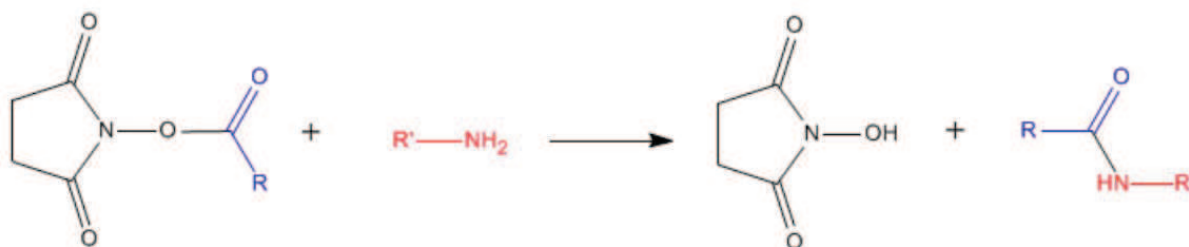


Figure 17 : Réaction entre une amine et un ester de N- hydroxysuccinimide.

Divers marquages par des isotopes stables ont donc été réalisés sur le groupement R afin de pouvoir quantifier simultanément plusieurs lots de protéines.

III.1.4.1.2.1) Méthode ICPL(Isotope-Coded Protein Labels)

Ce marquage introduit par les groupes de James⁴⁹ puis de Lottspeich⁵⁰ consiste à greffer sur les protéines un groupement (deuté ou non) issu de l'acide nicotinique.

III.1.4.1.2.2) Méthode mTRAQ®

Ce réactif, commercialisé par la société AB Sciex a été utilisé pour la première fois par Desouza *et al.* en 2008 pour la quantification d'un biomarqueur potentiel de cancer dans des tissus endométriaux⁵¹. Le greffon (N-carboxymethyl-N'-methylpiperazine) existe sous trois masses différentes : le premier ne contient pas d'isotopes lourds, le deuxième contient trois ¹³C et un ¹⁵N (soit une différence de masse de 4 Da par rapport au non marqué), le troisième contient six ¹³C et deux ¹⁵N (soit une différence de masse de 8 Da par rapport au non marqué).

III.1.4.1.2.3) Tandem Mass Tag et iTRAQ®

Les réactifs de type Tandem Mass Tag (ou TMT) ont été introduits par Thompson *et al.*⁵² en 2003 et sont aujourd'hui commercialisés par la société Thermo Scientific. Les réactifs de type iTRAQ® (Isobaric Tags for Relative and Absolute Quantitation) ont été utilisés par le groupe de Pappin⁵³ en 2004 et sont aujourd'hui commercialisés par la société AB Sciex. Ces deux réactifs sont composés d'un groupement qui va réagir sur les amines primaires, d'un bras qui va servir de balance et d'un ion rapporteur. La somme ion rapporteur et balance fait toujours la même masse. Le réactif iTRAQ® est présenté sur la figure suivante :

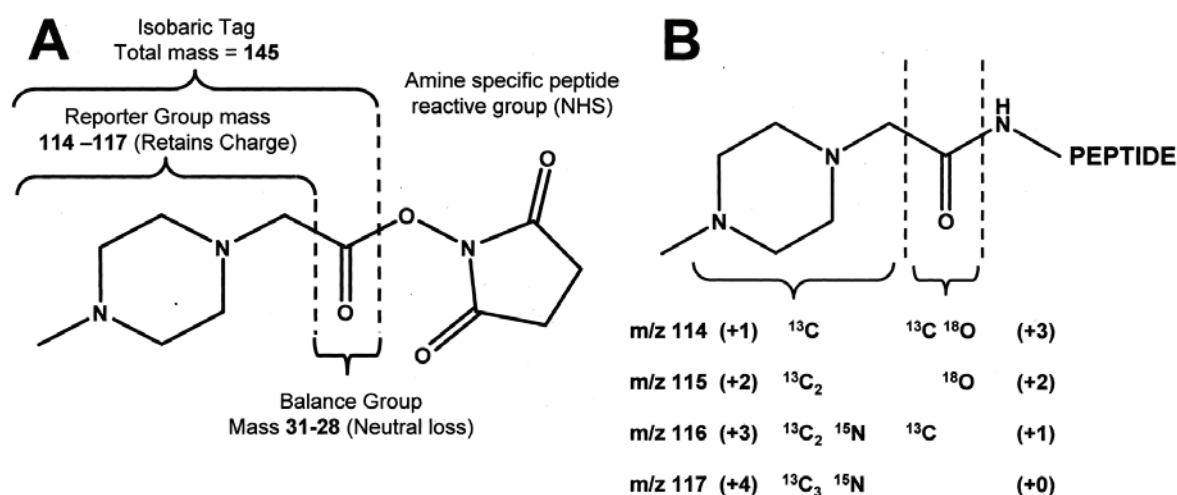


Figure 18 : Structure du réactif iTRAQ® (d'après Ross *et al.*⁵³).

Ce réactif est constitué d'un groupe rapporteur dont la masse varie de 114 à 117 Da et d'une balance dont la masse varie de 31 à 28 Da de façon à ce que l'ensemble ait une masse fixe de 145 Da. Les masses du groupe rapporteur et de la balance sont ajustées par l'incorporation d'isotopes lourds (¹³C, ¹⁵N et ¹⁸O). Ce réactif permet donc de comparer quatre états différents. Ces quatre états sont mélangés, digérés et analysés par LC-MS/MS. Puisque les quatre réactifs ont la même masse, le premier analyseur va laisser passer simultanément les quatre peptides marqués. En revanche, après fragmentation, la liaison entre la balance et le rapporteur est rompue : ceci va permettre d'observer des ions de la masse 114 à la masse 117. La quantification va alors se faire en comparant l'aire de chacun de ces ions obtenus après fragmentation.

Les réactifs Tandem Mass Tag permettent de comparer six états différents. Une version plus récente des réactifs iTRAQ® permet de comparer huit états.

III.1.4.2) *Réaction sur les thiols*

III.1.4.2.1) ICAT (isotope-coded affinity tag) et dérivés

Ces réactifs développés par le groupe d'Aebersold en 1999⁵⁴ sont constitués d'une fonction réagissant sur les cystéines (groupe iodoacétamide), d'un bras pouvant contenant zéro ou huit atomes de deutérium et d'un groupement biotine permettant la purification des peptides dérivés. Les inconvénients de ces réactifs sont d'une part la présence de deutérium qui peut induire une variation de rétention par rapport à son homologue non marqué⁵⁵. D'autre part, la partie biotine diminue la qualité de la fragmentation en CID par rapport à un résidu plus petit sur la cystéine. Ces constats ont amené au développement de réactifs ICAT de seconde génération qui sont marqués par du carbone 13 et qui sont clivables en milieu acide^{56,57}.

Une autre variante consiste en un réactif photoclivable greffé sur une bille⁵⁸. Dans ce cas, les peptides contenant une cystéine sont piégés sur le support ce qui permet leur purification. Ces peptides sont ensuite libérés par le clivage du bras liant la cystéine au support. Ce bras peut être non marqué ou marqué par sept atomes de deutérium.

III.1.4.2.2) ALICE (Acid-Labile Isotope-Coded Extractants)

La méthode ALICE a été présentée par le groupe de Qiu⁵⁹ en 2002. Ce réactif est composé d'un groupement maléimide qui va réagir sur les thiols, d'un bras contenant zéro ou dix atomes de deutérium et d'une résine qui permet la purification des peptides à cystéine et qui pourra être clivée en milieu acide afin de libérer les peptides capturés.

III.1.4.2.3) HysTag

Ce réactif est présenté sur la Figure 19 :

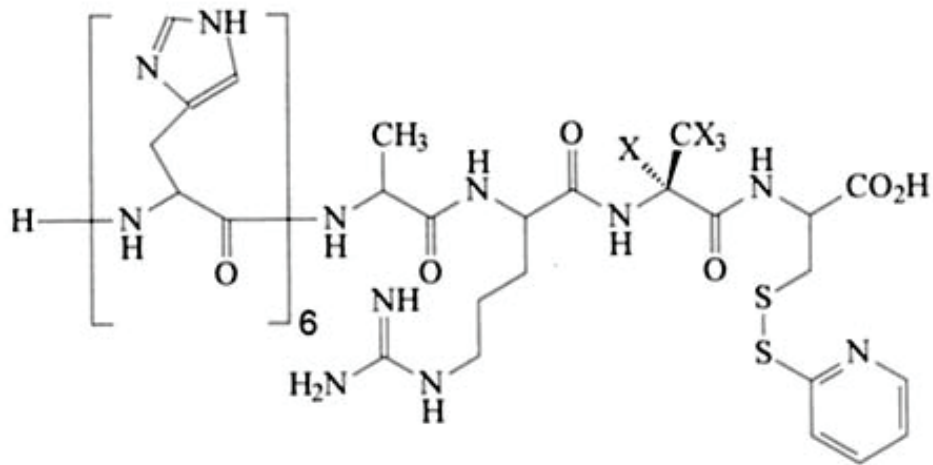


Figure 19 : Structure du réactif HysTag (d'après Olsen *et al.*⁶⁰).

Il est donc constitué de dix acides aminés :

- six histidines qui permettront la purification du peptide dérivé par affinité avec des cations métalliques (Ni^{2+} par exemple),
- un site de clivage par la trypsine (enchaînement alanine – arginine),
- une alanine servant pour le marquage isotopique : elle contient donc zéro ou quatre atomes de deutérium ($\text{X} = \text{H}$ ou $\text{X} = \text{D}$),
- une cystéine dérivée par un groupement réactif aux thiols (groupement 2-pyridyle disulfure).

Dans cette méthode, les protéines sont dans un premier temps marquées par le réactif HysTag puis digérées par de l'endoprotéinase Lys-C. Cette enzyme va hydrolyser de manière spécifique les liaisons peptidiques situées après une lysine. L'avantage de cette enzyme est qu'elle ne va pas hydrolyser le tag (ce que ferait la trypsine). Les peptides générés sont ensuite purifiés par affinité ou par chromatographie d'échange de cations. Ensuite, les peptides purifiés sont digérés par de la trypsine afin de libérer le tag histidine.

III.2) La quantification absolue

La quantification absolue des protéines se fait essentiellement par étalonnage interne. Cependant, un étalonnage externe peut être réalisé dans certains cas.

III.2.1) Etalonnage externe

Cette méthode est très fréquemment utilisée pour des dosages réalisés par absorption, émission ou fluorescence moléculaire (UV, ELISA...). Cette méthode possède l'avantage d'être simple et peu onéreuse puisqu'elle consiste en la réalisation d'une gamme d'analyte dans une matrice blanche (si possible) ou dans l'eau afin de réaliser une courbe d'étalonnage du type signal mesuré en fonction de la concentration ajoutée d'analyte comme le montre par exemple la Figure 20 :

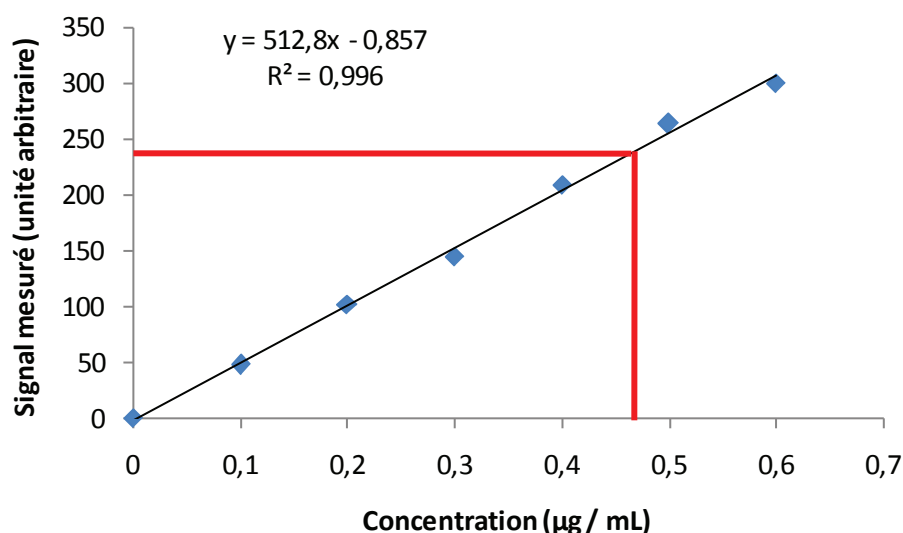


Figure 20 : Exemple de dosage par étalonnage externe.

L'échantillon inconnu est ensuite analysé et sa concentration est déduite en fonction du modèle défini au préalable par l'équation suivante :

$$\text{concentration de l'analyte (en } \mu\text{g/mL)} = \frac{\text{signal mesuré} + 0,857}{512,8}$$

Le plus gros inconvénient de cette approche est qu'elle nécessite la présence d'une matrice blanche ce qui n'est quasiment jamais possible à cause des protéines endogènes. Cependant, l'antigène spécifique de la prostate (PSA) qui est un marqueur tumoral du cancer de la prostate a pu être dosé dans du sérum par étalonnage externe¹⁷. Pour cela, une gamme de PSA a été réalisée dans du sérum de femme (qui ne contient donc pas de PSA), les échantillons ont été digérés par de la trypsine et l'aire d'un peptide rapporteur a été mesurée en fonction de la concentration de PSA ajoutée. Ensuite, le PSA a été dosé dans plusieurs sérums d'homme. Les résultats obtenus sont parfaitement corrélés avec les dosages réalisés par ELISA ($r^2 = 0,96$) ce qui prouve que l'étalonnage externe peut s'avérer efficace pour la quantification absolue de protéines par LC-MS/MS. Cependant, cet exemple représente un cas rare du fait de la difficulté de l'obtention d'une matrice blanche. C'est pourquoi l'étalonnage interne est essentiellement pratiqué.

III.2.2) Etalonnage interne

III.2.2.1) Principe

Dans cette méthode, un composé différent de l'analyte est ajouté en quantité connue dans l'échantillon. L'étalon doit avoir des caractéristiques physico-chimiques (masse, hydrophobicité, pKa...) très proches de l'analyte recherché afin de corriger un maximum de sources de variations. En spectrométrie de masse, le meilleur étalon interne est l'analyte marqué par des isotopes stables comme le carbone 13 ou l'azote 15. En effet, puisque la séquence de l'étalon et de l'analyte sont les mêmes, l'étalon subira les mêmes pertes éventuelles lors de la préparation d'échantillon et sera élué en même temps que l'analyte. En revanche, l'incorporation d'isotopes stables s'accompagne d'une augmentation de la masse de l'étalon par rapport à celle de l'analyte. Les deux pourront donc être aisément distingués en SRM.

Puisque l'étalon interne est ajouté en quantité connue dans l'échantillon, un simple produit en croix permet de remonter à la concentration de l'analyte (à condition de se trouver dans le domaine de linéarité de la réponse) :

$$\text{concentration de l'analyte} = \text{concentration de l'étalon} \times \frac{\text{signal de l'analyte}}{\text{signal de l'étalon}}$$

Pour la quantification de protéines en spectrométrie de masse via un peptide rapporteur, trois approches ont été développées : AQUA, QCAT et PSAQ.

III.2.2.2) AQUA

La méthode AQUA (pour Absolute QUAntification) a été introduite par le groupe de Gygi en 2003⁶¹. Un peptide ayant la même séquence que le peptide rapporteur choisi est synthétisé avec un acide aminé marqué par des isotopes lourds (¹³C ou ¹⁵N). Le peptide lourd a rigoureusement les mêmes propriétés physico-chimiques que le peptide naturel (à l'exception d'une masse plus élevée). Il est ajouté en quantité connue immédiatement après la digestion enzymatique et va donc corriger tous les biais dans l'analyse situés en aval de la digestion enzymatique mais pas ceux situés en amont (pertes lors du stockage de l'échantillon, déplétion des protéines majoritaires, purification de la protéine d'intérêt...). Puisqu'il est ajouté à l'issue de la digestion enzymatique, il ne va pas non plus corriger le rendement de digestion. Lors d'un dosage par cette méthode, il faut donc s'assurer que toutes les manipulations d'échantillons soient reproductibles tant que la protéine n'a pas été hydrolysée. Ceci est d'autant plus vrai si la digestion enzymatique n'est pas totale. Dans ce cas, il faudra estimer le rendement de digestion et appliquer un facteur correctif afin de ne pas introduire de biais dans le dosage.

Cet étalonnage est actuellement le plus utilisé du fait de la simplicité d'obtention des peptides marqués.

III.2.2.3) QCAT (*Quantification conCATemer*)

Cette méthode consiste à concaténer différents peptides marqués par des isotopes stables (peptides AQUA) et à produire le polypeptide artificiel sous la forme d'une protéine recombinante lourde⁶².

L'étalon est alors ajouté avant l'étape de digestion des protéines (et avant l'étape éventuelle de dénaturation des protéines) ce qui permet de corriger les pertes de protéines lors de ces manipulations. De cette façon, il est possible d'obtenir un standard pour calibrer le dosage simultané de plusieurs protéines à moindre coût. L'étalon QCAT ne permet pas forcément de corriger le rendement de digestion bien qu'il soit présent dès le début de la préparation d'échantillons. En effet, même s'il doit être hydrolysé par la trypsine pour libérer des peptides de type AQUA, le rendement de clivage dépend de la conformation de la protéine. Cette conformation dépend de la séquence entière de la protéine. L'étalon QCAT et les protéines ciblées ne peuvent donc pas avoir la même conformation. Ainsi, le rendement de digestion ne peut pas être corrigé avec certitude par cette approche. Par exemple, il a été montré que certains peptides de l'étalon QCAT pouvaient se digérer plus rapidement que les mêmes peptides issus de la protéine cible⁶³. De même, la solubilité de la protéine n'est pas la même que celle de l'étalon QCAT. L'idéal serait donc d'avoir comme étalon la même protéine que celle à doser. C'est le principe de l'étalonnage suivant.

III.2.2.4) PSAQ

Pour pallier les problèmes cités précédemment, Virginie Brun *et al.*⁶⁴ ont proposé d'utiliser une méthode baptisée PSAQ (pour Protein Standard Absolute Quantification). Dans ce cas, l'étalon interne est une protéine recombinante, ayant la même séquence que la protéine naturelle mais synthétisée avec des acides aminés marqués par des isotopes stables. Cet étalon est ajouté dès le début de la préparation d'échantillon et permet donc de tenir compte de toutes les pertes d'échantillon lors par exemple de la purification de la protéine cible ainsi que du rendement de digestion. Cependant, l'obtention des étalons PSAQ bien solubles et purifiés est assez difficile⁶⁵.

III.2.3) Les difficultés liées à la quantification absolue de protéines par spectrométrie de masse

Quelle que soit la méthode de quantification choisie, mettre au point une méthode de quantification absolue de protéines par spectrométrie de masse présente un certain nombre d'obstacles. Ce paragraphe va plus particulièrement s'attacher à la quantification de protéines plasmatiques mais les mêmes difficultés sont rencontrées dans d'autres matrices. Parmi ces difficultés, on trouve la gamme dynamique de toutes les protéines présentes qui vont engendrer un effet matrice, la spécificité des peptides choisis et les étalons eux-mêmes.

III.2.3.1) La protéomique dans le sang

Les protéines sanguines sont analysées à partir de plasma ou de sérum. Le plasma est la partie liquide du sang c'est-à-dire du sang dans lequel ont été enlevées les cellules (hématies, plaquettes et leucocytes) après ajout d'anticoagulants et centrifugation. Le plasma représente 55% du volume sanguin. Le sérum est la partie liquide du sang obtenue après coagulation. Autrement dit, le sérum est un plasma ne contenant plus les protéines ayant coagulé comme les fibrines.

Dans le plasma humain, on estime qu'il y a plus de 20 000 protéines différentes⁶⁶. La concentration totale des protéines dans le plasma est de 60 à 80 mg/mL. Une difficulté dans l'analyse du plasma est la grande gamme dynamique de ces protéines. Cette gamme dynamique est représentée sur la Figure 21:

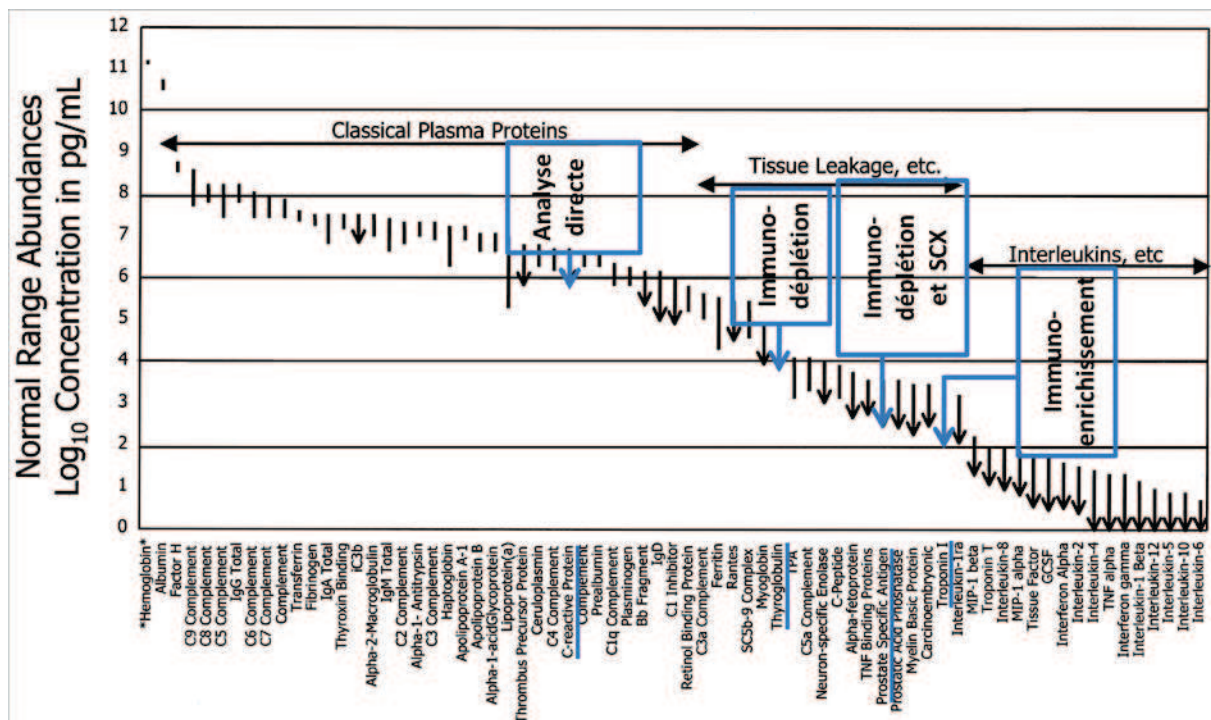


Figure 21 : Concentration de 70 protéines dans le plasma (d'après Anderson et Anderson⁶⁷).

La quantité d'albumine à elle seule représente environ la moitié de la quantité totale de l'ensemble des protéines plasmatiques. En effet, sa concentration est de l'ordre de 40 mg / mL. Ainsi, une vingtaine de protéines représentent 90% de la quantité totale de protéines plasmatiques totales. Actuellement, les limites de quantifications en spectrométrie de masse sont situées en dessous du ng/mL⁶⁸ ce qui est 40 million de fois moins concentré que l'albumine. Les grandes approches ayant permis d'atteindre ces limites sont présentées en bleu et seront détaillées ultérieurement.

III.2.3.2) L'effet matrice

Puisqu'en spectrométrie de masse, le signal détecté dépend du nombre d'ions transmis jusqu'au détecteur et que ces ions sont émis dans la source électrospray (*cf.* paragraphe II.2.2.1.2) page 38 pour le fonctionnement de la source ESI), on peut supposer que le signal détecté soit proportionnel à la concentration de l'analyte. Par conséquent, on pourrait relier l'aire sous le pic chromatographique à la quantité d'ions. Cependant, d'autres phénomènes entrent en jeu. En effet, les molécules de l'échantillon qui sont coéluees avec le composé d'intérêt peuvent interférer avec l'ionisation de ce composé, ce qui peut causer une suppression ou une augmentation d'ionisation. Ce phénomène est appelé effet matrice et a été décrit pour la première fois par Kebarle et Tang en 1993⁶⁹.

La principale cause de l'effet matrice est un changement de propriétés de la gouttelette à cause de la présence d'espèces moins volatiles^{70,71}. Ceci va modifier l'efficacité de formation des gouttes ou de l'évaporation de l'analyte⁷². Les molécules moins volatiles peuvent entraîner la coprécipitation de l'analyte. De plus, le cation d'intérêt peut être déprotoné lors de réactions en phase gaz ce qui va diminuer le signal. Dans ce cas, on parle d'effet matrice négatif.

Inversement, l'évaporation ou la protonation de l'analyte peut être favorisée selon la matrice. On parlera alors d'effet matrice positif.

Il existe différentes méthodes pour évaluer l'effet matrice. On peut citer les deux plus fréquentes. La première est l'infusion post-colonne définie par Bonfiglio *et al.*⁷³ : elle permet une évaluation qualitative de l'effet matrice et est représentée sur la Figure 22 :

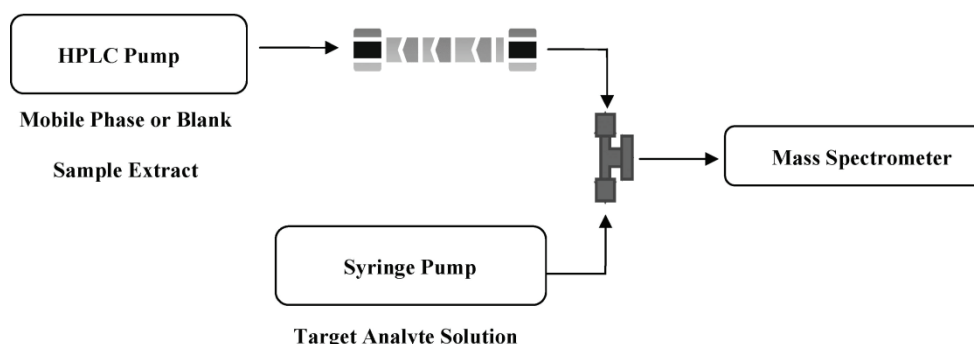


Figure 22 : Evaluation de l'effet matrice par l'infusion post-colonne (d'après Trufelli *et al.*⁷⁴).

Une pompe délivre une quantité constante d'analyte entre la sortie de la colonne chromatographique et la source. Un échantillon ne contenant pas l'analyte est injecté et le spectromètre de masse suit l'analyte pendant toute la durée du gradient chromatographique. En l'absence d'effet matrice, le signal obtenu doit être constant. L'avantage de cette méthode est qu'elle permet de voir l'effet matrice sur tout le chromatogramme. Cependant, elle ne permet pas d'évaluer l'effet matrice simultanément sur un grand nombre de peptides.

La seconde méthode est celle des ajouts post extraction proposée par Matuszewski *et al.*^{75,76} : elle permet une évaluation quantitative de l'effet matrice :

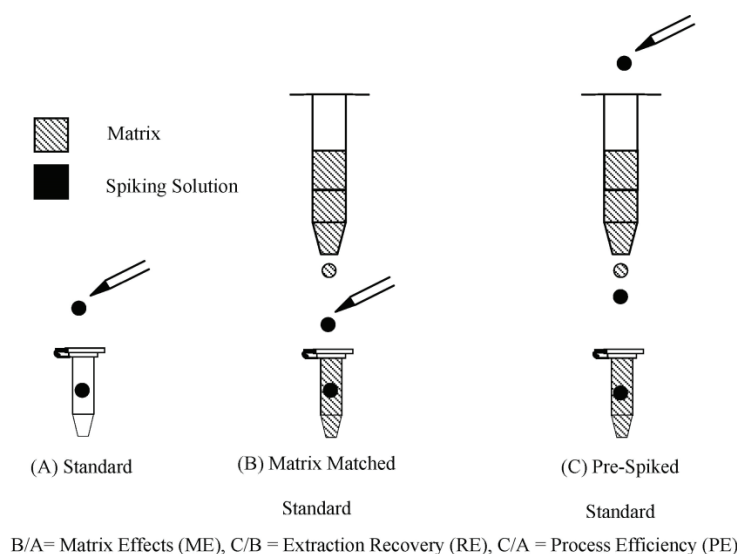


Figure 23 : Evaluation de l'effet matrice par les ajouts post-extraction (d'après Trufelli *et al.*⁷⁴).

Dans cette approche, il est proposé de réaliser cinq gammes d'analyte dans l'eau (solutions A), cinq gammes d'analyte dans la matrice après avoir réalisé l'extraction (solutions B), et cinq gammes d'analyte dans la matrice avant d'avoir réalisé l'extraction (solutions C). Ainsi, le rapport entre la pente de la gamme issue des solutions B et celle issue des solutions A donnera l'effet matrice. Cette méthode permet également d'obtenir le rendement de l'extraction en divisant la pente des solutions C par celle des solutions B. Enfin, la comparaison entre les solutions C et A donne le rendement global de l'analyse. Dans ce cas, l'effet matrice peut donc être évalué simultanément sur tous les analytes d'intérêt. Cette approche peut toutefois être réalisée sur un seul point sans faire de gamme complète. Dans ce cas, il faut que la concentration testée soit proche de la concentration qui sera rencontrée lors des dosages.

L'un des problèmes posé par l'effet matrice est donc que la réponse de l'analyte va varier en fonction de la présence d'autres composés. Ceci est donc très gênant lorsqu'une quantification absolue veut être réalisée par étalonnage externe. En revanche, l'utilisation d'étalons internes permet de s'affranchir de ce problème de variation de réponse. En effet, puisque l'étalon interne est un peptide marqué par des isotopes stables ayant la même séquence que l'analyte, il sera coélué avec l'analyte et subira donc les mêmes augmentations ou suppressions de signal. L'effet matrice est alors corrigé. Il faut cependant veiller à ce que l'étalon soit ajouté en quantité proche de celle de l'analyte. En effet, si l'étalon est ajouté en quantité largement supérieure à celle de l'analyte, il pourrait générer de l'effet matrice et modifier la réponse de l'analyte. La quantification serait alors biaisée. Il est donc important d'avoir une estimation de la concentration attendue. Le plasma humain étant une matrice très étudiée, la concentration de la plupart des protéines est documentée. En revanche, pour des matrices peu étudiées comme nous en rencontrerons dans le deuxième chapitre chez un invertébré, des analyses préliminaires doivent être réalisées afin d'estimer la concentration des protéines cibles.

Le seul problème réellement posé par l'effet matrice n'est donc pas d'introduire un biais dans le dosage mais plutôt d'empêcher d'atteindre des limites de quantification très basses. En effet, il est

rare que l'effet matrice soit positif. L'enjeu de la quantification de biomarqueurs est généralement de doser des protéines très faiblement concentrées dont le signal est supprimé par les protéines les plus abondantes. L'effet matrice doit donc être diminué en adaptant la préparation d'échantillon. Différentes stratégies mises en place pour abaisser les limites de quantification seront développées ultérieurement.

III.2.3.3) *La spécificité du peptide quantifié*

Puisque la quantification d'une protéine est en fait une quantification d'un peptide issu de la protéine après digestion enzymatique, il faut s'assurer que le peptide étudié soit le reflet réel de la protéine. Pour cela, il faut d'abord vérifier que le peptide choisi provienne uniquement de la protéine d'intérêt. En effet, il peut exister des homologues de séquence entre différentes protéines. Ainsi, après digestion enzymatique, deux peptides de séquence identiques peuvent être générés à partir de deux protéines différentes. Le dosage de ce peptide donnera donc la concentration de la protéine cible plus celle de la seconde protéine. Chez l'homme, la spécificité du peptide est facile à vérifier puisque tout le génome a été séquencé. Il suffit donc d'effectuer un BLAST (Basic Local Alignment Search Tool). Une autre possibilité est d'effectuer une recherche dans des bases de données telles que PeptideAtlas⁷⁷. Cette base de données recense les peptides qui ont été détectés par spectrométrie de masse. Elle est donc un bon point de départ pour définir les peptides qui peuvent être recherchés par LC-MS.

En revanche, lorsque la protéine étudiée appartient à un organisme pas ou peu séquencé, ce qui est le cas de beaucoup d'invertébrés bien qu'ils représentent un fort intérêt en écotoxicologie, d'autres moyens doivent être mis en place afin de s'assurer de doser la bonne protéine. Dans ce cas, il est nécessaire de suivre l'évolution de l'aire de plusieurs peptides issus de la protéine cible simultanément. Cette stratégie sera appliquée lors du développement d'une méthode de quantification de la Vitellogénine lors du prochain chapitre de ce manuscrit. Lorsque le peptide spécifique est sélectionné, une autre étape cruciale concerne l'évaluation du rendement de digestion.

III.2.3.4) *Evaluation du rendement de digestion*

Il est à noter que même si chez l'homme, la spécificité biologique d'un peptide est facilement vérifiable, il est tout de même recommandé d'effectuer la quantification sur plusieurs peptides afin de comparer le résultat obtenu à partir de ces peptides. Ceci permet notamment de valider le fait que la digestion enzymatique soit répétable au niveau des peptides sélectionnés. Même si un étalonnage de type QCAT permet en théorie de s'affranchir d'une digestion incomplète, il a déjà été rapporté que les acides aminés situés à proximité de la zone de coupure enzymatique avaient une influence sur le rendement de la digestion⁶³. Dans ce cas, les étalons de type PSAQ sont un atout supplémentaire. Dans le cas d'une quantification par ajout du peptide marqué (AQUA), le rendement

de digestion peut être estimé en ajoutant une quantité connue de la protéine d'intérêt dans une matrice blanche puis en ajoutant le peptide marqué en quantité connue également. Ainsi, après digestion, l'ensemble est analysé par LC-MS/MS et le rapport entre l'aire du peptide léger et celle du peptide marqué est calculé. Si la protéine et le peptide marqué ont été ajoutés en même quantité molaire, ce rapport donne directement le rendement de digestion de la protéine. Cette approche nécessite toutefois que la protéine soit disponible. De plus, comme dans le cas du PSAQ, les protéines commerciales ne sont que de simples protéines : elles ne sont donc pas modifiées comme peuvent l'être les protéines endogènes (phosphorylation, glycosylation...). Ces modifications post traductionnelles peuvent également modifier l'activité de la trypsine (probablement du fait d'une conformation tridimensionnelle différente). En effet, Agger *et al.*⁷⁸ ont montré que l'ajout de protéines purifiées (dans leur cas, de l'apolipoprotéine A-I et de l'apolipoprotéine B) dans une matrice standard ne reflétait pas l'efficacité de digestion des protéines endogènes plasmatiques. Ces modifications post traductionnelles obligent également l'opérateur à être encore plus vigilant lors du choix du peptide. En effet, les peptides contenant des acides aminés sur lesquels des modifications post traductionnelles peuvent se produire sont à éviter afin de ne pas introduire de biais dans le dosage (si le peptide est modifié, sa masse va changer et il ne sera alors plus détecté en SRM). Ces acides aminés seront vus plus en détail dans un paragraphe ultérieur sur les critères de choix des peptides protéotypiques. Encore une fois, les modifications post traductionnelles sont généralement bien décrites chez l'homme mais pas chez les invertébrés.

Dans tous les cas, l'étape de digestion enzymatique est une étape cruciale qu'il ne faut pas négliger. Il existe de nombreuses façons de dénaturer une protéine avant sa digestion (*cf.* paragraphe II.2.1) page 35) et chaque protéine va être digérée différemment selon ces traitements. De plus, pour un protocole de dénaturation donnée, deux protéines différentes ne seront pas digérées à la même vitesse. Le groupe de Christoph Borchers a étudié l'effet de nombreux protocoles de dénaturation (agents chaotropes, dénaturation thermique, détergents, solvants organiques) sur la rapidité de la digestion enzymatique²⁰. Ils ont étudié 45 protéines plasmatiques et les ont classées en trois groupes : les protéines digérées rapidement, modérément ou résistantes à la digestion. Sur les 45 protéines, 31 ont été totalement digérées en 9 heures et le signal mesuré reste stable pendant au moins 7 heures supplémentaires. Dans ce cas, la digestion a été considérée comme totale car le signal mesuré ne varie plus en fonction du temps. En revanche, pour les 14 autres, aucun plateau n'est atteint ou alors le signal diminue.

Le rendement de digestion n'est pas indispensable à évaluer lorsque de nouveaux biomarqueurs veulent être découverts. En effet, l'objectif de la quantification de biomarqueurs n'est pas de donner leur concentration exacte (même si cela est préférable) mais plutôt d'évaluer l'évolution de son expression. Ainsi, si tout le processus de préparation d'échantillons est répétable, le biomarqueur pourra être étudié et quantifié de façon fiable : la concentration mesurée sera seulement sous évaluée. Cependant, si la digestion enzymatique n'est pas totale, la quantité de peptide rapporteur libérée ne sera pas maximale et donc le dosage sera moins sensible.

Quelle que soit la méthode d'étalonnage interne utilisée, la quantification se fait en se basant sur la concentration de cet étalon. Une autre question se pose alors : quelle est la concentration réelle de l'étalon ?

III.2.3.5) *Evaluation de la concentration de l'étalon*

La concentration réelle de l'étalon utilisée est une question rarement soulevée lors des dosages. Généralement, l'étalon peptidique est synthétisé sur un support solide selon la chimie Fmoc. Après sa synthèse, le peptide est purifié par HPLC et lyophilisé. Bien qu'une pureté soit déterminée par le fournisseur (généralement par analyse d'acides aminés), des pesées précises de très faibles quantités sont difficiles à réaliser. De plus, les peptides sont hygroscopiques donc la présence d'eau supplémentaire va engendrer une surestimation de la quantité d'étalon. Récemment, une méthode a été proposée par le groupe de Christoph Borchers pour quantifier les étalons peptidiques à partir de seulement 10 ng de peptide⁷⁹. Cette méthode est basée sur une hydrolyse totale du peptide en milieu acide puis sur la détermination de la concentration de chaque acide aminé par LC-MS/MS. La concentration a été obtenue en comparant le rapport entre l'aire de l'acide aminé et l'aire d'un étalon interne (la norleucine) obtenu dans le mélange issu de l'hydrolyse avec le rapport de l'aire du même acide aminé et de l'aire de la norleucine obtenues lors de gammes d'étalonnage. Le temps total d'analyse (hydrolyse et analyse par LC-MS/MS) est d'environ cinq heures.

Une fois la concentration de la solution de départ déterminée, il faut également s'assurer qu'elle reste stable sur la période du dosage. En effet, le coût des étalons est tel (plus de 100 euros par milligramme de peptide) qu'il n'est pas envisageable d'effectuer une pesée lors de chaque analyse. La stabilité de la solution mère doit donc être évaluée. Cette étude peut également se faire à différentes températures.

Maintenant que le principe de la quantification par spectrométrie de masse a été détaillé et que les principales difficultés ont été abordées, nous allons développer les principales étapes qui ont permis d'atteindre des sensibilités dans le plasma de l'ordre du ng / mL.

IV) Les stratégies mises en place pour améliorer la sensibilité des dosages

IV.1) *Analyse directe du plasma digéré*

Pour les petites molécules, la quantification par SRM sur un triple quadripôle est une technique de dosage bien établie depuis plusieurs décennies. En revanche, pour la quantification de protéines, cette approche n'émerge que depuis quelques années. Lors de l'analyse de petites molécules, les analytes sont généralement faiblement concentrés mais ont une nature chimique différente de celle de la matrice. Par conséquent, ils peuvent être séparés d'une grande partie de la matrice. A l'inverse, lors de l'analyse de protéines par le biais de peptides rapporteurs après digestion enzymatique, l'analyte a la même composition que la matrice. Il n'est donc pas possible de séparer le peptide d'intérêt de tous les peptides issus des protéines majoritaires. Il en résulte des effets de suppression de signal beaucoup plus importants et donc les limites de quantification sont plus élevées.

La première publication rapportant la quantification absolue d'une protéine après digestion enzymatique a été réalisée par Barr *et al.* en 1996. Dans cet article, ils ont décrit une méthode permettant de doser une solution de référence d'apolipoprotéine A-I par ajout de peptide rapporteur marqué⁸⁰.

L'une des premières études permettant d'estimer les limites de quantification qui pouvaient être atteintes lors d'analyse directe du plasma après digestion enzymatique a été réalisée en 2006 par Anderson et Hunter⁸¹. Dans cette étude, ils ont quantifié 53 protéines plasmatiques. La moins concentrée des protéines détectées est la L-selectine dont la concentration vaut 0,67 µg / mL. Une analyse plus récente de la protéine C-réactive dans le plasma a donné une limite de détection de 1,3 µg / mL⁸².

Il semble donc que les limites de quantification obtenues après une simple digestion enzymatique du plasma soient situées autour du µg / mL. Il est évident que les progrès instrumentaux vont permettre d'abaisser ces limites de quantification. Par exemple, l'étude menée par Anderson et Hunter a été réalisée sur un 4000 QTRAP (AB Sciex). Si la même étude était réalisée sur un 5500 QTRAP (AB Sciex) qui est également un appareil hybride de type Q-trap (cf. paragraphe II.2.3.1.2) page 50), les limites de quantification seraient abaissées d'un facteur cinq environ.

Afin de ne pas être limité par la sensibilité intrinsèque des spectromètres de masse, différents chemins ont été explorés pour détecter des protéines de moins en moins concentrées. Pour bien comprendre les stratégies employées, il faut revenir sur la Figure 21 page 64. Sur ce graphique apparaît la protéine C-réactive citée précédemment dont la concentration est située autour du µg / mL et qui représente donc un point de repère permettant de définir les protéines qui peuvent être quantifiées par analyse directe du plasma. Nous avons vu que la protéine plasmatique la plus concentrée est l'albumine et que cette protéine représente à elle seule 50% de la quantité totale des protéines plasmatiques. De même, environ vingt protéines représentent plus de 90% des protéines totales. Une stratégie qui vient alors à l'esprit est l'élimination de ces protéines majoritaires.

IV.2) Déplétion des protéines majoritaires

Pour ce faire, l'approche la plus utilisée est l'immuno-capture d'un certain nombre de protéines majoritaires. En effet, il existe des kits pour enlever uniquement l'albumine⁸³, l'albumine et les immunoglobulines G⁸⁴, les six protéines les plus abondantes (albumine, immunoglobuline G, immunoglobuline A, transferrine, anti-trypsin et haptoglobine)⁸⁵⁻⁸⁷, les sept plus abondantes (les six précédentes et les fibrinogènes)⁶⁸, les douze^{68, 88-89} ou les quatorze plus abondantes⁹⁰.

Après déplétion des six protéines majoritaires, Anderson et Hunter n'ont pas quantifié le gain apporté en terme de limite de détection. Cependant, ils ont observé de meilleurs rapports signal sur bruit pour les peptides étudiés avec des coefficients de variation améliorés. Si un peptide moins concentré avait été étudié, il aurait donc très probablement été détecté après déplétion mais pas sans cette étape.

Après déplétion des six mêmes protéines, Lin *et al.* ont obtenu une limite de détection située autour de 0,1 µg / mL pour l'adiponectine⁸⁵.

Tu *et al.* ont pu détecter 23 protéines dont la concentration est inférieure à 10 ng / mL (par exemple la thyroglobuline qui apparaît sur la Figure 21 page 64 et dont la concentration est estimée à 5 ng / mL) après déplétion des quatorze protéines majoritaires⁹⁰.

Des études ont également été menées afin de déterminer quelle quantité de protéine était réellement enlevée par les kits. Par exemple, la déplétion de sept protéines abaisse la quantité totale de protéines plasmatiques de 55 à 7,5 mg / mL. La déplétion de quatorze protéines amène cette quantité totale à 2,3 mg / mL⁶⁸. Björhall *et al.* ont comparé l'efficacité de la déplétion de l'albumine à partir de cinq kits commerciaux. Les rendements de déplétion vont de 96,0 à 99,5%⁹¹.

Bien qu'un rendement de déplétion de 99,5% puisse être considéré comme excellent, il faut garder à l'esprit que les 0,5% d'albumine restant correspondent à une concentration de 200 µg / mL (en partant d'une concentration initiale de 40 mg / mL). Même après une telle déplétion, l'albumine reste parmi les protéines les plus concentrées.

De plus, la déplétion des protéines majoritaires s'accompagne également de la déplétion d'autres protéines. Cette déplétion peut être due à des séquences protéiques similaires qui vont être reconnues par les anticorps fixés sur les colonnes de déplétion ou à des interactions non spécifiques avec le support des anticorps⁸⁸. Un autre phénomène probablement beaucoup plus fréquent est la liaison de protéines non ciblées par les anticorps avec des protéines ciblées comme l'albumine. En effet, l'albumine est connue pour transporter des petites molécules et des peptides dans le sang, mais de nombreuses protéines ont également été recensées dans la fraction enrichie en albumine après déplétion⁹². Cette déplétion non souhaitée peut être un atout si la protéine ciblée n'en fait pas partie puisque la matrice va être encore plus simplifiée. Cependant, si une étape de déplétion est choisie lors d'un dosage, il faut absolument évaluer l'impact de la déplétion sur la protéine cible. En effet, cette protéine peut être perdue en quantité non négligeable. Par exemple, il a été montré par l'équipe du laboratoire que de 95% du PSA pouvait être perdu lors de cette étape en fonction du kit utilisé¹⁷. Dans de tels cas extrêmes, la déplétion des protéines majoritaires est à proscrire puisque le gain de signal obtenu par la baisse de l'effet matrice ne va pas compenser la perte non spécifique de la protéine cible. Dans cette étude, la perte a pu être facilement évaluée puisque du PSA en quantité connue a été ajouté dans du sérum de femme (qui ne contient donc pas de PSA). Après digestion enzymatique et ajout de l'étalon interne marqué (peptide AQUA), le taux de PSA résiduel peut être déterminé. Ce cas (matrice blanche et protéine étalon disponible) n'est cependant pas toujours possible. L'évaluation de la quantité perdue peut alors se faire en déterminant la quantité de protéine cible dans la fraction enrichie en albumine ce qui n'est pas une tâche facile puisque la protéine cible va être très faiblement concentrée. La matrice doit alors être simplifiée c'est pourquoi, d'autres stratégies ont été développées pour purifier encore plus l'échantillon.

IV.3) Fractionnement de l'échantillon

L'une des approches les plus utilisées est le fractionnement par échange de cation (SCX) après digestion enzymatique. Ce fractionnement peut être réalisé avec ou sans immuno-déplétion. En fonction de sa composition en acides aminés, chaque peptide va posséder un point isoélectrique différent. Ainsi, en utilisant un support chargé négativement quelque soit le pH (par exemple un support sur lequel est greffé un acide sulfonique), et en déposant l'échantillon en milieu acide, la majorité des peptides seront retenus sur le support puisqu'ils seront chargés positivement. Ensuite, en augmentant progressivement le pH et / ou la force ionique, les peptides les plus acides vont être élués. Les peptides les plus basiques seront quant à eux élués en dernier. Si de nombreuses fractions sont réalisées, la matrice peut être fortement simplifiée. Par exemple Keshishian *et al.* ont réalisé une soixantaine de fractions qui ont ensuite été groupées par deux ou trois. Puis, seulement six des groupes ainsi formés ont été analysés⁶⁸. En effet, la génération de nombreuses fractions augmente considérablement le temps total d'analyse puisque toutes ces fractions doivent ensuite être analysées par LC-MS/MS. Sachant que le temps moyen pour une séparation chromatographique est situé autour de trente minutes, il est difficilement concevable d'analyser soixante fractions après la SCX puisque le temps d'analyse par échantillon serait alors de trente heures. Cette approche nécessite donc une première optimisation permettant de définir dans quelle fraction va se trouver le peptide d'intérêt afin de n'analyser que cette fraction. En utilisant cette méthode après déplétion des douze protéines majoritaires, ils ont obtenu une limite de quantification de 2,5 ng / mL pour le PSA (contre 25 ng / mL avec seulement la déplétion). Cette limite est également illustrée sur la Figure 21 page 64 et aurait même pu être abaissée puisque le rapport signal sur bruit est de 24. Cependant, deux ans plus tard, ils ont développé une méthode de quantification pour neuf marqueurs de risque cardiovasculaire en utilisant la même stratégie. Bien qu'ils n'aient détecté que six protéines sur les neuf, la limite de quantification déterminée pour le peptide natriurétique de type B est d'environ 0,8 ng / mL⁸⁹.

Une autre possibilité consiste à fractionner les protéines avant digestion enzymatique selon leur taille par chromatographie d'exclusion stérique (SEC). Cette stratégie a permis de quantifier la protéine C-réactive qui n'était pas détectée sans purification ni déplétion des trois protéines majoritaires⁹³. Sur le même principe, Hoofnagle *et al.* ont enrichi la thyroglobuline par exclusion stérique puisque cette protéine est constituée de deux monomères de 330 kDa. Cette approche leur a permis de gagner un facteur 10 en sensibilité mais ce gain n'est pas suffisant pour détecter cette protéine dans le plasma (leur limite de quantification après exclusion stérique est située autour du µg / mL alors que les concentrations attendues pour cette protéine sont de l'ordre du ng / mL)⁹⁴.

Une approche rapide réside dans la simple filtration de l'échantillon avec un filtre ayant une limite en masse de 30 kDa par exemple⁹⁵. Puisque l'albumine a une masse de 67 kDa, elle peut être éliminée par cette approche. Le principal inconvénient est que seules les plus petites protéines peuvent être analysées. Il est cependant intéressant de noter que dans cette étude, les protéines ayant traversé le filtre ont été digérées puis identifiées. Parmi les protéines identifiées figure l'albumine. Puisque la protéine entière n'est à priori pas passée à travers le filtre, des fragments d'albumine sont déjà présents dans le plasma. Ces fragments vont participer à la complexité de la matrice et il est probable qu'ils ne soient pas éliminés par la déplétion des protéines majoritaires. Dans le même style de

fractionnement, Terracciano *et al.* ont mélangé des particules de silice poreuse avec du plasma. Les protéines récupérées sont uniquement celles qui arrivent à pénétrer dans les pores qui sont suffisamment petits pour exclure l'albumine⁹⁶.

Le fractionnement de l'échantillon par échange d'ions ou par exclusion stérique est donc une méthode moins onéreuse que l'immuno-déplétion puisqu'il ne nécessite pas d'anticorps. Le principal inconvénient du fractionnement réside dans le nombre assez important de fractions à analyser (plusieurs dizaines pour avoir un fractionnement efficace). Ceci n'est bien sûr un problème que lorsque plusieurs analytes élués dans différentes fractions doivent être quantifiés. Si la sensibilité de la méthode le permet, ces fractions peuvent toutefois être groupées pour être analysées en même temps (par exemple si un peptide très acide et un autre très basique doivent être quantifiés, la première et la dernière fraction peuvent être groupées). Un autre inconvénient du fractionnement est qu'il faut réussir à évaluer les pertes d'analyte si l'objectif est d'obtenir un résultat quantitatif. Ceci n'est toutefois pas un problème si le fractionnement s'effectue après la digestion enzymatique et qu'un étalon AQUA est ajouté avant le fractionnement. Enfin, même si de nombreuses fractions sont réalisées, il reste très certainement des peptides issus de protéines majoritaires dans la fraction à analyser. Ces peptides peuvent causer suffisamment de suppression de signal pour limiter la sensibilité de la méthode. Une autre approche a alors été envisagée : il s'agit d'enrichir l'analyte cible qui est faiblement concentré au lieu d'éliminer les interférents majoritaires.

IV.4) Immuno-enrichissement

Comme son nom l'indique, cette méthode est basée sur un enrichissement par des anticorps. Les mêmes limitations que lors d'un dosage par ELISA vont donc être rencontrées : disponibilité de l'anticorps, spécificité et coût de l'analyse. On peut toutefois émettre une réserve sur la spécificité de l'anticorps. En effet, cette spécificité est indispensable en ELISA afin de ne pas introduire de biais dans le dosage alors que lorsque l'anticorps sert uniquement à enrichir l'analyte cible, si d'autres protéines sont enrichies, la purification sera uniquement moins efficace. Par conséquent, l'analyse risque d'être moins sensible mais le résultat ne sera pas biaisé (toujours à condition de vérifier le rendement d'extraction si l'étalon adéquat n'est pas présent dans l'échantillon lors de la purification).

Deux grandes stratégies ont été mises en place pour réaliser cet immuno-enrichissement : ce dernier est réalisé soit au niveau de la protéine, soit au niveau peptidique.

IV.4.1) Au niveau protéique

Le principe de ces deux stratégies est le même, à savoir la fixation d'un anticorps dirigé contre l'analyte sur un support solide. Ensuite, l'échantillon est incubé avec ce support puis rincé afin d'éliminer toutes les molécules qui ne se sont pas fixées. Enfin, les analytes sont décrochés.

Dans le cas de l'immuno-enrichissement d'une protéine, cette dernière est ensuite digérée et les peptides sont analysés par LC-MS/MS. En utilisant cette méthode, Callipo *et al.* ont obtenu une limite de détection de 14,6 ng / mL pour l'anhydrase carbonique II à partir de 20 µL de sérum⁹⁷.

Une limite de détection très basse (14,5 pg / mL) a été obtenue lors du dosage de l'hormone parathyroïdienne⁹⁸. Une telle prouesse a pu être réalisée par l'utilisation d'un spectromètre de masse plus récent (API 5500) donc plus sensible. Ensuite, l'extraction de cette protéine a été réalisée à partir d'un volume initial important (1 mL). Puis, contrairement à la majorité des analyses en protéomique, la séparation chromatographique a été effectuée sur une colonne de 2,1 mm de diamètre (alors que les analyses se font traditionnellement sur des colonnes de diamètre inférieur à 1 mm). Généralement, des colonnes de faible diamètre sont utilisées car elles permettent d'effectuer les séparations à des débits de solvant très faible ce qui permet une bonne désolvatation des ions et donc un meilleur signal. Cependant, la quantité de peptides pouvant être injectée sur ces colonnes est très limitée. A quantité de peptides injectés identique, les colonnes de faible diamètre permettront d'atteindre des limites de détection plus faibles. Cependant, cette baisse de sensibilité liée au débit de phase mobile lors de l'utilisation de colonnes de 2,1mm peut être compensée par l'injection de quantités de peptides beaucoup plus importantes.

Ces études montrent que des limites de quantification très basses peuvent être atteintes après immuno-enrichissement de la protéine d'intérêt. Une étude sur le dosage de la proGRP (Progastrin releasing peptide) a montré que la limite de quantification en partant de 200 µL de sérum était de 0,33 ng / mL après immuno-enrichissement⁹⁹. Une étude précédente réalisée par le même groupe a déterminé que la limite de détection était plus élevée (d'un facteur 7,5) en utilisant le même matériel (colonne et spectromètre de masse) mais en partant de 1 mL de sérum et sans étape d'immuno-enrichissement¹⁰⁰. Ces deux études permettent d'illustrer l'intérêt de l'immuno-enrichissement.

Une méthode originale d'enrichissement peut être appliquée lorsque des anticorps doivent être dosés. En effet, au lieu de développer un anticorps dirigé contre l'anticorps à doser afin de l'enrichir, le support d'extraction peut être greffé avec l'antigène de l'anticorps à doser. Après extraction de l'anticorps (Erbix), il a été digéré puis quantifié. La limite de quantification obtenue est de 20 ng / mL¹⁰¹.

Enfin, selon la taille de la protéine cible, celle-ci peut être analysée directement après enrichissement sans digestion enzymatique. Cette approche a été démontrée pour la quantification de cinq insulines (bovine, porcine, humaine et deux analogues) ajoutées dans du plasma de cheval. La séquence de ces cinq insulines étant différente de celle du cheval, elles ont pu être dosées de façon indépendante. L'intérêt de la méthode proposée réside dans le fait que ces insulines peuvent servir de produit dopant pour le cheval. Après purification de 3 mL de plasma, les cinq insulines ont pu être détectées à une concentration de 50 pg / mL¹⁰².

L'immuno-enrichissement de la protéine cible est donc une stratégie intéressante permettant d'abaisser de façon drastique les limites de quantification dans le sérum ou le plasma grâce à une énorme simplification de la matrice. Cependant, cette stratégie devient délicate à appliquer lorsqu'aucun anticorps dirigé contre la protéine cible n'est disponible. Pour éviter la production d'anticorps dirigés contre une protéine entière, une alternative consiste à produire un anticorps

dirigé contre seulement un peptide. Cette approche est plus facile à mettre en œuvre car il est plus délicat de synthétiser et de purifier une protéine entière qu'un petit peptide.

IV.4.2) Au niveau peptidique

L'immuno-enrichissement des peptides après la digestion enzymatique des protéines a été décrit par le groupe d'Anderson en 2004 sous le nom de SISCAPA (pour « Stable Isotope Standards and Capture by Anti-Peptide Antibodies »)¹⁰³. Dans cette étude préliminaire sur quatre peptides, l'enrichissement de chaque peptide est d'environ un facteur 100. Ceci leur permettrait d'atteindre une limite de quantification située aux alentours de 40 ng / mL (en partant du fait qu'ils détectent aisément 10 fmol de peptide à partir de 10 µL de plasma et en supposant que la protéine ait une masse de 40 kDa et que le peptide rapporteur ait une masse de 1 kDa).

Cette technique prometteuse a été employée dans le but d'atteindre des limites de quantification comparables à celles obtenues après immuno-enrichissement des protéines. Par exemple, en combinant la déplétion des six protéines majoritaires et en enrichissant un peptide de la fibuline 2, la limite de quantification est de 50 ng / mL pour cette protéine dans du plasma de souris¹⁰⁴.

Hoofnagle *et al.* ont obtenu une limite de quantification de 2,6 ng / mL pour la thyroglobuline dans le sérum humain. Ils ont comparé leurs résultats avec une mesure par ELISA et ont trouvé une bonne corrélation entre les deux approches ce qui montre que l'enrichissement peptidique est une technique utilisable en clinique⁹⁴. La même étude a été réalisée sur deux marqueurs de risque cardiovasculaire (la troponine I et l'interleukine 33). Les limites de quantification sont respectivement de 2,8 et 4,7 ng / mL ce qui ne permet toutefois pas de détecter l'interleukine 33 dans le plasma. Pour la troponine I, une bonne corrélation a été obtenue avec le dosage par ELISA¹⁰⁵. La troponine I est également mise en évidence dans la Figure 21 page 64.

Une purification supplémentaire a également été réalisée afin d'abaisser la limite de quantification à partir d'un faible volume de sérum. Ainsi, Ahn *et al.*¹⁰⁶ ont d'abord effectué une déplétion des vingt protéines majoritaires, enrichi les protéines glycosylées par une lectine, digéré les glycoprotéines enrichies, extrait spécifiquement un peptide protéotypique par la méthode SISCAPA et quantifié ce peptide. Ils ont ainsi obtenu une limite de quantification de 0,8 ng / mL pour la protéine TIMP1 à partir de seulement 1,7 µL de sérum.

De nombreux chemins ont également été explorés afin d'enrichir spécifiquement seulement un sub protéome (essentiellement les glycoprotéines ou les phosphoprotéines). Cependant, l'analyse de ces sub protéomes ne fait pas partie de ce travail de thèse et les méthodes mises en œuvre pour les extraire ne seront donc pas abordées.

Des optimisations ont ensuite été apportées afin d'augmenter le débit d'analyse grâce à l'automatisation de la procédure d'enrichissement. Cette optimisation a commencé par l'immobilisation des anticorps sur des billes magnétiques. Ces billes ont été appliquées avec succès à l'enrichissement d'un peptide du facteur alpha de nécrose tumorale (TNF α). La limite de quantification aux alentours de 1 ng / mL a ainsi pu être obtenue à partir de 1 mL de sérum après

déplétion des six protéines majoritaires⁸⁶. Après implantation d'un nouveau piège pour les billes magnétiques et après avoir simplifié le protocole grâce à un couplage en ligne entre la capture des peptides, leur élution et leur séparation chromatographique, le groupe d'Anderson a montré que cette approche permettait de concentrer le peptide d'intérêt d'un facteur 18 000 par rapport à l'albumine¹⁰⁷. Plus récemment, ils ont entièrement automatisé le processus et ont quantifié simultanément neuf protéines. Ils ont comparé les résultats obtenus avec et sans immuno-enrichissement et montré des gains de sensibilité pouvant atteindre un facteur de presque 10 000. La limite de quantification la plus basse reste autour du ng / mL (1,6 ng / mL pour l'ostéopontine) lors de l'extraction de 10 µL de plasma. Ils ont également évalué l'impact de l'augmentation du volume initial de plasma. L'extraction des peptides à partir de 1 mL de plasma a permis d'abaisser cette limite de quantification à 7,2 pg / mL¹⁰⁸. Cette limite extrêmement basse montre qu'il est possible d'avoir un dosage très sensible par LC-MS/MS. L'étude a été réalisée à partir de 1 mL de plasma mais aucune contre indication n'est précisée quant à l'utilisation de volumes plus importants qui permettraient d'abaisser encore les limites de quantification. Il faut cependant garder à l'esprit que de trop grands volumes d'échantillon ne sont pas forcément disponibles. En effet, travailler sur 1 mL de plasma humain commence à représenter un volume important mais il peut être envisageable d'augmenter ce volume. En revanche, si l'étude se fait chez la souris, d'autres stratégies devront être mises en œuvre pour augmenter la sensibilité du dosage.

Ces approches prometteuses sont cependant toutes soumises à la même condition : l'obtention d'un anticorps dirigé contre le peptide d'intérêt. Par exemple, dans l'étude citée ci-dessus, il aura fallu attendre six mois avant d'aboutir à neuf anticorps fonctionnels. De plus, l'étude visait au départ la quantification de quinze peptides. Cette étude n'a pas pu être possible car six anticorps n'ont pas pu être produits. Comme toute synthèse d'anticorps, l'injection du peptide antigène à l'animal devant générer les anticorps ne s'accompagne pas toujours d'une production d'anticorps de qualité.

Une approche similaire nommée immuno-MALDI a également été développée. Dans ce cas, l'échantillon est digéré, le peptide AQUA est ajouté et les peptides cibles sont extraits par des billes sur lesquelles sont fixés les anticorps dirigés contre le peptide cible. La différence intervient à ce niveau : contrairement à l'approche SISCAPA, il n'y a pas d'étape d'élution puisque les billes sont déposées directement sur la plaque MALDI. La libération des peptides se fait alors lors de l'impact du laser sur la cible¹⁰⁹.

Toutes les stratégies développées ci-dessus illustrent le fort potentiel de la spectrométrie de masse pour devenir une alternative crédible aux dosages immuno-enzymatiques en terme de limite de détection et sont résumées dans le tableau suivant :

Tableau 1 : Résumé des stratégies mises en place pour abaisser les limites de quantifications par LC-MS/MS.

Stratégie	Analyte cible	Protéine dosée	Matrice	LOQ	Référence
Analyse directe		L-selectine	Plasma	0,67 µg / mL	Anderson, Hunter (2006) ⁸¹
		Protéine C-réactive	Plasma	1,3 µg / mL	Williams <i>et al.</i> (2009) ⁸²
Exclusion stérique	Protéine	Thyroglobuline	Sérum	≈ µg / mL	Hoofnagle <i>et al.</i> (2008) ⁹⁴
Immuno-déplétion	Protéine	Adiponectine	Sérum	0,1 µg / mL	Lin <i>et al.</i> (2006) ⁸⁵
		Thyroglobuline	Plasma	5 ng / mL	Tu <i>et al.</i> (2010) ⁹⁰
		PSA	Plasma	25 ng / mL	Keshishian <i>et al.</i> (2007) ⁶⁸
Immuno-déplétion puis exclusion stérique	Protéine	Protéine C-réactive	Sérum	≈ µg / mL	Kuhn <i>et al.</i> (2004) ⁹³
Immuno-déplétion puis échange d'ion	Protéine puis peptide	PSA	Plasma	2,5 ng / mL	Keshishian <i>et al.</i> (2007) ⁶⁸
Immuno-enrichissement	Protéine	Anhydrase carbonique II	Sérum	14,6 ng / mL	Callipo <i>et al.</i> (2010) ⁹⁷
		Hormone parathyroïdienne	Sérum	14,5 pg / mL	Kumar <i>et al.</i> (2010) ⁹⁸
		ProGRP	Sérum	0,33 ng / mL	Winther <i>et al.</i> (2009) ¹⁰⁰
		Insuline	Plasma	50 pg / mL	Ho <i>et al.</i> (2008) ¹⁰²
	Peptide	Fibuline 2	Plasma	50 ng / mL	Whiteaker <i>et al.</i> (2007) ¹⁰⁴
		Thyroglobuline	Sérum	2,6 ng / mL	Hoofnagle <i>et al.</i> (2008) ⁹⁴
		Troponine I	Plasma	2,8 ng / mL	Kuhn <i>et al.</i> (2009) ¹⁰⁵
		Interleukine 33	Plasma	4,7 ng / mL	Kuhn <i>et al.</i>

Même si une partie du protéome n'est pas encore accessible par MS (notamment les protéines situées sous le pg / mL), on peut facilement imaginer qu'elle le sera dans les prochaines années. En effet, les progrès réalisés au cours de la dernière décennie ont permis de gagner un facteur 100 000 sur la limite de quantification pour passer du µg / mL à la dizaine de pg / mL.

De plus, les dosages par spectrométrie de masse possèdent un autre avantage qui a été sous-entendu précédemment par rapport aux dosages ELISA : il s'agit de l'analyse simultanée de plusieurs composés.

IV.5) Analyses multiplexées

La quantification simultanée de nombreux analytes peut être effectuée très aisément par spectrométrie de masse sans affecter la spécificité du dosage. En effet, pour bien définir un pic chromatographique et donc pour réaliser une quantification répétable, on estime qu'il faut entre vingt et trente points d'acquisition. Si on considère qu'un analyte est élué sur une durée de trente secondes, cela signifie qu'il faut acquérir un point chaque seconde. Sachant qu'il est recommandé de suivre au moins deux transitions SRM pour un peptide afin de limiter les risques d'erreur dans le dosage à cause d'une transition qui pourrait être interférée et que par conséquent, il faut également deux transitions SRM pour l'étalon, cela conduit à suivre quatre transitions SRM par peptide (soit une durée d'acquisition de 250 ms par transition). Cette durée d'acquisition peut être fortement abaissée sur les spectromètres de masse de dernière génération pour passer à moins de 10 ms. Le nombre de transitions SRM suivies peut donc très facilement être multiplié par 25, ce qui correspondrait dans ce cas à la quantification de vingt-quatre peptides supplémentaires lors de la même analyse. Un petit bémol doit cependant être émis lors de cette façon de procéder puisque si la durée d'acquisition de chaque transition SRM diminue, la sensibilité va également diminuer. Ceci peut donc être problématique lors de l'analyse de peptides faiblement concentrés. Pour pallier ce problème, des développements informatiques ont été apportés. En effet, la majorité du temps, le spectromètre de masse analyse des transitions SRM sur une plage de temps qui ne correspond pas au temps de rétention de l'analyte. Ce temps d'analyse est donc du temps gaspillé. Par conséquent, il est maintenant possible de suivre les transitions SRM correspondant à un peptide uniquement dans une fenêtre de temps qui correspond à sa zone d'élution. Ceci permet soit d'augmenter le nombre de transitions SRM pouvant être suivies lors d'une injection, soit d'augmenter le temps d'acquisition par transition afin d'augmenter le signal. Cette approche nécessite cependant de connaître le temps de rétention du peptide. Une première injection doit donc être réalisée afin de le déterminer. De plus, il faut également veiller à ce que ces temps de rétention soient répétables. Pour cela, il faut que tous les paramètres influençant la séparation chromatographique soient maîtrisés (solvant d'injection, conditionnement de la colonne, composition de la phase mobile, température au sein de la

colonne...). La grande majorité des études présentées dans les paragraphes précédents sont des analyses multiplexées de quelques protéines à plusieurs dizaines de protéines.

La spectrométrie de masse permet donc d'effectuer des dosages sensibles et multiplexés. Un autre critère important permettant de valider cette technique est la reproductibilité des résultats.

IV.6) Evaluation de la répétabilité et de la reproductibilité des dosages

Dans les études de quantification, un (ou plusieurs) échantillon est dosé généralement trois fois et le coefficient de variation sur les valeurs mesurées est donné. Ce coefficient est généralement inférieur à 20% ce qui témoigne d'une bonne répétabilité de la mesure au sein du laboratoire. Cependant, un paramètre clé à prendre en compte lorsqu'une méthode de dosage veut être appliquée en clinique est la possibilité de transférer aisément cette méthode sur une autre plateforme afin de vérifier que les résultats obtenus dans les deux laboratoires soient les mêmes. Ainsi, une étude sur huit laboratoires différents a été menée dans le but de quantifier sept protéines via dix peptides rapporteurs¹¹⁰. Cette étude a été réalisée en trois étapes. Dans chaque étape, neuf échantillons différents sont dosés par chaque laboratoire. D'abord, les peptides légers et marqués ont été ajoutés dans du plasma digéré. L'ensemble des manipulations (digestion du plasma et ajout des peptides) a été réalisé dans un seul laboratoire. Chaque échantillon a ensuite été analysé dans les huit laboratoires. Les coefficients de variations (CV) entre les laboratoires sont dans ce cas inférieurs à 15% ce qui montre que la quantification par LC-MS/MS est une approche reproductible. Dans une seconde étape, les protéines cibles ont été ajoutées dans le plasma qui a ensuite été digéré. Encore une fois, la digestion du plasma a été réalisée dans un seul laboratoire. Après analyse de ces échantillons par les huit laboratoires, le CV est augmenté par rapport à celui de la première étape. Il reste inférieur à 15% pour neuf peptides mais vaut 30% pour l'un des peptides. La différence entre les deux premières étapes est l'introduction d'un biais lié à la digestion enzymatique des protéines cibles ajoutées dans le plasma. Ces résultats montrent qu'il faut toujours évaluer cette étape qui est une source de variation dans le résultat final. Enfin, dans une dernière étape, les sept protéines ont été ajoutées dans le plasma par le même laboratoire puis les échantillons ont été répartis dans les laboratoires afin d'être préparés (dénaturation, alkylation, digestion, extraction). Ce cas présente toutes les variations qui peuvent être rencontrées lors de deux dosages indépendants du même échantillon. Les CV sont encore une fois supérieurs aux précédents et ne restent inférieurs à 20% que pour cinq peptides. Les CV les plus élevés ont été attribués à des problèmes survenus sur certains sites comme un pic interférent ou un spray instable. De plus, les CV présentés ici sont ceux qui correspondent à un point proche de la limite de quantification. Ces CV sont plus faibles pour des points plus concentrés. Ces résultats permettent donc de confirmer que la validation de candidats biomarqueurs dans le plasma peut se faire par spectrométrie de masse sans avoir besoin de perdre des mois de travail dans le développement d'anticorps.

Après avoir fait un tour d'horizon des principales stratégies mises en œuvre pour répondre à la complexité de la mise en place d'un dosage de protéine plasmatique via un peptide rapporteur par

LC-MS/MS ainsi que les avantages de cette approche par rapport à l'ELISA, nous allons voir quelques règles permettant rapidement de choisir un bon peptide candidat pour effectuer ces dosages.

V) Le choix des peptides protéotypiques

La quantification absolue de protéines par LC-MS/MS s'effectue sur un peptide protéotypique d'une protéine après digestion trypsique de cette dernière. Sachant que la trypsine clive les protéines de façon spécifique après une lysine ou une arginine¹¹¹, et que la fréquence de ces deux acides aminés dans les séquences protéiques est respectivement de 7,0 et 4,7%¹¹², la taille moyenne des peptides générés est de 8,5 acides aminés. Après digestion par la trypsine, une protéine peut donc générer plusieurs dizaines voire centaines de peptides selon sa taille. De plus, le choix des transitions SRM ajoute un niveau de complexité. En effet, chaque peptide peut exister sous différents états de charge (donc différentes masses possibles en Q1). Ensuite, de nombreux fragments sont possibles après collisions dans le q2. La recherche de l'ensemble des transitions SRM de ces peptides est réalisable mais pas forcément judicieuse. En effet, il existe quelques règles permettant d'affiner le choix afin de trouver les peptides ainsi que leurs transitions SRM qui donneront le meilleur signal. Pour cela, il faut d'abord bien comprendre les règles principales de fragmentation en CID.

V.1) La fragmentation des peptides

V.1.1) Nomenclature

Un peptide est une succession d'acides aminés liés entre eux par une liaison amide. Par défaut, la séquence d'un peptide est donnée de l'extrémité N-terminale (fonction amine libre) à l'extrémité C-terminale (fonction acide carboxylique libre). L'appellation du fragment détecté va varier selon le lieu de rupture au niveau de la liaison peptidique, la localisation de la charge et le nombre d'acides aminés restant comme le montre la Figure 24 :

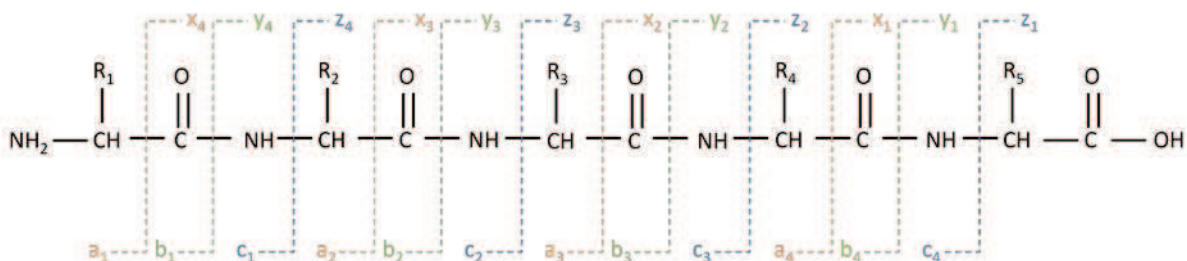


Figure 24 : Nomenclature de la fragmentation peptidique.

Cette nomenclature a été proposée en 1984 par Roepstorff et Fohlman¹¹³ puis modifiée par Biemann en 1988¹¹⁴. Si le fragment détecté contient l'extrémité N-terminale du peptide précurseur, on parlera d'ions des séries a, b ou c. En revanche, si le fragment détecté contient l'extrémité C-terminale du peptide précurseur, on parlera d'ions des séries x, y ou z. Le numéro associé correspond au nombre de résidus d'acide aminé que le fragment contient. Enfin, si la rupture a lieu avant, au milieu ou après le groupement amide, on aura respectivement les séries a (ou x), b (ou y), c (ou z).

En dissociation induite par collision à faible énergie, ce sont les séries b et y qui sont obtenues. Il est donc inutile de rechercher les fragments c ou z qui sont quant à eux obtenus en ETD (transfert d'électron dissociatif). Voyons à présent par quels mécanismes ces fragments b et y sont produits.

V.2) Le modèle du proton mobile

Les mécanismes de fragmentation des peptides ont beaucoup été étudiés par les groupes de Gaskell¹¹⁵, Boyd¹¹⁶ et Wysocki¹¹⁷ et un modèle a été proposé pour expliquer les fragments obtenus : c'est le modèle du proton mobile. Les protons vont préférentiellement se placer au niveau des sites les plus basiques dans le peptide à savoir les amines situées sur les chaînes latérales (de l'arginine et de la lysine) puis l'amine située en position N-terminale et enfin sur les liaisons peptidiques. Lors des collisions avec le gaz dans le q2, l'énergie interne de l'ion augmente. Par conséquent, les sites de protonation énergiquement moins favorisés deviennent plus peuplés : un proton situé sur l'extrémité N-terminale va se délocaliser au niveau d'une liaison peptidique.

La protonation peut se produire au niveau de l'azote ou de l'oxygène de la liaison amide. La protonation de l'oxygène est énergiquement favorisée par rapport à celle de l'azote mais il est peu probable qu'elle provoque une fragmentation à faible énergie.

Deux exemples de mécanismes de fragmentation impliquant l'azote ou l'oxygène sont décrits dans la Figure 25 :

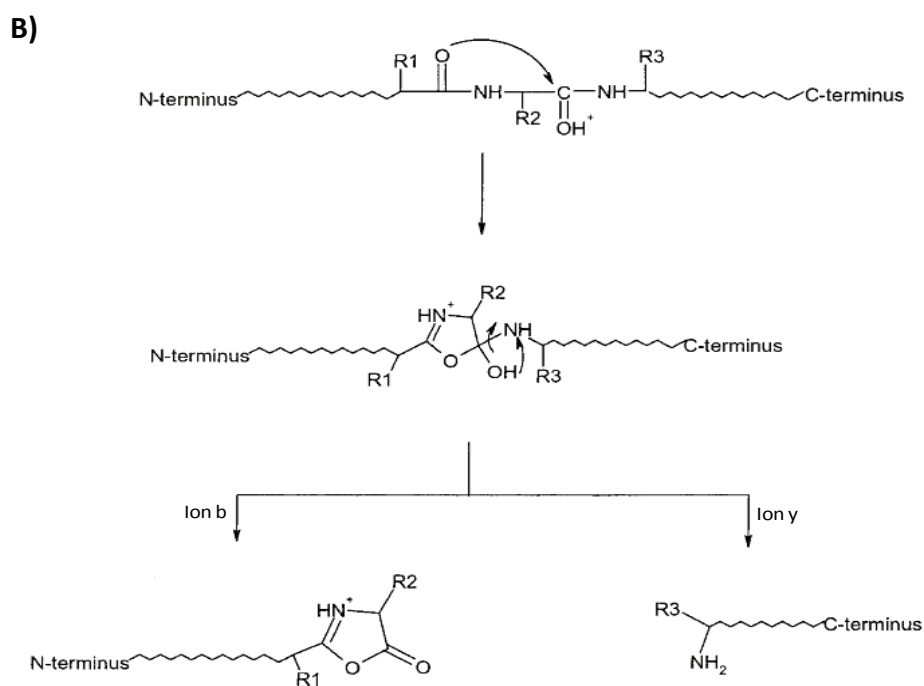
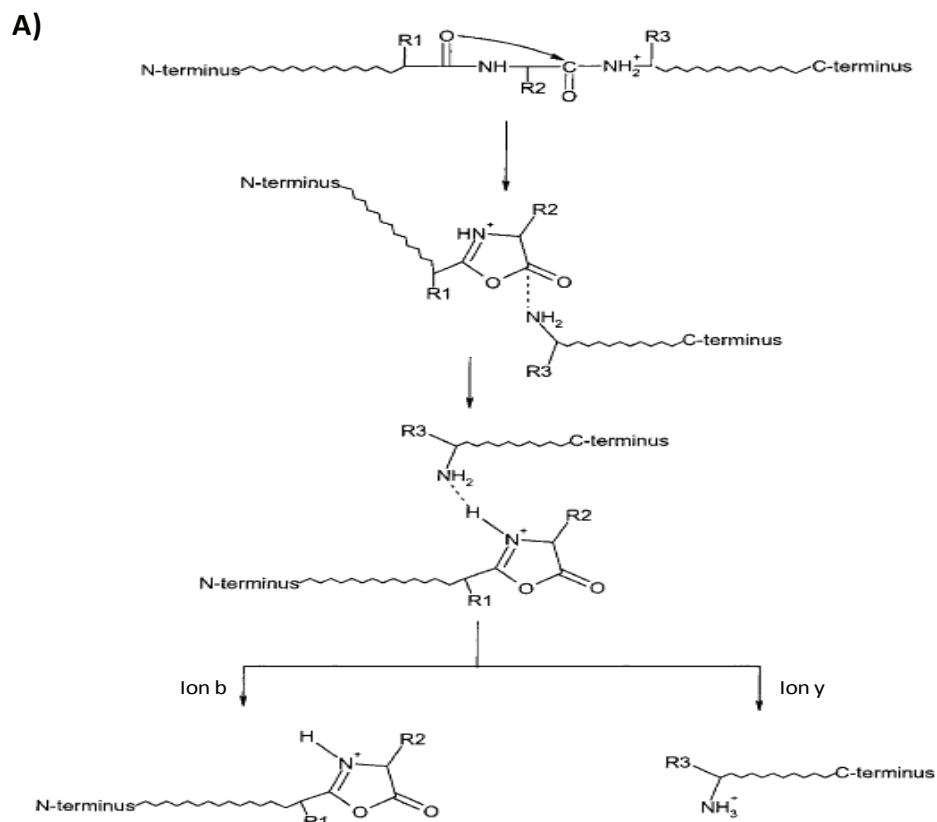


Figure 25 : Mécanisme de fragmentation d'un peptide impliquant l'azote (A) ou l'oxygène (B) de la liaison peptidique (d'après Paizs et Suhai¹¹⁸).

Dans ces deux mécanismes, l'oxygène de la liaison amide se situant sur le résidu précédent est impliqué : la première étape consiste en une attaque nucléophile de cet oxygène sur le carbone de la liaison amide sur laquelle s'est ajouté le proton mobile. Après dissociation de l'espèce intermédiaire, il en résulte d'une part un dérivé d'oxazolone (qui est un ion b) et d'autre part, un peptide ayant la même structure que le peptide de départ (et qui est un ion y).

Ces mécanismes montrent que le plus petit ion de la série b qui puisse être observé est l'ion b_2 puisque sa formation implique la liaison amide située en amont (cette liaison est inexistante avec un ion de type b_1).

Lors d'une digestion de protéines par de la trypsine, des peptides contenant une lysine ou une arginine en position C-terminale sont générés. Ces deux acides aminés sont les plus basiques. Ainsi, lors de l'ionisation du peptide, un proton ira préférentiellement sur l'un de ces résidus. Plus la taille du peptide augmente, plus la probabilité de protoner un autre site va augmenter. Ainsi, il y aura une distribution entre différents états de charge. Cette distribution est d'autant plus grande que la masse du peptide est importante. Sur un peptide monochargé, le proton supplémentaire va être séquestré en position C-terminale. La fragmentation du peptide demandera alors une plus forte énergie et le rendement de fragmentation sera plus faible. En revanche, sur un peptide dichargé, un proton va rester en position C-terminale et le second va se placer au niveau des liaisons peptidiques afin de permettre la fragmentation du peptide selon les mécanismes présentés précédemment. Puisque lors de la fragmentation, le proton mobile reste sur la partie N-terminale et que l'autre proton est séquestré en position C-terminale, des ions monochargés de type b et y sont générés. Cependant, les ions b sont instables et se refragmentent avant d'arriver au détecteur. Ainsi, les ions les plus lourds de la série b sont rarement observés. Si l'affinité protonique du fragment C-terminal est supérieure à celle du fragment N-terminal, un proton peut être transféré de l'ion b vers l'ion y ce qui va générer un fragment N-terminal neutre et un fragment y doublement chargé. Lors de la quantification d'une protéine via un peptide rapporteur, un ion parent doublement chargé est donc généralement utilisé et c'est un fragment de la série y qui est observé.

V.3) Les critères de choix

Comme nous venons de le voir, une protéine digérée peut générer plusieurs dizaines de peptides¹¹⁹ d'une taille allant de l'acide aminé simple à quelques dizaines de résidus avec une moyenne de 8,5 acides aminés. Une approche pour le choix des peptides consiste à consulter certaines ressources informatiques comme les bases de données PeptideAtlas¹²⁰, Global Proteome Machine (GPM)¹²¹ ou PRIDE¹²². Ces bases de données recensent les peptides déjà vus par spectrométrie de masse par d'autres équipes. Une autre base de données plus spécialement dédiée à la SRM a été développée : il s'agit de SRMATlas¹²³. En plus des peptides observés sont données directement les meilleures transitions SRM obtenues sur un API 4000 QTRAP d'AB Sciex.

Pour les protéines qui n'ont pas encore été détectées par LC-MS/MS, différents groupes ont développé des outils afin de prédire quels peptides seront les plus facilement ionisés à partir des propriétés physico-chimiques des acides aminés constituant chaque peptide tryptique¹²⁴⁻¹²⁶. Ces

outils donnent un bon point de départ pour limiter le nombre de peptides à étudier mais il ne faut pas se limiter aux deux ou trois meilleures prédictions sous peine de manquer le peptide le plus sensible.

Sinon, quelques règles simples permettent également de cibler quelques peptides qui seront de bons candidats. Un premier choix va s'effectuer sur la taille du peptide rapporteur. En effet, un peptide trop petit (inférieur à 5 acides aminés) risque de ne pas être suffisamment spécifique de la protéine ciblée et on risque d'avoir beaucoup d'interférents sur la transition SRM sélectionnée. De même, un peptide trop gros (supérieur à 20 ou 25 acides aminés) s'ionisera moins facilement et sera ionisé sous différents états de charges. De ce fait, la sensibilité du dosage sera diminuée. Ensuite, il ne faut pas prendre des peptides contenant des clivages manqués par la trypsine (peptides de type $KX_1X_2X_3$ ou $X_1X_2X_3RX_4X_5X_6$). Une exception existe cependant dans le cas du peptide $X_1X_2X_3RX_4X_5X_6$ lorsque le résidu X_4 est une proline. En effet, dans ce cas, la trypsine n'hydrolyse jamais la liaison peptidique. Il faut également éviter de choisir un peptide pour lequel l'acide aminé suivant l'extrémité C-terminale est une lysine ou une arginine car la succession de deux sites de clivages augmente le risque de rater une hydrolyse. Dans ce cas, une digestion peut se produire mais surtout, cette digestion risque de ne pas être répétable.

Le tri suivant va se faire en fonction de la séquence peptidique en elle-même. En effet, il faut éviter les acides aminés qui peuvent être modifiés chimiquement. Les acides aminés se trouvant dans ce cas sont les cystéines car l'une des étapes lors de la préparation d'échantillons consiste à les alkyliser. Eviter de choisir un peptide contenant une cystéine permet donc de s'affranchir de la question éventuelle du rendement d'alkylation. De plus, le peptide étalon étant généralement ajouté après la digestion, il doit être alkylé séparément.

D'autres acides aminés sont propices à des modifications chimiques et plus particulièrement aux oxydations. Par exemple, les méthionines peuvent incorporer un atome d'oxygène au niveau du soufre afin de donner une méthionine sulfoxyde. Les tryptophanes peuvent également être oxydés et sont donc à proscrire¹²⁷.

Comme nous l'avons vu au paragraphe III.2.3.4) page 67, il faut également éviter les peptides sur lesquels des modifications post traductionnelles peuvent se produire. Il faut donc être vigilant lorsque le peptide contient une sérine, une thréonine et une tyrosine car ces trois résidus peuvent être phosphorylés. De même, la sérine et la thréonine peuvent être glycosylées. Enfin, lorsqu'un enchaînement d'acides aminés du type NXS ou NXT est rencontré, la probabilité d'avoir une glycosylation sur l'asparagine est élevée (sauf si l'acide aminé X est une proline). Lorsque ces acides aminés sont rencontrés, il faut donc être vigilant aux informations décrites dans les bases de données (si elles existent).

Les peptides dont l'extrémité N-terminale est une glutamine ne doivent pas être sélectionnés. En effet, en milieu acide, la chaîne latérale peut se cycliser pour former un pyroglutamate par perte de NH_3 ¹²⁸.

Enfin, les peptides contenant une glutamine ou une asparagine doivent être évités car ces résidus peuvent se convertir en glutamate et aspartate respectivement. Le taux de conversion dépend des

acides aminés environnants. Ainsi, une asparagine suivie d'une glycine¹²⁹ ou d'une proline¹³⁰ est propice à cette modification.

Pour le choix des transitions SRM, l'ion précurseur doit être multichargé. En effet, si un ion mono chargé est sélectionné, la charge va être séquestrée par l'acide aminé en C-terminal puisqu'il s'agit d'une lysine ou d'une arginine qui sont les acides aminés les plus basiques. La fragmentation d'un tel peptide va alors être difficile. Si l'ion parent est doublement chargé, l'une des deux charges est séquestrée en position C-terminale mais l'autre est disponible pour se déplacer le long de la chaîne latérale et induire la fragmentation du peptide. Un ion de type y sera alors observé (grâce à la charge présente sur la lysine ou l'arginine) alors que l'ion b correspondant n'est pas forcément observé car les ions b sont peu stables et se refragmentent jusqu'à l'obtention de l'ion b₂. Il est donc préférable de choisir un ion précurseur multichargé en Q1 et un ion fragment de type y en Q3.

Le choix du meilleur fragment peut ensuite être aiguillé par la présence de proline ou d'histidine proche de l'extrémité N-terminale du peptide. La proline est le seul acide aminé pour lequel l'extrémité N-terminale n'est pas une amine primaire mais une amine secondaire. Ainsi, la liaison amide située à l'extrémité N-terminale de la proline est plus basique que les autres¹³¹. Ceci va augmenter l'affinité du proton mobile avec cette liaison et engendrer un site de fragmentation privilégié. Ainsi, l'ion y situé en position N-terminale de la proline sera très certainement le plus intense. Cependant, la probabilité de rupture de cette liaison peptidique dépend de la nature de l'acide aminé précédent la proline¹³². Quant à l'histidine, l'augmentation de la probabilité de fragmentation en position C-terminale de ce résidu est liée à la basicité de la chaîne latérale de l'histidine. Cette chaîne latérale est facilement protonée et la proximité du site de protonation et de l'oxygène de la liaison peptidique suivante fait que le déplacement du proton vers cet oxygène est facilité¹³³.

**CHAPITRE II : DOSAGE DE LA VITELLOGENINE CHEZ
*GAMMARUS FOSSARUM***

I) Introduction

Les biomarqueurs environnementaux sont des outils permettant d'établir un diagnostic de risque environnemental. Ce travail s'intéresse plus particulièrement à un biomarqueur de perturbation endocrinienne : la vitellogénine. En 1999, l'Union Européenne a défini un perturbateur endocrinien comme étant «une substance ou un mélange exogène altérant les fonctions du système endocrinien et induisant donc des effets nocifs sur la santé d'un organisme intact, de ses descendants ou sous-populations».

Selon Soto *et al.*¹³⁴, un perturbateur endocrinien peut :

- imiter les hormones endogènes telles que les estrogènes et les androgènes,
- empêcher et altérer la liaison des hormones à leurs récepteurs,
- altérer la production des hormones naturelles,
- modifier la quantité des récepteurs hormonaux.

Les perturbateurs endocriniens incluent les estrogènes naturels (estradiol), les estrogènes synthétiques (ethinylestradiol et mestranol qui sont utilisés dans les traitements contraceptifs¹³⁵⁻¹³⁶), des produits de dégradation de surfactants comme les alkylphénols (nonylphénol, octylphénol...¹³⁶), des pesticides (dichlorodiphényltrichloroéthane (DDT)...), des PCB (polychlorobiphényles), des métaux lourds (mercure, cadmium)¹³⁷, des plastifiants (phtalates¹³⁸).

Parmi les biomarqueurs de perturbation endocrinienne, une protéine a été plus particulièrement étudiée. Il s'agit de la vitellogénine (Vtg). La Vtg est une lipoprotéine de 300 à 600 kDa selon l'espèce, glycosylée, phosphorylée et qui se lie avec le calcium et le zinc¹³⁹⁻¹⁴⁰. Chez la plupart des ovipares, la Vtg est une protéine précurseur des protéines du jaune d'œuf (les vitellines). Ces protéines jouent un rôle primordial dans la reproduction de l'espèce puisqu'elles vont servir de réserve énergétique lors du développement embryonnaire. Chez les mâles, le gène de la Vtg est présent mais est normalement silencieux (*i.e.* il n'est pas exprimé). La Vtg est synthétisée dans le foie puis est excrétée dans le sang. Des pics de concentration pouvant atteindre 20 mg / mL ont été observés dans du plasma de poisson¹⁴¹⁻¹⁴². La Vtg migre ensuite dans les ovocytes où elle sera stockée¹⁴³. Lorsqu'elle est présente chez les mâles, la Vtg reste dans le sang jusqu'à sa dégradation par des protéases ou son élimination vers le milieu extérieur.

La synthèse de la vitellogénine est contrôlée par des récepteurs aux estrogènes : quand des agonistes de ces récepteurs comme l'estradiol se lient, la Vtg est synthétisée. En revanche, lorsque des antagonistes comme le pentachlorophenol qui est un fongicide se lient, la synthèse est inhibée même en présence d'estradiol¹⁴⁴.

De nombreuses études ont été réalisées en laboratoire et sur le terrain afin de vérifier si différents composés permettent de moduler l'expression de la Vtg chez le poisson¹⁴⁵⁻¹⁵⁹. Par exemple, sous l'action de pesticides (comme le DDT), de plastifiants (par exemple le bisphénol A) ou de produits de dégradation de surfactants (octylphénol, nonylphénol) la Vtg a été synthétisée à partir d'hépatocytes provenant de truites arc-en-ciel mâles¹⁶⁰.

En revanche, très peu d'études ont été menées sur les invertébrés en dépit de leur importance dans les écosystèmes. En effet, ils représentent 95% des espèces vivantes. De plus, les composés ayant un

effet sur les poissons n'en ont pas forcément sur les invertébrés puisque les systèmes de régulations sont peu connus chez les invertébrés et diffèrent parfois de ceux présents chez les poissons¹⁶¹. Cependant, de nombreux perturbateurs endocriniens connus chez le poisson le sont également chez les invertébrés. Certains perturbateurs chez les invertébrés ont été listés par Depledge *et al.* en 1999¹⁶² et sont répartis en plusieurs catégories :

- herbicides : dibromure de diquat, atrazine, Simazine, Diuron
- métaux : cadmium, selenium, zinc, mercure, plomb
- dérivés de tributylétain
- les polychlorobiphényles (PCB)
- les alkylphénols : nonylphénol, pentyphénol
- hormones naturelles ou synthétiques : *diéthylstilbestrol*, *testostérone*
- *insecticides* : Pyriproxyfen, DDT (dichlorodiphényltrichloroéthane)...
- mélanges : effluents de tannerie, de moulins à papier ou d'eaux usées, dérivés de pétrole brut.

Une perturbation endocrinienne a été mise en évidence chez la puce d'eau (*Daphnia magna*) exposée au nonylphénol¹⁶³⁻¹⁶⁴ ou à des PCB¹⁶⁵. Chez un escargot d'eau douce, sous l'effet de bisphénol A et d'octylphénol, des femelles ont été transformées en « superfemelles », c'est-à-dire en des femelles présentant des organes féminins supplémentaires (comme par exemple un second vagin)¹⁶⁶.

Plusieurs méthodes ont été développées afin de quantifier la vitellogénine. Certaines sont indirectes d'autres sont directes. Parmi les méthodes indirectes chez les vertébrés, on trouve la mesure du taux de calcium plasmatique. En effet, puisque la Vtg est une protéine se liant avec le calcium, une variation du taux de calcium peut être corrélée à une variation de l'expression de la Vtg^{149, 155, 159}. Chez les invertébrés, il existe également la méthode ALP (Alkali Labile Phosphate)¹⁶⁷. Dans cette méthode, les phospholipoprotéines sont d'abord extraites par du méthyl-t-butyl ether. L'extrait est ensuite mis en présence de soude à une mol par litre ce qui va hydrolyser les liaisons entre les protéines et les groupements phosphates¹⁶⁸. Les phosphates ainsi libérés sont dosés par UV selon la méthode décrite par Stanton en 1968¹⁶⁹. Ils sont mis en présence de molybdate d'ammonium en milieu acide. Un complexe bleu est alors formé et l'absorbance est mesurée à environ 700 nm. Cependant, ces méthodes indirectes de dosage ne sont pas spécifiques de la protéine ciblée. Les concentrations de Vtg ainsi déterminées peuvent donc être biaisées par toutes les autres sources de calcium dans le premier cas ou de phosphate dans le second.

Les méthodes directes chez les vertébrés sont pour la plupart réalisées par ELISA à partir d'anticorps produits au sein du laboratoire qui réalise le dosage^{141-142, 148, 150, 152, 154, 156-157, 170-179} ou commerciaux^{153, 180}. Chez les invertébrés, différents anticorps pour un homard (*Homarus americanus*¹⁸¹), une écrevisse (*Cherax quadricarinatus*)¹⁸², des crabes (*Callinectes sapidus*¹⁸³, *Eriocheir sinensis*¹⁸⁴) ou des crevettes (*Neomysis integer*¹⁸⁵, *Penaeus monodon*¹⁸⁶, *Sicyonia ingentis*¹⁸⁷, *Fenneropenaeus indicus*¹⁸⁸) ont également été développés. L'inconvénient des dosages par ELISA est la nécessité de la présence d'un (ou plusieurs) anticorps spécifique(s) de la Vtg dont le développement nécessite plusieurs mois.

Une quantification à partir de l'ARN messager (ARNm) est également courante. Il existe différentes techniques de quantification de l'ARNm. D'abord, le Northern blot : son principe est le même que

celui du Western blot. Il consiste en une séparation électrophorétique sur gel de l'ARNm en fonction de sa taille puis d'un transfert de l'ARNm sur une membrane. Pour être révélé de manière spécifique, la membrane est mise en présence d'un brin d'ADN radioactif dont la séquence est complémentaire à celle de l'ARNm ciblé. La révélation se fait alors par autoradiographie^{158, 189}. Ensuite, une approche très similaire peut être utilisée : il s'agit du dot blot (ou slot blot). Dans ce cas, tous les ARNm sont directement fixés sur une membrane sans séparation électrophorétique préalable. La détection spécifique peut ensuite se faire de la même façon que dans le Northern blot¹⁴⁴⁻¹⁴⁶. La détection peut également être réalisée par la technique de protection contre les ribonucléases : la première étape consiste en une hybridation de l'ARNm avec un brin d'ADN complémentaire greffé avec de la digoxigénine. Après hybridation, des ribonucléases sont ajoutées. Ces enzymes digèrent les acides nucléiques simple brin (les ARN non hybridés et l'ADN complémentaire ajouté en excès). Après lavage de la membrane, la digoxigénine restante est dosée par un anticorps couplé à une enzyme qui va générer des photons après mise en présence d'un substrat¹⁹⁰⁻¹⁹¹. Une autre technique de détection après dot blot est la protection par hybridation : dans ce cas, la sonde spécifique de l'ARNm est un ester d'acridinium. La forme liée à l'ARNm va subir une réaction chimiluminescente alors que la forme libre sera hydrolysée en un réactif non chimiluminescent¹⁵⁶.

L'ARNm peut également être quantifié par RT-PCR (de l'anglais « Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction ») : les brins d'ARNm sont incubés en présence d'une enzyme (une transcriptase inverse), de nucléotides et d'une amorce afin de synthétiser un brin d'ADN complémentaire (ADNc). Après la synthèse du brin d'ADNc, ce dernier va être amplifié par PCR. Après amplification, la détection peut ensuite se faire par ajout d'une sonde qui va fluorescer lors de sa fixation sur l'ADN¹⁹² ou par séparation électrophorétique sur gel d'agarose suivie d'une coloration au bromure d'éthidium qui fluoresce après exposition à un rayonnement ultra-violet¹⁹³⁻¹⁹⁶. L'étape critique dans cette méthode est donc de trouver une amorce spécifique du brin d'ARNm de la Vtg qui permettra la synthèse du brin d'ADNc. Chez les invertébrés tels que la moule (*Mytilus edulis*), une quantification de l'ARNm par RT-PCR a également été proposée¹⁹⁷.

Enfin, chez le poisson, quelques groupes ont réalisé le dosage de la Vtg par LC-MS/MS après digestion enzymatique par de la trypsine. En 2006, après avoir utilisé les bases de données disponibles, Cohen *et al.*¹⁹⁸ ont ainsi quantifié la Vtg à partir du même peptide rapporteur chez le saumon d'atlantique et chez la truite arc-en-ciel. La quantification absolue a été permise par l'ajout du peptide rapporteur deutéré. Ils ont mis en évidence une induction de l'expression de la Vtg chez les truites juvéniles après injections de β -estradiol. En 2009, ils ont quantifié la Vtg chez le flétan du Groenland pour lequel la séquence de la vitellogénine n'était pas disponible¹⁹⁹. Ils ont alors réalisé une séparation électrophorétique sur gel de polyacrylamide et ont séquencé deux bandes à 172 et 185 kDa présentes chez les femelles et absentes chez les mâles. Après digestion enzymatique, le séquençage a été réalisé par MS/MS. Par comparaison avec les séquences disponibles chez le flétan d'atlantique et le flet Barfin, ils ont sélectionné un peptide protéotypique et ont quantifié la Vtg dans le sérum après ajout du peptide sélectionné marqué à l'azote 15 et au carbone 13. En 2004, le groupe de Zhang a quantifié la Vtg chez le viron à grosse tête (*Pimephales promelas*) via un peptide rapporteur et les résultats ont été corrélés avec un dosage par ELISA. Ils ont obtenu un coefficient de détermination de 0,9099 et ont expliqué l'écart obtenu par un anticorps non spécifique de la Vtg chez *Pimephales promelas*. En effet, l'anticorps utilisé a été obtenu à partir de la séquence de Vtg de la carpe²⁰⁰. Comme nous venons de le voir, la spectrométrie de masse permet donc de quantifier la

Vtg. Cette technique devient même une alternative crédible aux dosages de type ELISA surtout lorsque l'anticorps dirigé contre la protéine d'intérêt n'est pas disponible.

La Vtg a donc été quantifiée par LC-MS/MS dans différents groupes chez les vertébrés et bien que la Vtg soit acceptée comme étant un biomarqueur de perturbation endocrinienne, aucune quantification absolue de la Vtg n'a été réalisée par LC-MS/MS chez les invertébrés. Ce manque est partiellement lié aux faibles connaissances des invertébrés par rapport aux vertébrés. Ces lacunes concernent notamment le séquençage des organismes. En effet, sans séquence, un dosage par SRM est difficile à envisager. L'objectif de cette étude est donc de mettre au point une méthode de quantification absolue de la Vtg par LC-MS/MS chez un invertébré (*Gammarus fossarum*) grâce à une séquence partielle de cette protéine obtenue par PCR. Ces résultats ont fait l'objet d'une publication en 2010 dans la revue « Journal of Chromatography A » (Volume 1217, Issue 31, Pages 5109-5115). Cette méthode a ensuite pu être appliquée afin de caractériser la Vtg chez *Gammarus fossarum* puis de déterminer si la Vtg peut être considérée comme étant un biomarqueur de perturbation endocrinienne chez cet invertébré.

II) Matériel et méthodes

II.1) Réactifs

L'acétonitrile, le méthanol et l'eau (qualité LC-MS) proviennent de Fisher Scientific (Strasbourg, France). Le dithiothéitol (DTT), l'iodoacétamide (IAM), l'acide formique (FA) (qualité LC-MS), la trypsine (type IX-S de pancréas porcin) et l'urée viennent de Sigma-Aldrich (St Quentin-Fallavier, France). Deux peptides marqués ont été utilisés. Le premier, de séquence ILIPGV*GK a été acheté chez Millegen (Labège, France). Ce peptide comporte un marquage isotopique stable sur la valine : cinq atomes de Carbone 13 et un atome d'Azote 15. Le second, de séquence VIGSVNSSPDR* ($^{13}\text{C}_6\text{ }^{15}\text{N}_4$) a été généreusement synthétisé par bioMérieux (Marcy l'Etoile, France). Le peptide non marqué, de séquence ILIPGVGK a été acheté chez Millegen (Labège, France). Les cartouches d'extraction sur phase solide de type Oasis® HLB 3 cc (60 mg) proviennent de Waters (Milford, MA, USA). L'hydroxyde d'ammonium (solution à 25%) vient de Chimie plus (Denise, France).

II.2) Préparation des échantillons

II.2.1) Broyage et délipidation

Les organismes (masse $\approx$ 15 mg) ont d'abord été broyés et homogénéisés dans 1 mL de tampon Tris glacé (contenant 50 mM de Tris, 100 mM de NaCl et 0,01 mM d'acide éthylène diamine tétraacétique (EDTA)) ajusté à pH 7,8 et contenant 10 μg d'inhibiteurs d'enzymes (leupeptine et aprotinine) avec un Ultra-Turrax® T25 basic à 24 000 rpm pendant 35 secondes. Les homogénats ont ensuite été

centrifugés à 10 000 g pendant 15 minutes à 4°C. 250 µL de surnageant ont ensuite été délipidés par l'ajout de 750 µL d'un mélange éthanol / diéthyléther (1/1, v/v). Le mélange a été homogénéisé puis remis 10 minutes dans la glace. Ensuite, les échantillons ont été centrifugés à 10 000 g pendant 10 minutes à 4°C. Le surnageant a alors été éliminé pendant que le culot a été repris dans 250 µL de tampon Tris.

II.2.2) Digestion

3 mL de bicarbonate d'ammonium à 50 mM ont été additionnés aux 250 µL de culot repris dans le tampon Tris puis du DTT a été ajouté pour atteindre une concentration en solution de 15 mM. Les échantillons ont alors été incubés au bain marie à 60°C pendant 40 minutes. Après retour à température ambiante, l'IAM a été ajouté à une concentration finale de 15 mM. Les échantillons restent ensuite à température ambiante et à l'obscurité pendant 40 minutes. Après addition de 300 µg de trypsine, les échantillons sont incubés à 37°C pendant 24 heures. Ensuite, 20 µL d'acide formique sont ajoutés afin de bloquer la réaction de digestion. Enfin, 10 µL de chaque étalon interne (ILIPGV*GK et VIGVNSSPDR*) sont mis dans un tube en verre avec 180 µL de digest avant l'analyse par LC-MS/MS.

II.3) Analyse LC-MS/MS

L'analyse a été réalisée sur un système chromatographique HP 1290 series (Agilent Technologies, Waldbronn, Germany) constitué d'un passeur d'échantillons et d'une pompe binaire. 20 µL d'échantillon sont injectés et séparés sur une colonne Symmetry C₁₈ de dimensions 2,1 x 100 mm, avec des tailles de particules de 3,5 µm provenant de Waters (Milford, MA, USA). Si rien n'est précisé, l'élution est réalisée à un débit de 300 µL / min selon le gradient suivant : de 5 à 13% de solvant B (ACN + 0,1% FA) en 20 minutes suivi d'un lavage de la colonne à 95% de B pendant 5 minutes. Enfin, la colonne est rééquilibrée par 95% de solvant A (H₂O + 0,1% FA) pendant 5 minutes. L'éluat est détecté par un spectromètre de masse hybride (triple quadripôle / piège à ions linéaire) : le 5500 QTRAP® (AB Sciex, Foster City, CA, USA) équipé d'une source Turbo V™. L'ensemble (le contrôle de la LC-MS/MS, l'acquisition des données ainsi que leur retraitement) est réalisé via le logiciel Analyst 1.5.1. Le spectromètre de masse a été calibré par du polypropylène glycol, de la réserpine et de l'« Agilent Tuning Mix » (provenant tous les trois d'AB Sciex, Foster City, CA, USA) selon les instructions du constructeur. La résolution en Q1 et en Q3, mesurée par la largeur des pics à mi-hauteur a été ajustée à 0,7 ± 0,1 a.m.u (unité de masse atomique). Cette valeur est considérée comme étant la résolution unitaire. Le mode positif a été retenu pour l'ionisation sous une tension de spray d'ions de 5500V. Les pressions de gaz rideau et de nébulisation sont de 40 psi. Dans les deux cas, le gaz utilisé est de l'azote. La source est chauffée à 450°C, la pression du gaz auxiliaire (azote également) est de 40 psi et celle du gaz de collision est fixée à 9 psi.

II.4) Préparation des standards et des contrôles de qualité

Les gammes contenant les peptides ILIPGVGK et ILIPGV*GK sont préparées par ajout de 10 µL d'une solution étalon de chaque peptide à 180 µL de digest de mâle (ou à 180 µL de tampon Tris ayant servi à la reprise du culot après délipidation). Ainsi, la concentration de chaque peptide est respectivement de 0,00278 ; 0,0139 ; 0,0278 ; 0,278 ; 2,78 et 27,8 ng / mL de solution de mâle digéré. Les contrôles qualités quant à eux sont préparés de façon à obtenir une concentration finale en peptide de 0,139 et 13,9 ng / mL.

Les gammes contenant les peptides VIGSVNSSPDR* et ILIPGV*GK sont préparées par ajout de 10 µL d'une solution étalon de chaque peptide à 180 µL de digest (de mâle ou de femelle) ou à 180 µL de tampon Tris ayant servi à la reprise du culot après délipidation. Ainsi, la concentration en peptide ILIPGV*GK est de 0,00278 ; 0,0139 ; 0,0278 ; 0,278 ; 2,78 et 27,8 ng / mL de solution de mâle (ou de femelle) digérée. Les contrôles qualités quant à eux sont préparés de façon à obtenir une concentration finale en peptide de 0,139 et 13,9 ng / mL. En revanche, la concentration initiale du peptide VIGSVNSSPDR* étant inconnue, une solution mère a été diluée par 1 ; 2 ; 10 ; 20 ; 200 et 1000 pour la gamme. Les contrôles qualités ont été préparés en diluant la solution mère de peptide par 5 ou par 100.

II.5) Extraction en phase solide

II.5.1) Mise au point du protocole d'extraction

Une solution de peptide de séquence ILIPGVGK à 167 ng / mL a été préparée dans de l'eau acidifiée par 0,5% d'acide formique. Pour l'extraction en milieu basique, 10 cartouches SPE (de type Oasis® HLB 3 cc (60 mg)) ont été conditionnées par 1 mL de méthanol puis 1 mL d'eau contenant 0,5% d'acide formique. 3 mL de la solution à 167 ng / mL ont été déposés (soit 500 ng de peptide) puis la première cartouche a été éluée par 1 mL de mélange H₂O / MeOH (90 / 10, v / v) contenant 0,5% NH₄OH. La deuxième cartouche a été éluée par 1 mL du même mélange mais dans les proportions 80 / 20 (v / v) et ainsi de suite jusqu'à la dixième cartouche éluée par 100% de méthanol contenant 0,5% d'hydroxyde d'ammonium. Si le rendement d'extraction est total, chaque éluat de 1 mL doit contenir 500 ng de peptide. L'éluat de chaque cartouche a ensuite été dilué par 10 dans de l'eau contenant 0,5% FA afin de diminuer la teneur en MeOH des dernières fractions. Ceci va permettre d'analyser directement chaque fraction diluée par LC-MS/MS. La concentration maximale en peptide en alors de 50 ng / mL.

Pour l'extraction en milieu acide, quasiment la même procédure a été utilisée : conditionnement de 10 cartouches par 1 mL de méthanol puis 1 mL d'eau contenant 0,5% d'acide formique. Ensuite, 3 mL de peptide à 167 ng / mL ont été déposés sur chaque cartouche. La différence intervient lors de l'élution. En effet, dans ce cas, elle est réalisée par un mélange H₂O + 0,5% FA / MeOH + 0,5% FA allant de 90 / 10 (v / v) pour la première cartouche, à 80 / 20 (v / v) pour la deuxième et ainsi de suite jusqu'à 0 / 100 (v / v) pour la dixième. Chaque éluat a également été dilué par dix afin d'obtenir une

concentration maximale en peptide de 50 ng / mL. Afin de déterminer le rendement d'extraction, une solution de peptide a été préparée à 50 ng / mL dans de l'eau acidifiée par dilution de la solution à 167 ng / mL qui a été utilisée lors du dépôt.

II.5.2) Protocole utilisé lors des dosages

Pour la suite, si rien n'est précisé, l'extraction est réalisée sur une cartouche Oasis HLB 3 cc (60 mg) selon le protocole suivant : conditionnement de la cartouche par 1 mL de méthanol puis 1 mL d'eau contenant 0,5% d'acide formique, dépôt de 3 mL d'échantillon, lavage par 1 mL de mélange eau / méthanol (95 / 5, v / v) contenant 0,5% d'acide formique et élution par 1 mL de méthanol contenant 0,5% d'acide formique. Ensuite, 100 µL d'eau contenant 0,5 % d'acide formique sont ajoutés à l'éluat et l'échantillon est évaporé jusqu'à l'obtention d'un volume final inférieur à 100 µL. Enfin, l'échantillon est complété à 100 µL par ajout d'eau acidifiée.

III) Résultats et discussion

Dans l'approche dite « bottom-up » en analyse protéomique, les protéines présentes dans l'échantillon subissent une digestion enzymatique (généralement par ajout de trypsine). Les peptides ainsi générés sont séparés par chromatographie liquide puis analysés par spectrométrie de masse. Une protéine est donc dosée via un peptide rapporteur issu d'une digestion enzymatique en partant du principe qu'une mole de protéine va donner une mole de peptide après digestion (sous réserve que la digestion enzymatique soit totale et que le peptide ne soit présent qu'une seule fois dans la séquence de la protéine). La première étape dans le développement de la méthode de quantification est donc le choix d'un peptide protéotypique.

III.1) Sélection des peptides et des transitions SRM spécifiques à la Vtg

III.1.1) Identification des peptides candidats

L'une des plus grandes difficultés dans ce projet est la très faible connaissance du génome des invertébrés dont *G. fossarum*. La séquence de la Vtg n'est donc pas disponible dans les bases de données. Cependant, une séquence partielle de la vitellogénine a été obtenue par RT-PCR à l'Irstea. Un total de 593 bases (cf. référence *GU985184.1* dans GenBank) a été trouvé et traduit en séquence peptidique constituée de 197 acides aminés. Cet extrait de séquence est présenté sur la Figure 26 :

DAWVHSPEEIALIEQVNVAPIFDWATPLLGPHEPFMYNLKDRSGRRALQAAGGNKCLITAQQVVT
FDGVSFKKTPTTCWRVVTQVQHQQDTFAVMSRQDKSSAQSEKEVRILIPGVGKIEILKGQQVKVD
GQVITGSKPLKDTSGKVIGSVNSSPDRIVSVSPSKLEVVLQDKTDLSTLAERYRSFMNGLCGDFNG

Figure 26 : Séquence peptidique partielle de la vitellogénine chez *Gammarus fossarum*.

Après digestion in silico de cette séquence, le logiciel MRMPilot 1.0 (AB Sciex, Foster City, CA, USA) génère une liste de transitions SRM pouvant permettre la détection des peptides tryptiques ainsi que l'énergie de collision associée à chaque transition SRM. La sélection des peptides se déroule avec les paramètres suivants : aucun clivage manqué, carboxyamidométhylation des cystéines comme modification fixe et oxydation des méthionines comme modification variable. Enfin, le peptide doit comporter entre 5 et 20 acides aminés comme nous l'avons vu lors du premier chapitre. 17 peptides ont ainsi été présélectionnés. Pour chaque peptide, 5 transitions SRM ont été retenues par le logiciel (seulement 4 transitions SRM pour les peptides contenant 5 acides aminés). Un total de 82 transitions SRM a ainsi été généré. Les 17 peptides recherchés sont listés dans le tableau suivant :

Tableau 2 : Liste des 17 peptides recherchés avec le nombre de transitions SRM par peptide.

séquence	nombre de transitions SRM recherchées
ALQAAGGNK	5
C[CAM]LITAQQVVTFDGVSK	5
TPTTC[CAM]WR	5
VVTQVQHQQDTFAVMSR	5
VVTQVQHQQDTFAVM[Ox]SR	5
SSAQSEK	5
ILIPGVGK	5
IEILK	4
GQQVK	4
VDGQVITGSKPLK	5
DTSGK	4
VIGSVNSSPDR	5
IVSVPSK	5
LEVVLQDK	5
TDLSITLAER	5
SFMNGLC[CAM]GDFNG	5
SFM[Oxi]NGLC[CAM]GDFNG	5

Les cystéines alkylées et les méthionines oxydées sont notées respectivement C[CAM] et M[Ox]. La sélection des meilleurs peptides rapporteurs s'est effectuée par une expérience de type IDA (acquisition dépendant de l'information ; cf. paragraphe II.2.3.2.4 du chapitre bibliographique pour le principe de ce type d'expérience). Afin de maximiser les chances de détecter la Vtg, la recherche a été effectuée sur des ovocytes de femelles. En effet, la Vtg est la protéine de réserve énergétique

lors du développement embryonnaire. Elle est donc stockée dans les ovocytes. Pour cette expérience, les conditions chromatographiques suivantes ont été utilisées : de 5 à 35% de solvant B (ACN + 0,1% FA) en 30 min, de 35 à 100% de B en 1 min, 100% de B pendant 7 min, puis 5% de B pendant 5min (le solvant A était H₂O + 0,1% FA). Parmi les dix-sept peptides recherchés, huit ont pu être détectés. Le gradient a alors été modifié afin d'améliorer la séparation de ces huit peptides : un gradient allant de 5 à 10% de solvant B (ACN + 0,1% FA) en 10 min puis de 10 à 20% de B en 5 min et de 20 à 95% de B en 2 min a été utilisé.

La séquence de ces huit peptides est la suivante : IEILK, ILIPGVGK, IVSVSPSK, TPTTC[cam]WR, LEVVLQDK, VIGSVNSSPDR, VDGQVITGSKPLK et VVTQVQHQQDTFAVM[Ox]SR. Le chromatogramme reconstitué associé à ces 8 peptides est montré sur la Figure 27 :

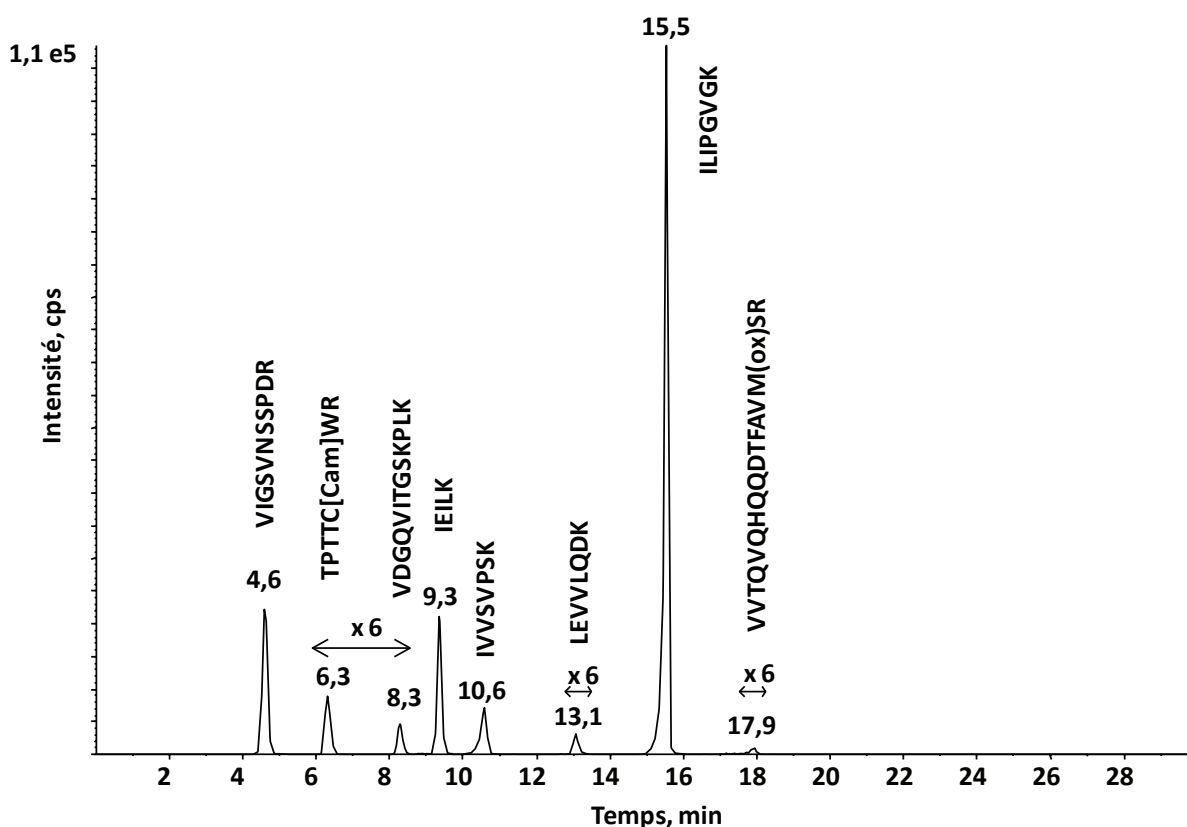


Figure 27 : Chromatogramme reconstitué des peptides détectés de vitellogénine.

Compte-tenu de la complexité de l'extrait et du nombre de peptides potentiels, il est important de s'assurer que les transitions SRM détectées proviennent d'un peptide ayant la séquence attendue afin d'éviter tout risque de faux positif. Les séquences des peptides observés ont alors été confirmées par MS/MS. Le spectre de fragmentation des trois peptides les plus intenses est représenté sur la Figure 28 :

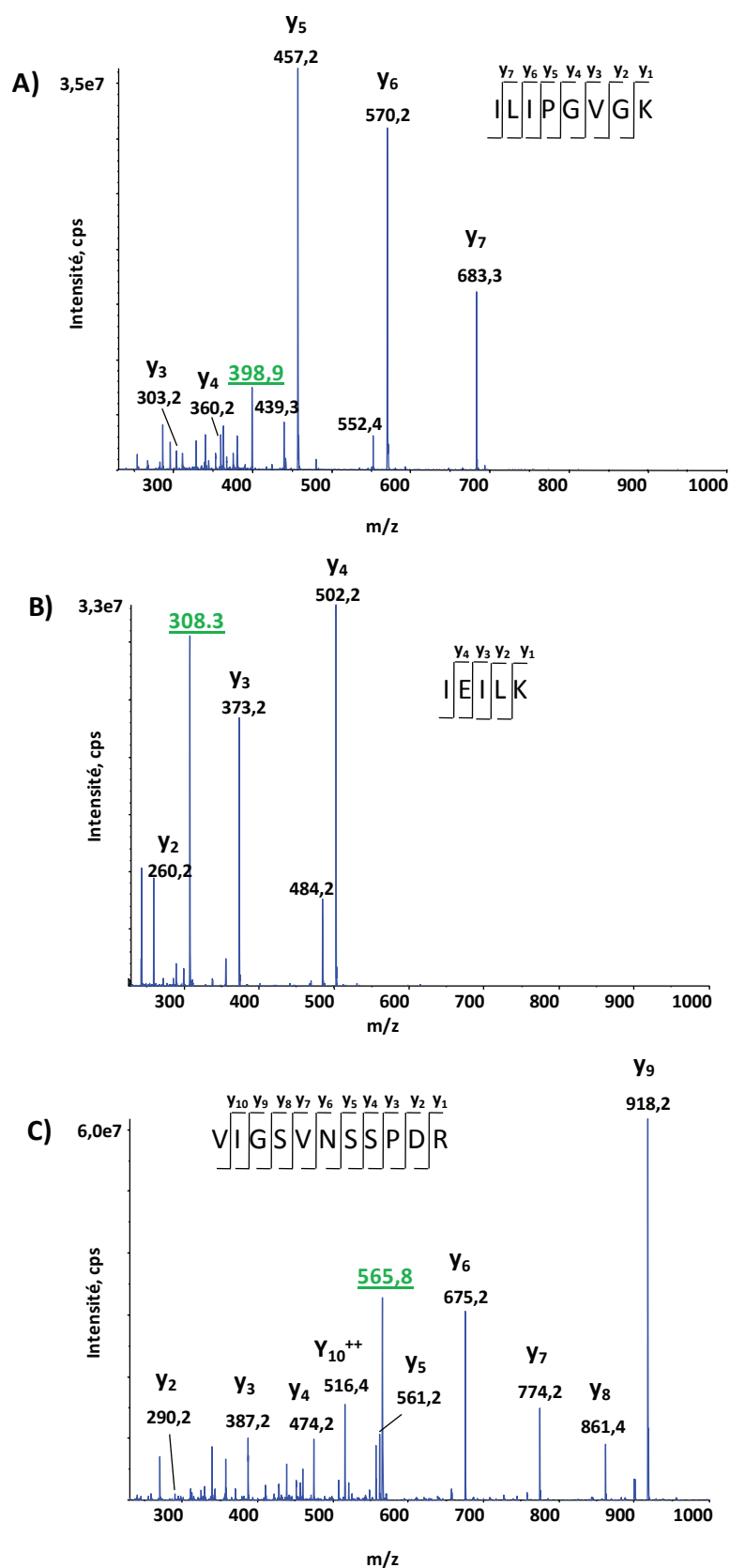


Figure 28 : Spectre de fragmentation des peptides de séquence ILIPGVGK (A), IEILK (B) et VIGSVNSSPDR (C). Pour chaque spectre, l'ion précurseur est souligné en vert.

Sur chaque spectre apparaît clairement toute la série des ions y (à l'exception de ceux pour lesquels le rapport masse sur charge est inférieur à 230). Ces spectres de fragmentation permettent d'affirmer que les signaux détectés proviennent de peptides ayant la séquence attendue. Cependant, il faut vérifier que ces peptides soient exclusivement issus d'une seule protéine ayant le même rôle que la vitellogénine (à savoir s'accumuler dans les ovocytes lors des différents stades de mue des femelles). En effet, d'autres protéines pourraient avoir une fraction de séquence analogue à celle de la Vtg et libérer des peptides de même séquence que la Vtg après digestion enzymatique. D'un point de vue biologique, ces peptides ne seraient donc pas spécifiques du cycle de reproduction de *Gammarus fossarum* et le dosage ne serait pas celui de la Vtg.

III.1.2) Validation de la spécificité biologique des peptides détectés

Puisque *Gammarus fossarum* n'est pas une espèce entièrement séquencée, cette validation n'a pas pu se faire à partir d'une recherche dans des bases de données. La validation de la spécificité biologique a alors été faite en deux étapes : sur des gonades puis sur des organismes entiers.

Dans un premier temps, l'aire de chaque peptide issu de mâles ou de gonades femelles (environ 16 ovocytes regroupés pour chaque mesure) a donc été mesurée à différents stades de mue. Les mâles ne contiennent pas (ou peu) de vitellogénine alors que la concentration en Vtg dans les gonades femelles est censée croître avec le stade de mue (du stade B au stade D2), comme le montre la Figure 29 :

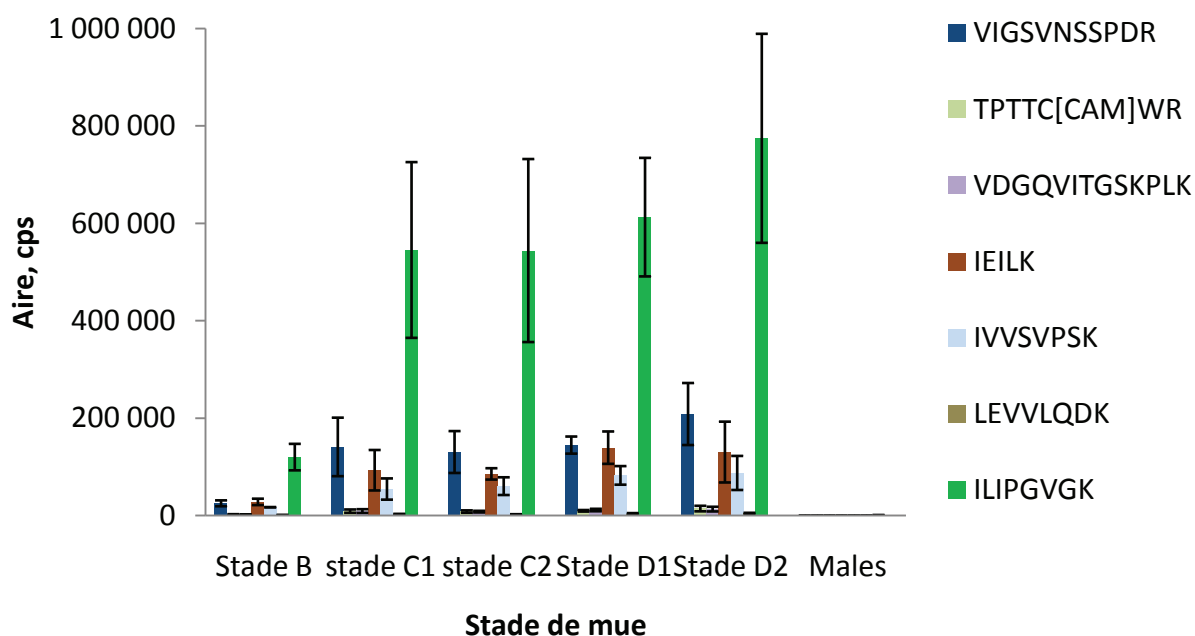


Figure 29 : Evolution de l'aire des peptides de Vtg en fonction du stade de mue chez la femelle et comparaison avec la quantité de Vtg présente chez le mâle (n = 3).

On observe effectivement une augmentation de l'aire de chaque peptide entre les stades B, C1, C2, D1 et D2. De même, la quantité de Vtg détectée chez le mâle est extrêmement faible. Cette spécificité biologique permet de confirmer que les peptides détectés appartiennent effectivement à une protéine dont le taux évolue de manière croissante avec le stade de mue des femelles, c'est-à-dire à une protéine ayant le même rôle que la Vtg chez la plupart des ovipares. Il est donc très probable que les peptides détectés soient issus de la Vtg. En revanche, cette expérience ne prouve pas la spécificité analytique des transitions SRM sélectionnées. En effet, d'autres molécules présentes dans le mélange et possédant les mêmes transitions SRM que celles des peptides de Vtg pourraient être coélues avec les peptides d'intérêt. Pour s'assurer de cette spécificité, il suffit de corrélérer les réponses des peptides entre eux. Si les peptides sont issus de la même protéine, le rapport entre les aires des peptides doit être le même quelle que soit la concentration du peptide et on doit obtenir une bonne corrélation entre les aires de chaque peptide. Ces comparaisons d'aire entre chaque peptide sont présentées dans la figure suivante :

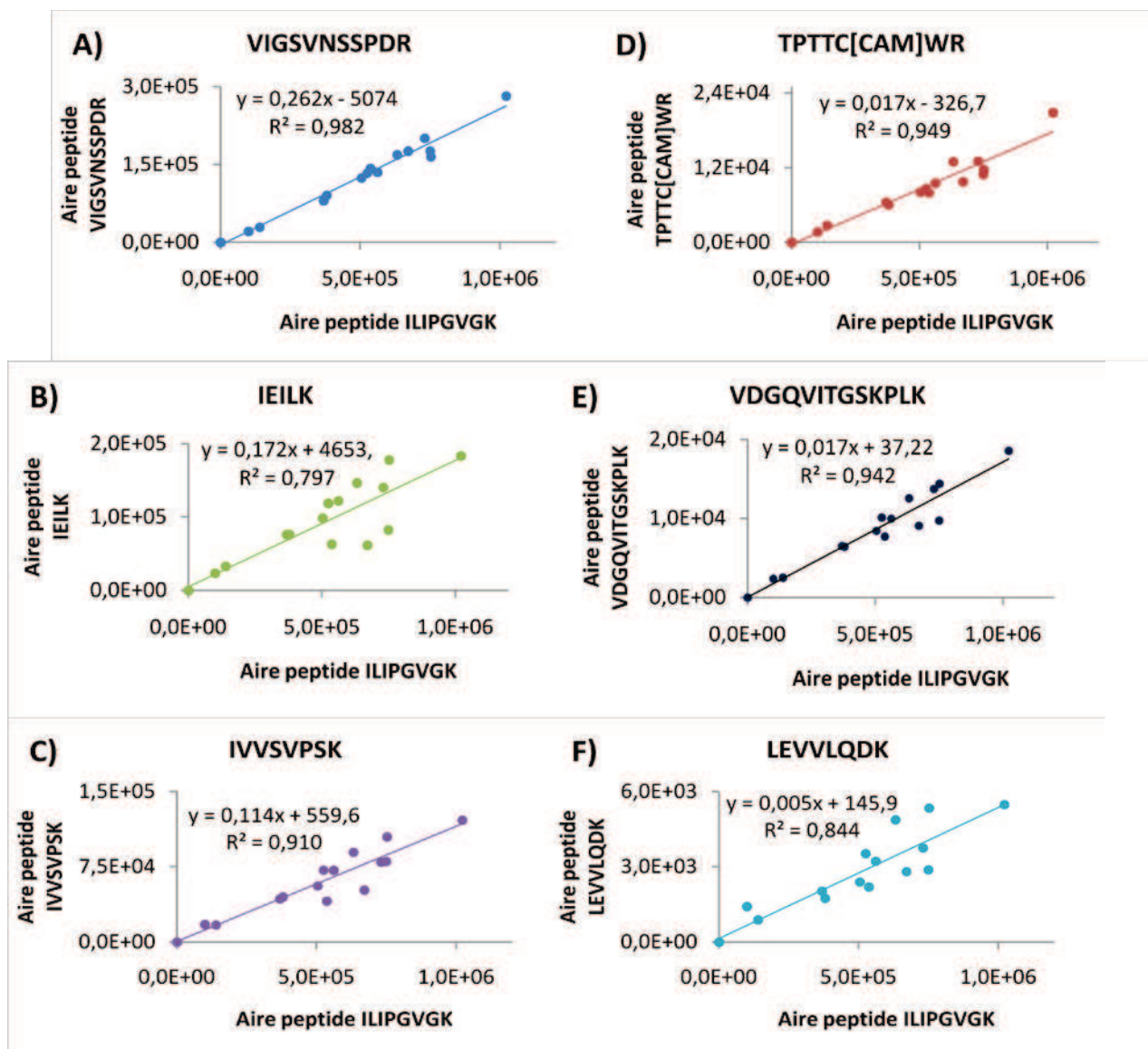


Figure 30 : Evolution de l'aire du peptide de séquence ILIPGVGK en fonction de celle des six autres peptides les plus intenses : VIGSVNSSPDR (A), IEILK (B), IVVSVPSK (C), TPTTCWR (D), VDGQVITGSKPLK (E) et LEVVLQDK (F).

Pour chaque peptide, l'aire représentée correspond à celle de la transition SRM la plus intense. Une droite de régression linéaire a été tracée et le coefficient de détermination (r^2) associé au modèle est affiché. Cette figure montre que le peptide de séquence ILIPGVGK (qui est le plus intense) se corrèle bien avec les peptides de séquence IVVSVPSK, TPTTCWR et VDGQVITGSKPLK puisque le coefficient de détermination est supérieur à 0,91. En revanche, sa corrélation avec le 3^{ème} peptide le plus intense (de séquence IEILK) est relativement mauvaise ($r^2 = 0,80$). Cette mauvaise corrélation peut s'expliquer par la petite taille du peptide IEILK. En effet, plus un peptide est petit, plus il a de chances d'appartenir également à une autre protéine. Ce peptide n'est alors pas spécifique de la Vtg. C'est pourquoi, lors du choix d'un peptide candidat pour le dosage d'une protéine, il est recommandé de prendre un peptide de taille supérieure à cinq acides aminés.

L'étape suivante a donc été de vérifier si plusieurs transitions SRM du peptide ILIPGVGK se corrèlaient bien entre elles. En effet, en quantification absolue par LC-MS/MS, il est recommandé d'utiliser plusieurs transitions SRM. La plus intense est généralement la transition de quantification et sert à déterminer la concentration en analyte. Ensuite, une ou deux autres transitions SRM, dites transitions de qualification, permettent de confirmer le temps de rétention du peptide. En effet, en matrice complexe, une transition SRM est produite par plusieurs composés élués à des temps différents. Les autres transitions peuvent également permettre de confirmer le résultat quantitatif.

Le spectre de fragmentation du peptide ILIPGVGK (cf. Figure 28A, page 98) permet de voir que deux autres fragments sont intenses : les ions de rapport masse sur charge 570,2 (correspondant au fragment y6) et 683,3 (fragment y7). La corrélation entre les trois transitions SRM les plus intenses (398,8 / 457,3 ; 398,8 / 570,4 ; 398,8 / 683,4) du peptide ILIPGVGK a donc été étudiée :

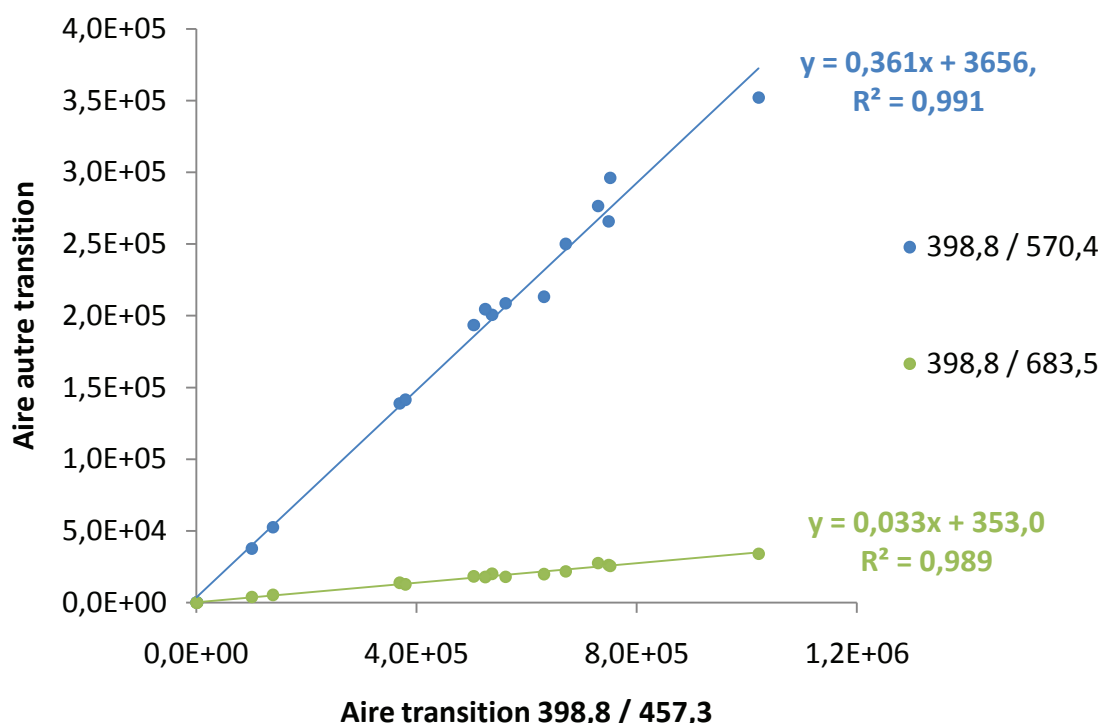


Figure 31 : Evolution de l'aire de la transition SRM 398,8 / 457,3 du peptide de séquence ILIPGVGK en fonction des deux autres transitions SRM les plus intenses de ce peptide.

Entre chaque transition SRM, le coefficient de détermination est de l'ordre de 0,99. Ces trois transitions SRM peuvent donc être utilisées pour doser spécifiquement la Vtg via le peptide rapporteur de séquence ILIPGVGK. Un second peptide peut aussi être choisi afin de confirmer l'information donnée par le premier peptide. Puisque le peptide de séquence VIGSVNSSPDR est le plus intense après celui de séquence ILIPGVGK, il est un bon candidat pour une confirmation. De plus, il est spécifique de la Vtg puisqu'il se corrèle bien avec les autres peptides. En revanche, le peptide IEILK présente une mauvaise corrélation avec la majorité des autres peptides. Bien qu'il soit assez intense, ce candidat illustre un bon exemple de peptide ne permettant pas une quantification spécifique de la Vtg.

Ces résultats préliminaires ont été réalisés sur des ovocytes extraits de femelles afin de maximiser les chances de détecter la Vtg puisqu'elle est stockée dans ces ovocytes. Cependant, il serait préférable que la méthode développée s'affranchisse de ce besoin d'extraction des ovocytes afin de limiter les risques de perte d'échantillon et surtout afin de gagner du temps lors de la préparation d'échantillon. Nous avons alors réalisé la même étude sur des femelles entières afin de simplifier le protocole de préparation d'échantillons.

Des femelles (et non plus seulement les ovocytes) aux différents stades de mue ont donc été broyées, délipidées et digérées. L'aire des cinq peptides les plus intenses a été reportée en fonction du stade de mue et comparée à celle trouvée chez les mâles et chez les juvéniles :

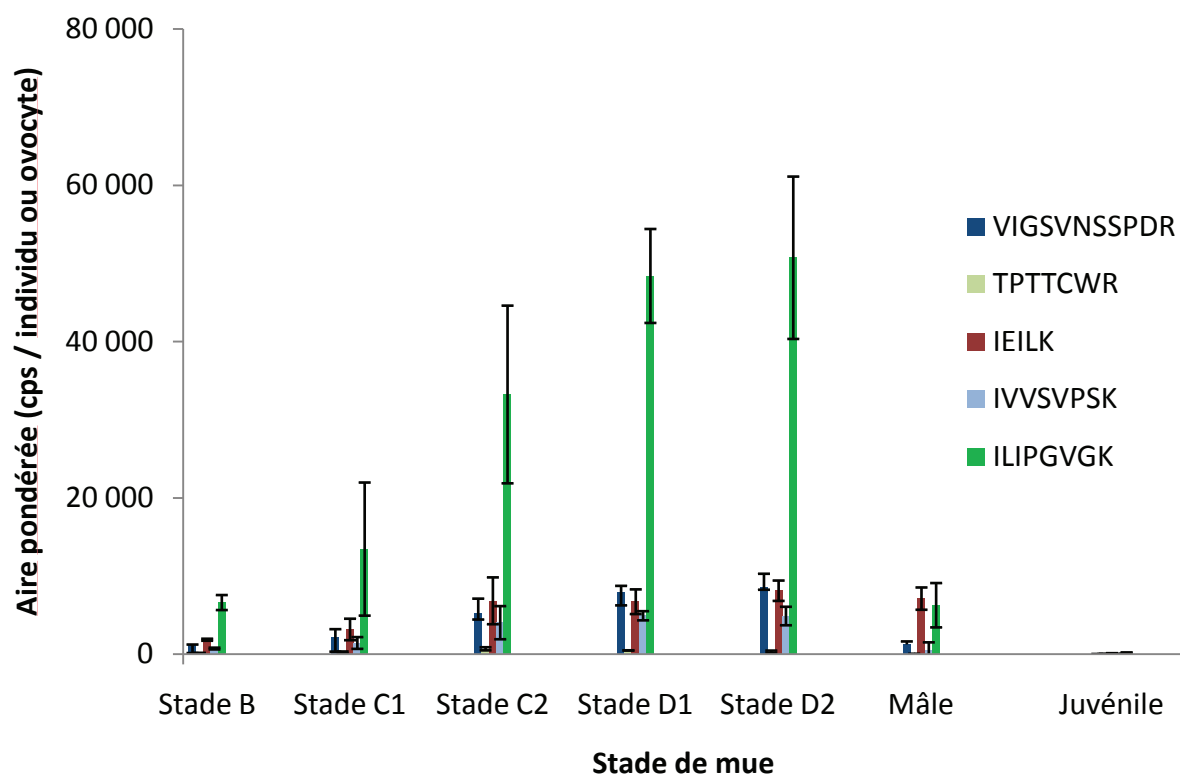


Figure 32 : Variation de l'aire des cinq peptides les plus intenses chez les femelles en fonction de leur stade de mue (aire pondérée par le nombre d'ovocytes), chez les mâles et chez les juvéniles (n=3) (aire pondérée par le nombre d'individus).

Pour chaque stade, l'aire représentée correspond à la moyenne de la transition SRM la plus intense pour chaque peptide après analyse de trois échantillons différents. Pour les juvéniles, un pool de 30 organismes a été réalisé mais seul le peptide ILIPGVGK est détecté (aire / nombre de juvéniles = 172). Pour les femelles, l'aire de chaque peptide a été pondérée par le nombre d'ovocytes qu'elles possèdent puisque la Vtg est stockée dans ces derniers. Avant d'être broyées, les femelles ont été observées sous une loupe binoculaire afin de compter leurs ovocytes. Sur la Figure 29 page 99 (qui représente la même chose mais sur des ovocytes seulement), l'aire du peptide ILIPGVGK est d'environ 800 000 cps pour une femelle de stade D2 alors qu'ici, l'aire pondérée par le nombre d'ovocytes vaut environ 50 000 cps. Ces valeurs sont identiques puisque lors de l'analyse dans la Figure 29, une moyenne de 16 ovocytes était utilisée pour chaque stade. Comme précédemment, une augmentation de l'aire de chaque peptide est observée du stade B au stade D2 et une bonne corrélation a été obtenue entre les aires de chaque peptide. De plus, chez les mâles, un taux de Vtg plus faible est retrouvé. Les analyses futures pourront donc être réalisées sur les femelles entières et non seulement sur les ovocytes puisque des résultats équivalents sont obtenus. Concernant le peptide IEILK, on peut confirmer qu'il s'agit d'un mauvais candidat puisque le taux mesuré chez le mâle est du même ordre de grandeur que celui obtenu chez les femelles de stade D2.

En conclusion, le peptide de séquence ILIPGVGK servira à doser la Vtg alors que le peptide de séquence VIGSVNSSPDR servira à confirmer les résultats obtenus. Puisque la quantification de la Vtg va se faire via d'un peptide rapporteur, il est primordial que la concentration de ce dernier reflète bien celle de la protéine. L'un des biais peut avoir lieu lors de la digestion enzymatique puisque l'étalon interne n'est ajouté qu'à l'issue de celle-ci. Il faut donc s'assurer que cette digestion enzymatique soit totale.

III.2) Efficacité de la digestion enzymatique

L'efficacité de la digestion enzymatique dépend de plusieurs facteurs dont l'accessibilité des sites de clivage à l'enzyme. Cette accessibilité est limitée par la présence de ponts disulfures entre deux cystéines. Ces ponts sont donc dans un premier temps réduits par du dithiothréitol puis alkylés dans un second temps avec de l'iodoacétamide afin d'éviter leur reformation. Un autre paramètre jouant sur l'efficacité de digestion est la résistance de la protéine vis-à-vis de la digestion enzymatique. Ceci dépend de la protéine : en effet, certaines protéines comme le cytochrome-C sont dites faciles à digérer alors que d'autres comme l'albumine de sérum humain sont beaucoup plus résistantes²⁰¹. D'autres paramètres comme la quantité de trypsine, le pH et la température du milieu sont à prendre en compte. Généralement, il faut entre 20 et 100 fois moins de trypsine que de protéine totale (en masse), à pH avoisinant les 8 et à 37°C. Enfin, la durée pendant laquelle se déroule la réaction est également l'une des clés pour une digestion réussie. L'influence de ce dernier paramètre a été plus particulièrement étudiée.

L'efficacité de la digestion enzymatique a été évaluée sur des organismes entiers (femelles) qui ont été préparés comme décrit au paragraphe II.2.2) hormis le fait qu'ils ont été enlevés du bain marie à 37°C après différents temps d'incubation (0, 1, 2, 4, 20, 28 et 88h). A 180 µL d'échantillons digérés sont ajoutés 20 µL d'étalon interne (10 µL d'ILIPGV*GK et 10 µL de VIGSVNSSPDR*). L'analyse LC-

MS/MS a été réalisée juste après l'addition des étalons internes. L'aire des trois transitions SRM les plus intenses des peptides ILIPGVGK et VIGSVNSSPDR a été mesurée et corrigée par celle de leur étalon interne marqué après ces différents temps d'incubation au bain marie :

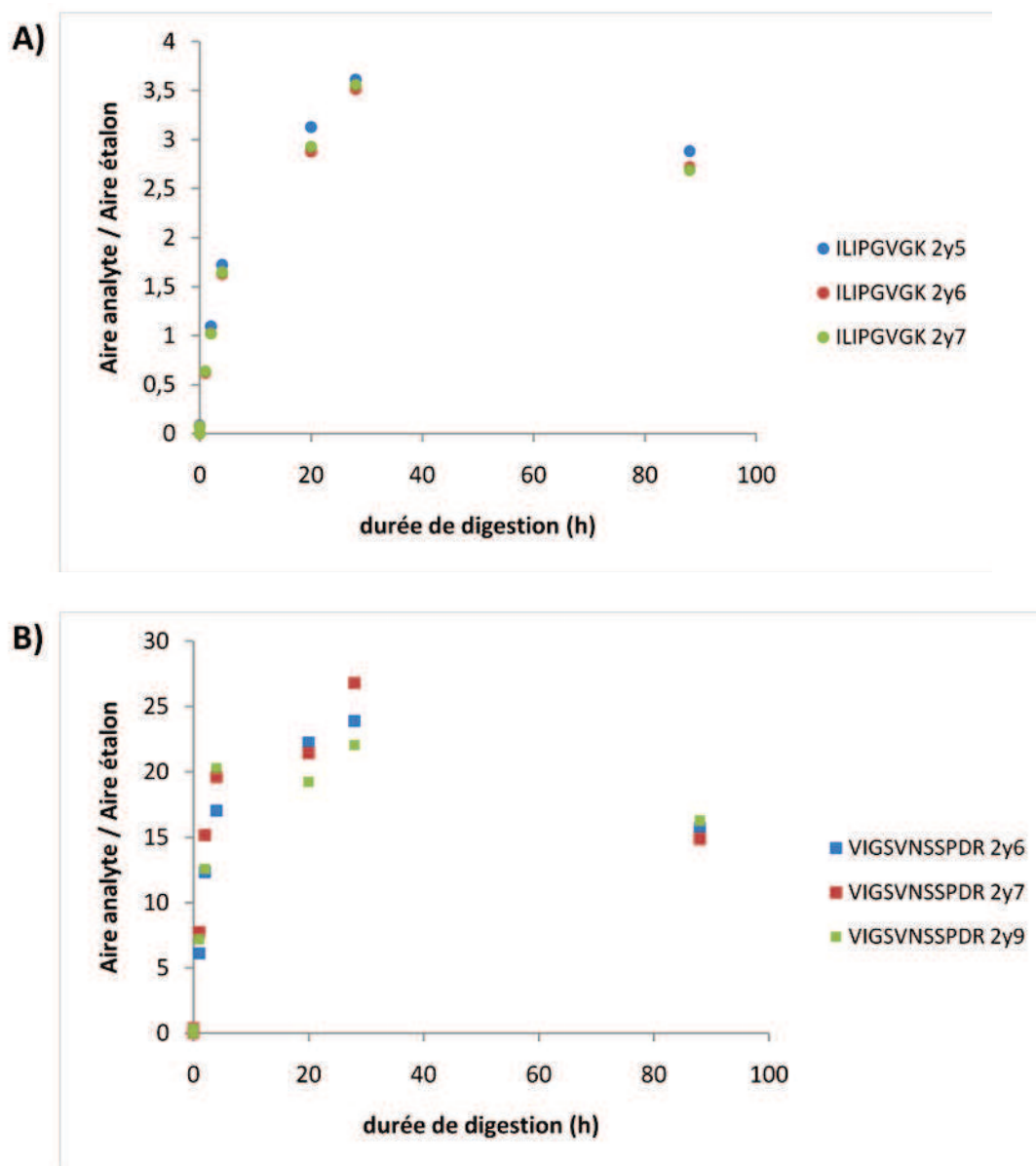


Figure 33 : Cinétique de digestion de la vitellogénine mesurée par le peptide de séquence ILIPGVGK (A) ou VIGSVNSSPDR (B).

Bien que le rendement absolu ne puisse pas être estimé puisque la Vtg pure n'est pas disponible, la digestion doit être reproductible. Une augmentation rapide de l'aire des deux peptides est observée dès les premières heures de digestion pour atteindre un maximum à 28h. Aux alentours de 28h de digestion, la quantité de peptide libérée semble atteindre un plateau. Puis, si la durée de digestion est trop importante (88h ici), une diminution de la quantité de peptide peut apparaître. Cette baisse peut être causée par une adsorption du peptide sur les parois des tubes utilisés lors de la digestion.

Ce phénomène a déjà été observé par Arsene *et al.*²⁰². Pour la suite des expériences, la digestion enzymatique durera donc 28 heures, durée autour de laquelle l'hydrolyse semble atteindre un palier. Ainsi, une faible variation du temps de digestion vers 28 heures de réaction n'affectera que très légèrement le résultat du dosage.

Après avoir défini le temps de digestion enzymatique, un paramètre important à valider est la linéarité de la réponse des peptides sélectionnés. En effet, puisque la quantification reposera sur un étalonnage à un seul point (*i.e.* ajout d'un seul étalon à une concentration définie), il est impératif que la réponse du peptide varie de façon linéaire quelle que soit sa concentration.

III.3) Validation de la méthode de dosage

Plusieurs paramètres vont être validés afin d'aboutir à un dosage fiable. Parmi ces paramètres, le plus important est la linéarité de la réponse, ce qui va également permettre de déterminer la limite de détection du peptide. Cependant, il faudra également évaluer l'effet matrice ainsi que le rendement d'extraction des peptides lorsque cette étape sera envisagée.

III.3.1) Linéarité

III.3.1.1) Dans le solvant d'extraction

Comme nous l'avons vu dans le premier chapitre, la quantification absolue de protéines en spectrométrie de masse peut être réalisée par ajout d'une quantité connue de peptide synthétique dans lequel un acide aminé a été marqué isotopiquement (généralement par du carbone 13 ou de l'azote 15) dans l'échantillon à analyser. L'étalon et l'analyte subiront donc les mêmes conditions opératoires, le même effet matrice et se fragmenteront de la même manière. La quantité de Vtg présente dans l'échantillon est alors obtenue par comparaison entre l'aire du signal extrait du peptide synthétique (marqué isotopiquement) et celle du peptide naturel selon la formule suivante :

$$[Peptide\ naturel] = [Peptide\ marqué] \times \frac{Aire\ du\ peptide\ naturel}{Aire\ du\ peptide\ marqué}$$

Cette formule est valable si la réponse du peptide naturel et du peptide marqué est linéaire en fonction de leur concentration. Différentes gammes de peptide synthétique (marqué ou non) ont donc été réalisées. Dans un premier temps, ces gammes ont été préparées dans le solvant utilisé pour la reprise des organismes après délipidation (tampon Tris glacé, cf. paragraphe II.2.1), p92). La linéarité de la réponse du peptide de séquence ILIPGVGK et de son homologue marqué entre 0,0025 (qui correspond au point le plus bas pouvant être détecté) et 25 ng / mL (point pour lequel le signal mesuré est supérieur à celui obtenu chez les femelles lors de la recherche des peptides protéotypiques) est représentée sur la figure suivante :

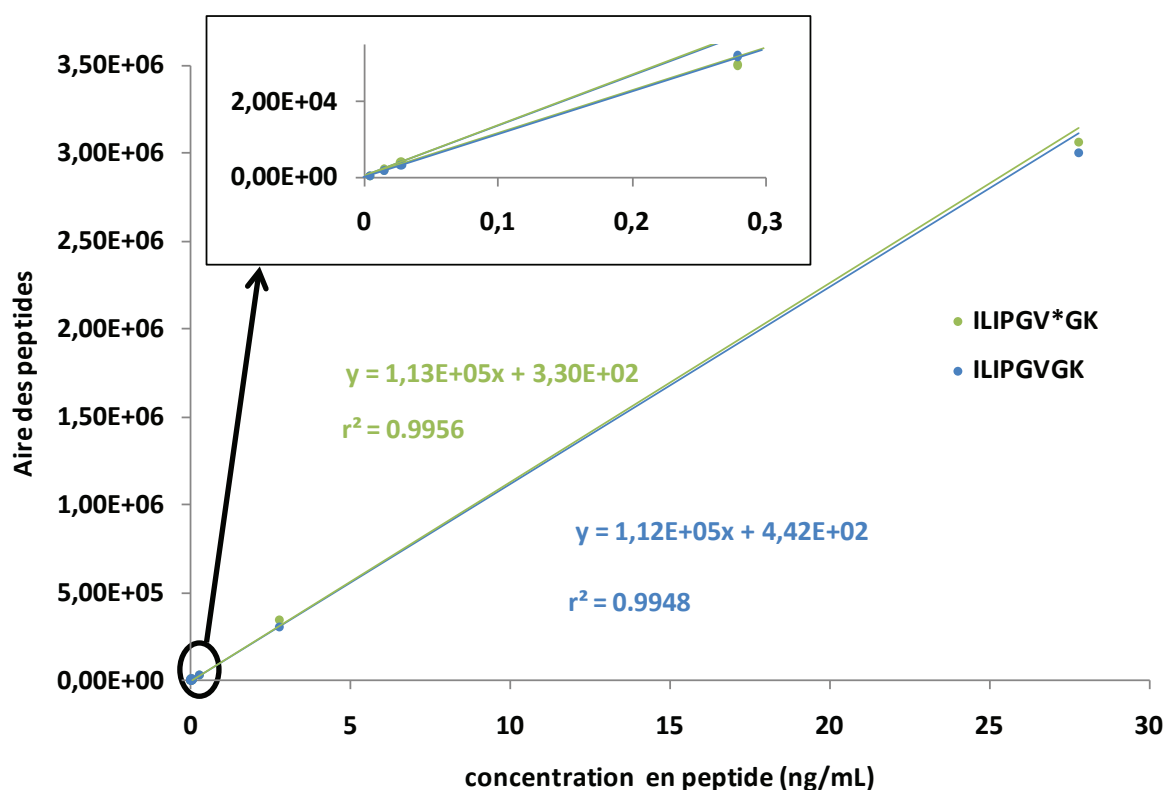


Figure 34 : Courbes d'étalonnage du peptide de séquence ILIPGVGK et de son homologue marqué dans le solvant d'extraction.

Une pondération en $1/x^2$ a été utilisée afin de donner plus d'importance aux points de faibles concentrations dans le calcul du modèle de régression. Ce type de pondération est utilisé ici car le dosage de la Vtg chez le mâle va se situer dans une région proche de la limite de quantification. Le modèle proposé doit donc être aussi exact que possible dans cette zone de la gamme. Une bonne linéarité est obtenue comme le montrent les coefficients de détermination ($r^2 = 0,9978$ et $0,9974$). Un autre facteur permettant de juger si le modèle choisi est correct ou non est l'exactitude de la valeur calculée par le modèle. Cette exactitude est exprimée en pourcentage et est définie de la manière suivante :

$$\text{Exactitude} = \frac{\text{Concentration calculée}}{\text{Concentration ajoutée}} * 100$$

Les exactitudes correspondant à ces gammes apparaissent dans le Tableau 3 :

Tableau 3 : Exactitudes (en %) associées aux gammes de peptide ILIPGVGK et ILIPGV*GK dans le solvant d'extraction.

Type	Concentration ajoutée (ng / mL)	ILIPGVGK		ILIPGV*GK	
		Exactitude (en %)	CV (n = 6) (en %)	Exactitude (en %)	CV (n = 6) (en %)
Etalon 1	0,00278	98		101	
Etalon 2	0,0139	112		93	
Etalon 3	0,0278	94		107	
Etalon 4	0,278	102		93	
Etalon 5	2,78	97		109	
Etalon 6	27,8	97		97	
Contrôle qualité 1	0,139	114	3,4	113	14
Contrôle qualité 2	13,9	109	12	101	7,0

Une exactitude égale à 100% signifie que la concentration calculée est la même que la concentration ajoutée dans l'échantillon. Si l'on se réfère aux recommandations préconisées pour les petites molécules, l'exactitude doit être comprise entre 85 et 115% sur les points de gamme et entre 80 et 120% à la limite de quantification. Les deux points de contrôle qualité (QC) sont des échantillons préparés à une concentration connue mais ne faisant pas partie du modèle de régression linéaire. Le premier point à 0,139 ng / mL correspond à un niveau proche de celui qui sera rencontré chez les mâles alors que le second (à 13,9 ng / mL) se rapproche du taux rencontré chez les femelles. L'exactitude de ces deux points est également comprise entre 85 et 115%. Chacun de ces deux échantillons a été injecté six fois ce qui permet d'évaluer la répétabilité de la mesure par la mesure du coefficient de variation (CV). Le CV doit également être inférieur à 15% ce qui est le cas.

Dans le solvant d'extraction, la réponse des deux peptides est parfaitement linéaire et équivalente puisque les deux droites sont superposables. On pourra donc doser le peptide rapporteur de la Vtg grâce à un peptide marqué. De plus, un dosage par étalonnage à un seul point est envisageable.

Pour le second peptide, la concentration initiale est inconnue car il a été synthétisé par bioMérieux et sa concentration n'a pas été déterminée par analyse d'acides aminés. Ainsi, une solution mère a été diluée et des unités arbitraires ont été choisies en respectant ces facteurs de dilution. De plus, seul le peptide marqué est disponible. La concentration minimale de la gamme est fixée à 1 (soit une dilution par 1 000 de la solution mère) et correspond au point détecté le plus bas. La gamme a ensuite été réalisée sur seulement trois ordres de grandeur (et pas quatre comme pour le peptide ILIPGV*GK) car la quantité de peptide marqué disponible était plus faible. De plus, la concentration arbitraire de 1000 (soit un facteur de dilution de 1) correspond au taux rencontré chez les femelles. La gamme obtenue dans le solvant d'extraction est tracée sur la Figure 35 et les exactitudes associées sont dans le

Tableau 4 :

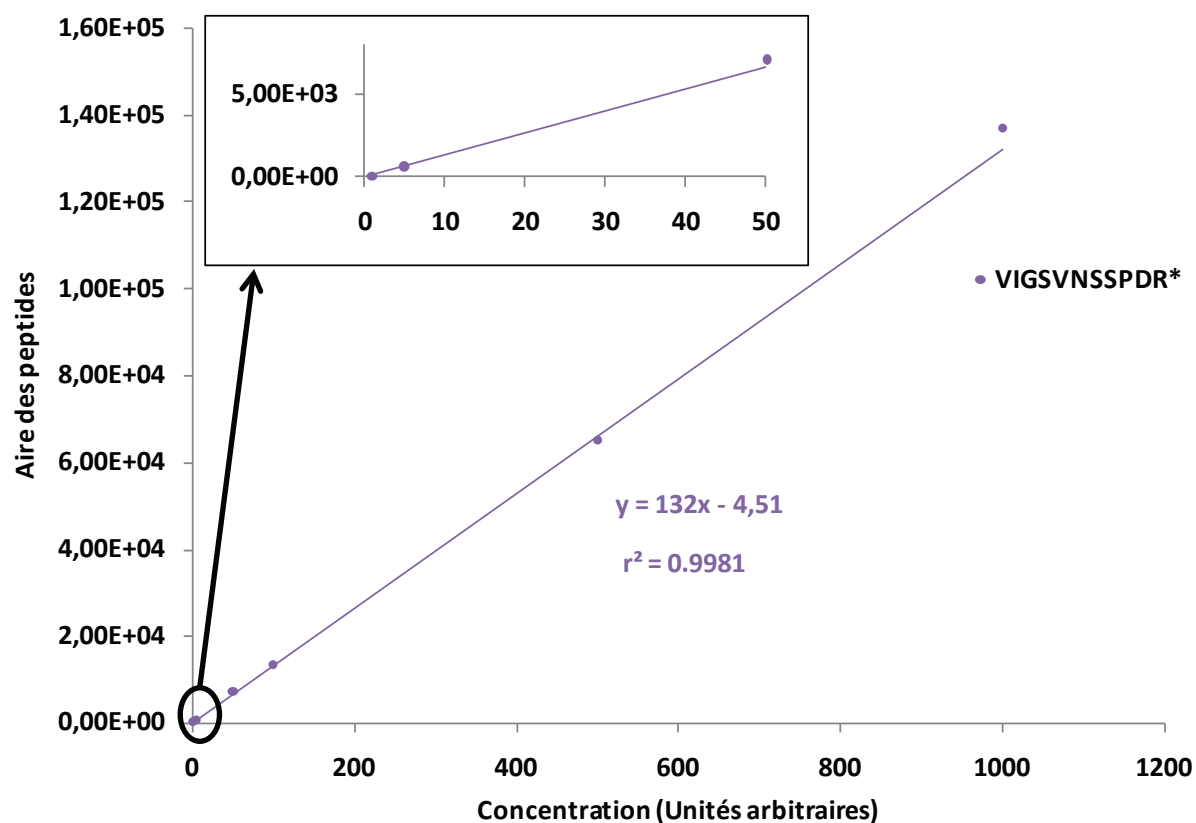


Figure 35 : Courbe d'étalonnage du peptide marqué de séquence VIGSVNSSPDR* dans le solvant d'extraction.

Tableau 4 : Exactitudes (en %) associées aux gammes de peptide VIGSVNSSPDR* dans le solvant d'extraction.

Type	Facteur de dilution	Concentration ajoutée (unité arbitraire)	Exactitude (en %)	CV (n = 6) (en %)
Etalon 1	1000	1	102	
Etalon 2	200	5	90	
Etalon 3	20	50	107	
Etalon 4	10	100	99	
Etalon 5	2	500	99	
Etalon 6	1	1000	104	
Contrôle qualité 1	100	10	113	4,0
Contrôle qualité 2	5	200	109	11,0

La réponse de ce peptide est donc également linéaire sur une gamme dynamique de trois ordres de grandeur au minimum.

Après avoir évalué la linéarité de la réponse de ces deux peptides sans matrice, il faut vérifier que la réponse reste linéaire en présence de la matrice. En effet, la matrice peut avoir une influence sur le

facteur de réponse des peptides (effet matrice). Puisque les dosages ultérieurs seront réalisés chez des mâles et chez des femelles, la linéarité va être étudiée dans ces deux organismes.

III.3.1.2) *Chez les mâles*

Le gène de la vitellogénine est présent chez les ovipares mâles mais est normalement silencieux. Cependant, en présence de perturbateurs endocriniens, la Vtg peut être synthétisée chez les mâles. La mesure du taux de Vtg chez les mâles est donc proposée comme étant un biomarqueur de perturbation endocrinienne. Puisque très peu d'études sont réalisées sur les invertébrés et plus particulièrement sur des espèces sentinelles comme *G. fossarum*, l'objectif de la méthode proposée ici aura pour but de déterminer si la Vtg est détectée chez les mâles. La linéarité de la réponse des peptides sélectionnés doit donc être étudiée dans cette matrice.

Les trois mêmes gammes que précédemment ont donc été réalisées dans du « mâle digéré ». Les résultats obtenus sont présentés sur la Figure 36 et dans le Tableau 5 :

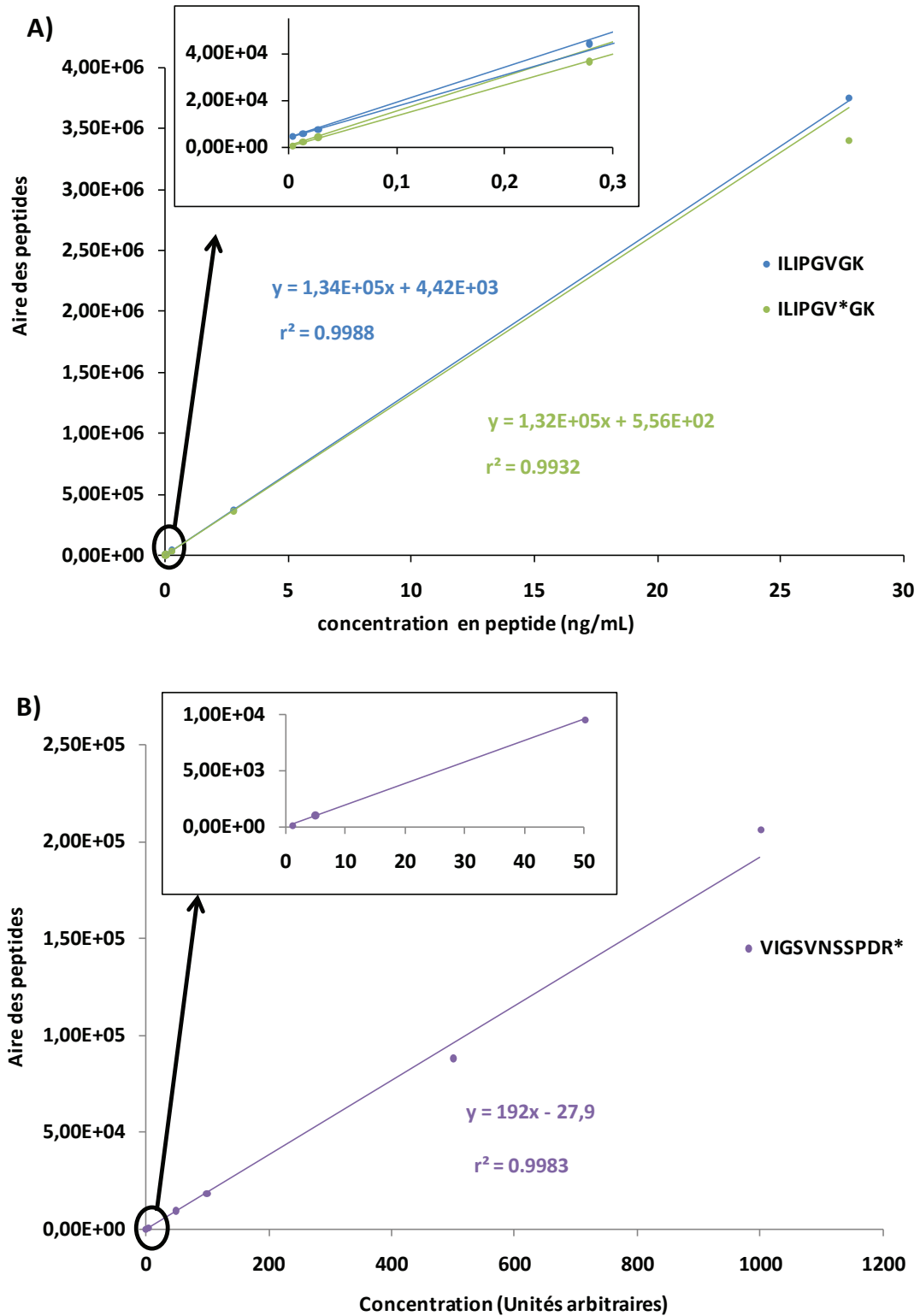


Figure 36 : Courbes d'étalonnage du peptide de séquence ILIPGVGK et de son homologue marqué (A) et du peptide de séquence VIGSVNSSPDR* (B) chez les mâles.

Tableau 5 : Exactitudes (en %) associées aux gammes de peptide ILIPGVGK, ILIPGV*GK et VIGSVNSSPDR* chez les mâles.

Type	ILIPGVGK			ILIPGV*GK		VIGSVNSSPDR*		
	Concentration ajoutée (ng / mL)	Exactitude (en %)	CV (n = 6) (en %)	Exactitude (en %)	CV (n = 6) (en %)	Concentration ajoutée (unité arbitraire)	Exactitude (en %)	CV (n = 6) (en %)
Etalon 1	0,00278	101		97		1	99	
Etalon 2	0,0139	97		115		5	104	
Etalon 3	0,0278	97		98		50	101	
Etalon 4	0,278	106		98		100	96	
Etalon 5	2,78	99		99		500	92	
Etalon 6	27,8	100		93		1000	108	
QC 1	0,139	108	5,2	106	2,4	10	99	6,4
QC 2	13,9	102	2,0	95	2,7	200	112	6,0

Une pondération en $1/x^2$ a également été utilisée. Chez les mâles, la réponse de ces trois peptides est toujours linéaire (les coefficients de détermination sont supérieurs à 0,99 pour chaque courbe et les exactitudes sont comprises entre 85 et 115%). Pour le peptide ILIPGVGK et son homologue marqué, deux droites quasiment parallèles sont obtenues (les pentes diffèrent de seulement 2%). Ces droites ne sont pas superposées car l'ordonnée à l'origine est plus élevée dans le cas du peptide léger. Ce phénomène peut laisser supposer qu'un taux résiduel de peptide ILIPGVGK est détecté. Ce taux provient de la Vtg qui est donc exprimée chez les mâles ayant servi à établir les droites d'étalonnage.

On peut également remarquer que les pentes des droites obtenues ici sont légèrement différentes de celles obtenues dans le solvant d'extraction (cf. Figure 34 et Figure 35). Ceci est du à l'effet matrice qui sera quantifié après la vérification de la linéarité de la réponse chez les femelles. En effet, une partie du projet va concerner le suivi de l'expression de la Vtg chez les femelles afin de caractériser la fonction de cette protéine chez *G. fossarum*.

III.3.1.3) Chez les femelles

Le peptide naturel issu de la Vtg étant abondant chez les femelles, seules des gammes de peptide marqué ont été réalisées. En effet, puisque la Vtg est présente en grande quantité chez les femelles, il ne va pas être possible d'étudier l'évolution de la réponse du peptide synthétique non marqué ajouté à de faibles concentrations. Les mêmes concentrations que précédemment ont été préparées. Les courbes et les exactitudes obtenues sont présentées sur la Figure 37 et dans le Tableau 6 :

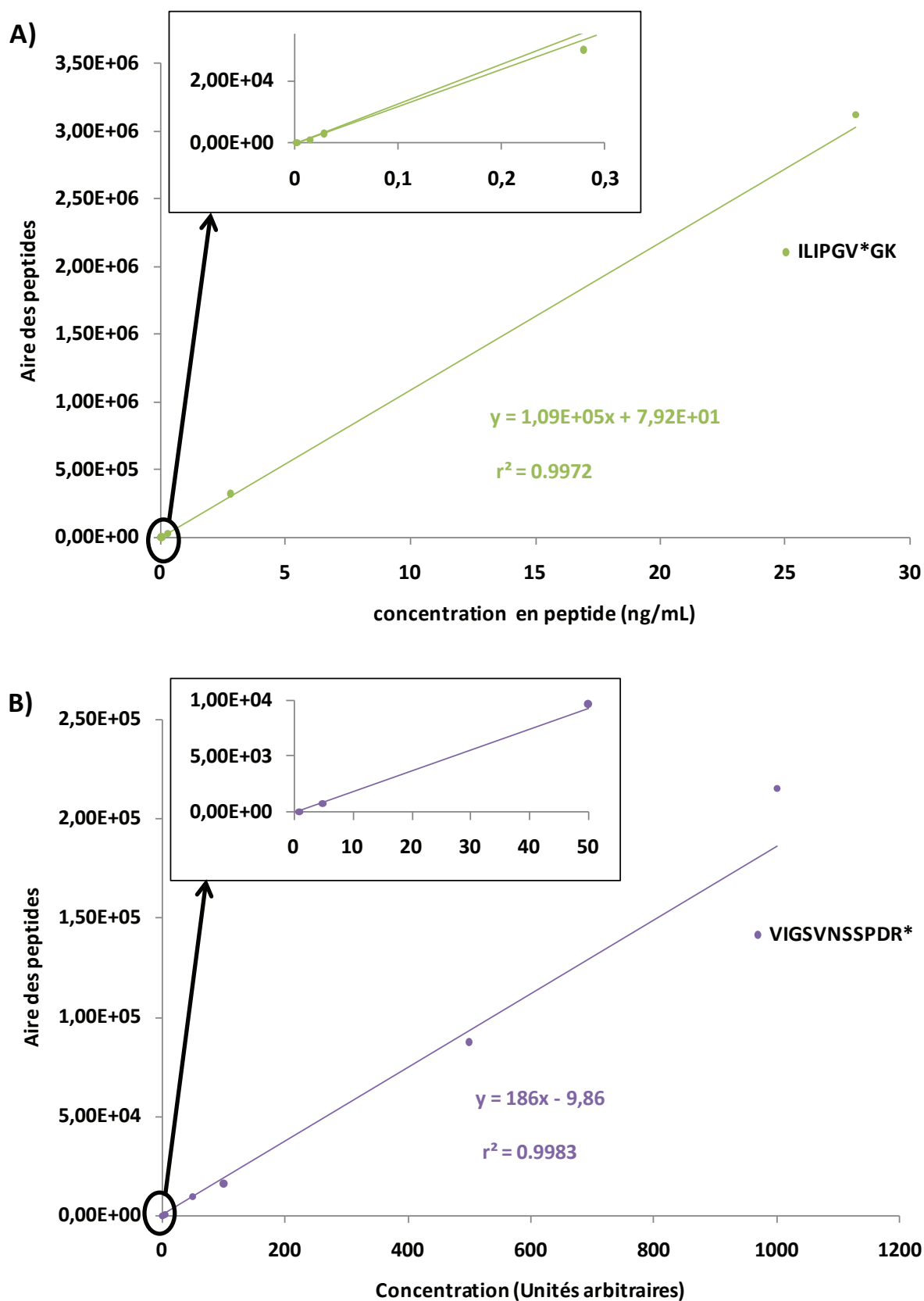


Figure 37 : Courbe d'étalonnage des peptides de séquence ILIPGV*GK et VIGSVNSSPDR* chez les femelles.

Tableau 6 : Exactitudes (en %) associées aux gammes de peptides ILIPGV*GK et VIGSVNSSPDR* chez les femelles.

Type	ILIPGV*GK			VIGSVNSSPDR*		
	Concentration ajoutée (ng / mL)	Exactitude (en %)	CV (n = 6) (en %)	Concentration ajoutée (unité arbitraire)	Exactitude (en %)	CV (n = 6) (en %)
Etalon 1	0,00278	102		1	100	
Etalon 2	0,0139	94		5	98	
Etalon 3	0,0278	95		50	104	
Etalon 4	0,278	99		100	87	
Etalon 5	2,78	107		500	94	
Etalon 6	27,8	103		1000	116	
QC 1	0,139	107	4,6	10	97	7,7
QC 2	13,9	111	1,9	200	108	6,9

Une nouvelle fois, une pondération en $1/x^2$ a été utilisée. Chez les femelles, la réponse de ces deux peptides reste linéaire entre 0,00278 et 27,8 ng / mL pour le peptide ILIPGV*GK et sur trois ordres de grandeur pour le peptide VIGSVNSSPDR*. En effet, les coefficients de détermination sont supérieurs à 0,99 pour chaque courbe et les exactitudes sont comprises entre 85 et 115% pour tous les étalons et les échantillons de contrôle qualité. Comme pour les mâles, les pentes des droites diffèrent de celles obtenues dans le solvant d'extraction à cause de l'effet matrice. Cet effet matrice va donc être quantifié.

III.3.2) Evaluation de l'effet matrice

L'effet matrice est dû à la coélution de molécules de l'échantillon avec le composé d'intérêt ce qui peut interférer avec l'ionisation de l'analyte dans la source du spectromètre de masse : l'ionisation peut alors être augmentée ou supprimée ce qui rend difficile les dosages par étalonnage externe. En revanche, l'utilisation de peptides marqués isotopiquement permet de s'affranchir de cet effet car le peptide marqué aura la même rétention que son homologue non marqué et subira donc les mêmes effets d'ionisation. Pour évaluer cet effet, il faudrait disposer d'une matrice blanche, c'est-à-dire un échantillon de *G.fossarum* dans lequel la vitellogénine est absente et ajouter une quantité de vitellogénine (ou de peptide synthétique non marqué) proche de la quantité trouvée dans les échantillons à doser. Une matrice blanche n'étant pas disponible, l'effet matrice a été évalué par ajout de peptide marqué à des échantillons de mâles et de femelles et par comparaison du signal obtenu en matrice avec celui obtenu dans le solvant d'extraction. L'effet matrice a été mesuré sur les deux niveaux de QC réalisés lors des gammes précédentes. Il a été calculé par la relation suivante :

$$\text{Effet matrice} = \left(\frac{\text{Aire du peptide marqué ajouté en matrice}}{\text{Aire du peptide marqué ajouté dans le solvant}} - 1 \right) \times 100$$

Ainsi, si l'effet matrice est positif, le signal sera surévalué alors que s'il est négatif, le signal sera sous évalué. L'effet matrice mesuré est reporté dans le Tableau 7 :

Tableau 7 : Effet matrice (en %) sur la réponse des peptides VIGSVNSSPDR* et ILIPGV*GK à deux niveaux de concentration chez les mâles et chez les femelles.

	VIGSVNSSPDR*		ILIPGV*GK	
	QC1	QC2	QC1	QC2
Concentration ajoutée	10	200	0,139 ng / mL	13,9 ng / mL
Effet matrice chez les mâles (en %)	18	18	10	9
Effet matrice chez les femelles (en %)	14	11	-10	4

Chez les mâles, l'effet matrice au niveau des deux QC est de 18% et de 9 à 10% pour les peptides VIGSVNSSPDR et ILIPGVGK respectivement. Chez les femelles, il est de 11 à 14% pour le premier peptide et compris entre - 10 et 4 % pour le second.

Le signal mesuré est donc d'une manière générale légèrement augmenté en présence de la matrice. Par conséquent, le dosage par étalonnage interne comme nous l'envisageons est le plus adapté et l'étalon sera ajouté de préférence à un niveau de concentration le plus proche possible de celui de l'analyte.

Après avoir développé la méthode de dosage de la Vtg et publié nos résultats sur un API 5500 QTRAP (AB Sciex)²⁰³, nous avons été amenés à transférer la méthode sur un spectromètre de masse moins sensible (un API 3000 d'AB Sciex) pour réaliser des dosages en routine de la Vtg. Ces dosages auront pour but notamment d'améliorer les connaissances sur le rôle de la Vtg chez *G. fossarum*.

III.4) Amélioration de la sensibilité du dosage

La différence de sensibilité entre les deux spectromètres de masse étant d'un facteur 30 environ, une concentration de certains échantillons tels que les mâles doit être mise en place. L'extraction sur phase solide (SPE) a été choisie. Cette technique présente l'avantage d'être rapide à mettre au point, est simple d'utilisation, et permet de purifier l'analyte en plus de sa concentration. La première partie va donc s'attacher à la mise au point des conditions opératoires. Dans un second temps, la conservation de la linéarité après extraction sera vérifiée.

III.4.1) Mise au point du protocole d'extraction sur phase solide

De nombreux supports sont disponibles pour la SPE : polaires, apolaires, neutres ou chargés. Le choix de la phase dépend de la matrice et de l'analyte à extraire. Pour l'extraction de peptides après digestion enzymatique, deux types de support sont généralement utilisés : un support apolaire ou un

support permettant de réaliser de l'échange d'ions. Différents échangeurs d'ions peuvent être utilisés : échangeur fort ou faible, de cation ou d'anion. L'avantage des échangeurs d'ions est qu'ils permettent une meilleure purification de l'analyte que des supports apolaires. Les échangeurs d'ions sont généralement utilisés en protéomique pour réaliser un fractionnement de l'échantillon avant de l'analyser par chromatographie en phase inverse. L'inconvénient des échangeurs d'ions est que l'élution doit se faire en milieu tamponné. Ceci va introduire de grandes quantités de sels dans l'échantillon. Ces sels vont provoquer un encrassement plus rapide du spectromètre de masse. Pour éviter ceci, il faudrait par exemple dessaler l'échantillon après l'extraction sur le support échangeur d'ions. Ce dessalage peut être réalisé sur un support apolaire.

Afin de limiter le nombre d'étapes de préparation d'échantillon (et donc le risque de perte d'échantillon à cause notamment de d'extractions incomplètes), nous nous sommes tournés vers un support apolaire. Il est constitué d'un monomère hydrophile (le N-vinylpyrrolidone) et d'un monomère lipophile (le divinylbenzène). Pour des molécules ionisables telles que les peptides, le pH du solvant peut jouer sur la sélectivité (en présence de composés acido-basiques comme les peptides). Deux conditions ont donc été comparées : élution en milieu acide et élution en milieu basique. En milieu acide, les composés dont la charge est nulle (*i.e.* les acides et les composés neutres) seront les mieux retenus alors qu'en milieu basique, les composés basiques et neutres seront les mieux retenus.

Le rendement d'extraction est obtenu en comparant le signal de l'analyte avec ou sans extraction. Il peut être calculé par la formule suivante :

$$\text{Rendement d'extraction} = \frac{\text{Aire du peptide après extraction}}{\text{Aire du peptide sans extraction}} \times 100$$

Un rendement égal à 0% signifie que tout l'analyte est resté accroché sur la cartouche (ou que l'analyte n'a pas été retenu lors du dépôt) alors qu'un rendement de 100% signifie que tout l'analyte a été retenu lors du dépôt et a été entièrement élué.

Une solution de référence contenant le peptide ILIPGVGK à 50 ng / mL et n'ayant pas subi de SPE a été injectée six fois afin de calculer une aire moyenne qui correspondrait à un rendement de 100%. Cette valeur d'aire est de $2,10 \cdot 10^5$ coups par seconde et est répétable puisque le coefficient de variation vaut 4,00%. Ensuite, les 20 solutions ayant subi l'extraction (10 solutions en milieu basique et 10 en milieu acide) et préparées selon le protocole décrit au paragraphe II.5.1) page 94 ont été analysées et le rendement d'extraction obtenu est représenté sur la Figure 38 :

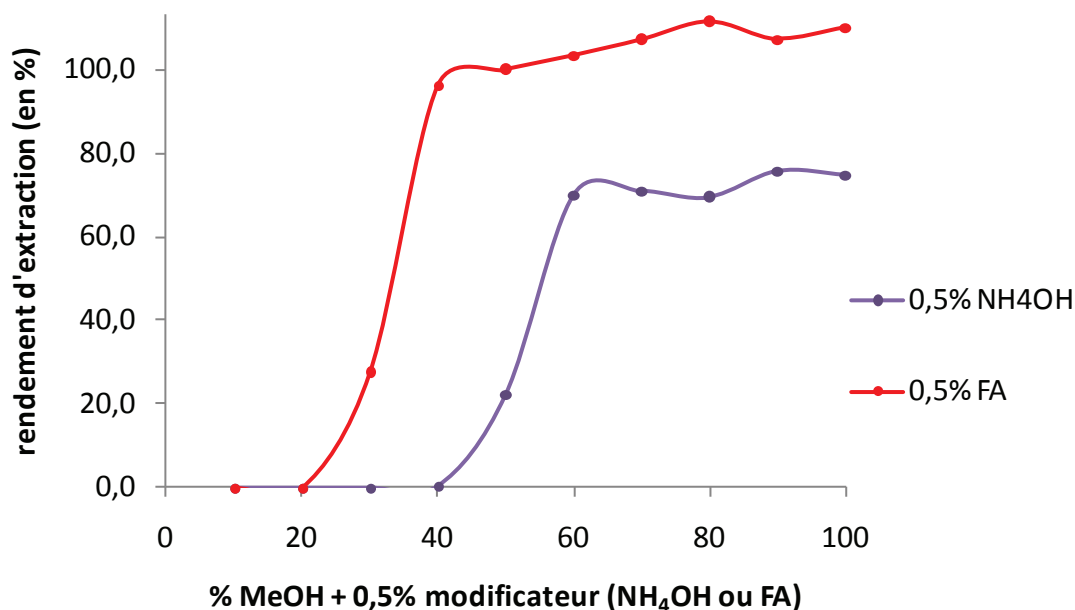


Figure 38 : Rendement d'extraction du peptide ILIPGVGK sur cartouche HLB en milieu basique ou acide.

En milieu basique, cette figure montre que tant que le pourcentage de méthanol est inférieur à 40%, le peptide n'est pas élué et que l'élution maximale est atteinte à partir de 60% de méthanol. Le rendement d'extraction vaut alors environ 75% ce qui signifie qu'une partie du peptide n'est pas élue de la cartouche SPE. En milieu acide, le peptide est retenu si la fraction de méthanol acidifié est inférieure à 20% et l'élution est totale (rendement d'environ 100%) à partir de 40% de méthanol acidifié.

Le point isoélectrique du peptide ILIPGVGK est de 10,1. En présence de 0,5% d'acide formique, le pH de l'eau est d'environ 3. A ce pH, le peptide porte une charge globale positive. En revanche, en présence de 0,5% de NH₄OH, le pH de l'eau est situé autour de 10. Dans ce cas, l'acide carboxylique de la lysine du peptide ILIPGVGK porte une charge négative car le pKa de cette fonction est de 2,2. La chaîne latérale de la lysine est partiellement ionisée (pKa = 10,5) et la fonction amine de l'isoleucine située en position N-terminale est également partiellement ionisée (pKa = 9). Il en résulte un mélange entre l'espèce portant une charge nette de - 1, l'espèce globalement neutre et l'espèce portant une charge nette de +1. De ce fait, le peptide porte une charge proche de 0. Puisque le peptide n'est pas chargé en présence de 0,5 % de NH₄OH, il va être plus apolaire qu'en milieu acide où sa charge est positive. Par conséquent, il sera plus retenu sur le support en milieu basique. C'est pourquoi une plus forte quantité de méthanol est nécessaire pour éluer ce peptide en milieu basique.

Ainsi, pour avoir une élution totale avec un lavage de la cartouche permettant d'enlever le plus de composés (neutres et acides), la cartouche SPE sera lavée par un 1 mL de mélange H₂O / MeOH (70 / 30, v / v) + 0,5% NH₄OH puis l'élution sera réalisée par 1 mL de mélange H₂O / MeOH (50 / 50, v / v) + 0,5% FA. Le lavage pourrait être réalisé avec 40% de méthanol basifié mais par précaution, seulement 30% seront utilisés. De même, l'élution pourrait être faite avec 40% de

méthanol acidifié mais 50% limiteront les risques de ne pas éluer la totalité du peptide.

III.4.1.1) *Vérification de la linéarité*

L'étude de linéarité a été réalisée dans le solvant mais aussi chez des mâles. Elle n'a pas été faite chez les femelles puisque ces dernières ne subiront pas de SPE avant analyse. De plus, il a déjà été vérifié que la réponse du peptide ILIPGVGK et celle de son homologue marqué étaient la même donc seules des gammes de peptide marqué seront réalisées. Enfin, le protocole de SPE développé au paragraphe précédent entraîne l'élimination du peptide VIGSVNSSPDR lors de l'étape de lavage. Ce dernier ne sera alors plus étudié.

Afin de montrer que les performances obtenues sont meilleures sur le nouvel appareil après SPE, les concentrations de peptide utilisées pour réaliser ces gammes vont être légèrement inférieures à celles des gammes précédentes (cf. Figure 37 page 112 pour les mâles par exemple). Ainsi, une gamme de peptide ILIPGV*GK a été réalisée dans le solvant d'extraction et dans des digests de mâles : 10 µL de solution de peptide marqué à 0,5 ng / mL ont été ajoutés à 3 mL de solution (solvant d'extraction ou mâle digéré). La concentration en peptide est alors de 0,00167 ng / mL de digest. L'ensemble de la solution a été déposée sur une cartouche de type HLB. Le lavage de la cartouche et l'élution ont été réalisés par respectivement un 1 mL de mélange H₂O / MeOH (70 / 30, v / v) + 0,5% NH₄OH puis 1 mL de mélange H₂O / MeOH (50 / 50, v / v) + 0,5% FA. L'éluat est ensuite évaporé de façon à obtenir un volume final de 100 µL. Ce protocole a été appliqué de façon à obtenir des concentrations de 0,00167 ; 0,00833 ; 0,0167 ; 0,167 et 1,67 ng / mL. Les courbes obtenues dans le solvant et chez les mâles ainsi que les exactitudes associées sont présentées dans les figures suivantes et dans le Tableau 8 :

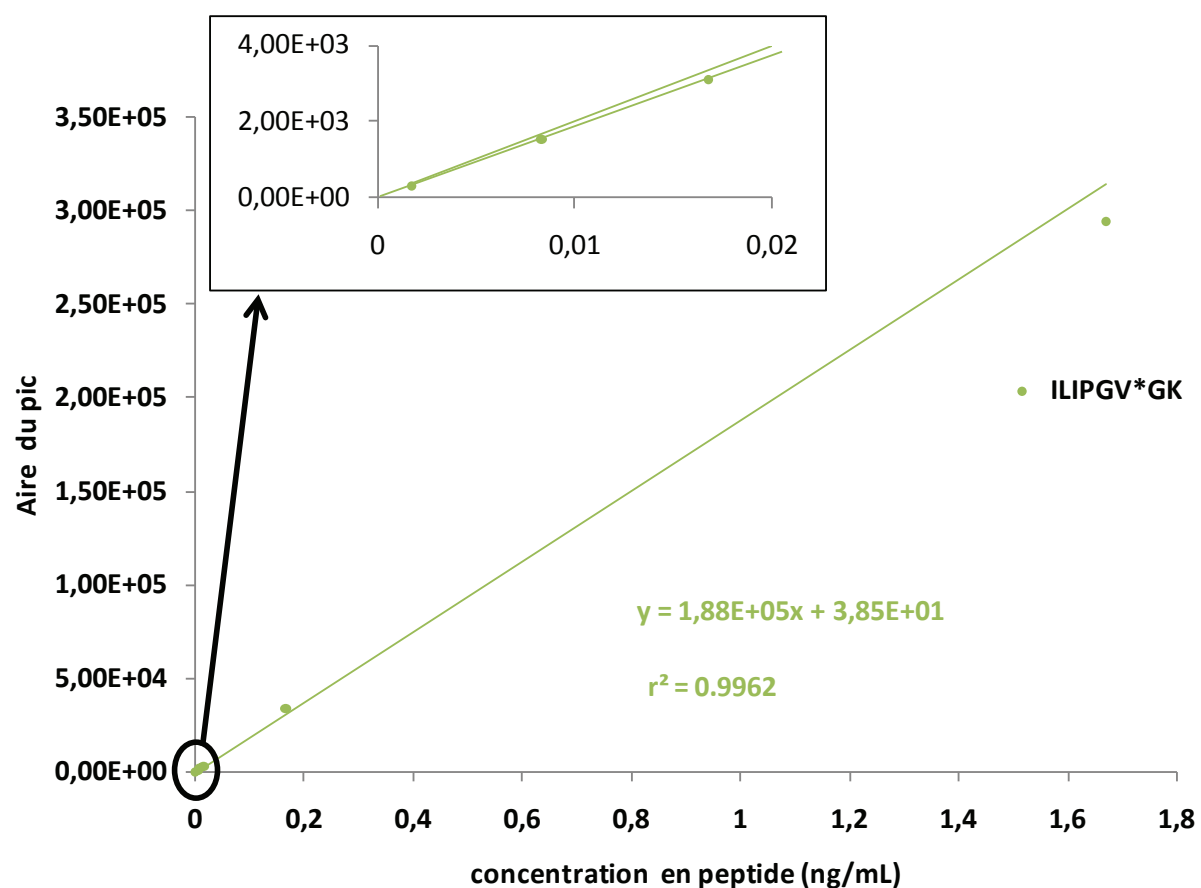


Figure 39 : Courbe d'étalonnage du peptide marqué de séquence ILIPGV*GK dans le solvant d'extraction après SPE (Volume injecté = 20 μ L).

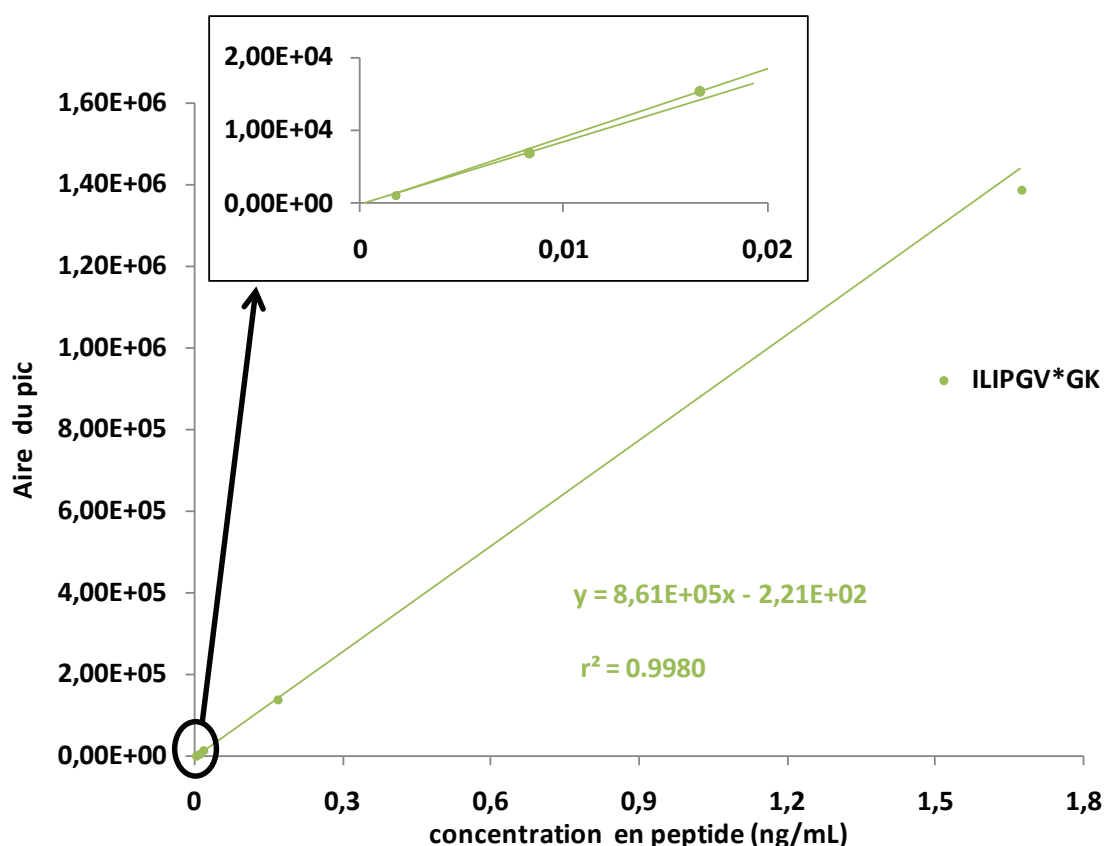


Figure 40 : Courbe d'étalonnage du peptide marqué de séquence ILIPGV*GK chez mâles après SPE (Volume injecté = 60 μ L).

Tableau 8 : Exactitudes (en %) associées aux gammes de peptide ILIPGV*GK dans le solvant d'extraction et chez les mâles après SPE.

Type	Concentration ajoutée (ng / mL)	Exactitude solvant (en %)	Exactitude mâle (en %)
Etalon 1	0,00167	100	100
Etalon 2	0,00833	98	99
Etalon 3	0,0167	99	107
Etalon 4	0,167	109	98
Etalon 5	1,67	94	97

En solvant et en matrice, la linéarité est conservée après SPE. En effet, les coefficients de détermination valent 0,999 et les exactitudes sont comprises entre 94 et 109%. Afin de maximiser les chances de détection du peptide endogène chez les mâles, un volume de 60 μ L a été injecté après extraction. Puisque ce volume injecté est trois fois plus important, la quantité de peptide injectée est également triplée. On peut donc s'attendre à ce que le signal mesuré soit plus important. En admettant que l'augmentation de signal soit proportionnelle à la quantité de matrice (et donc de peptide) injectée, la pente de la droite d'étalonnage chez le mâle serait alors de $2,87 \cdot 10^5$ en injectant

20 μL d'échantillon au lieu de $8,61 \cdot 10^5$ (en injectant 60 μL d'échantillon). Puisque la pente de la droite d'étalonnage dans le solvant est de $1,88 \cdot 10^5$ (après injection de 20 μL), l'effet matrice après extraction sur phase solide peut être estimé à 53%. Cette valeur est probablement biaisée par le fait qu'en matrice complexe, le signal n'augmente pas linéairement avec la quantité injectée : la hausse de signal est plus faible. L'effet matrice après SPE peut donc être supérieur à 53%. En tout cas, il sera supérieur à celui observé sans SPE et qui valait 10%. Cette différence d'effet matrice s'explique par le fait que les interférents coélus avec le peptide d'intérêt n'ont pas été éliminés lors de la SPE. En effet, seuls les analytes très hydrophiles et très hydrophobes sont éliminés par le protocole SPE mis en place sur le support de type HLB. Or, puisque la séparation chromatographique et la SPE se font sur une phase stationnaire permettant la séparation des analytes selon leur hydrophobicité, les interférents ayant le même temps de rétention que le peptide d'intérêt n'ont pas été éliminés lors de la SPE puisqu'ils ont environ la même hydrophobicité. Au même titre que le peptide protéotypique de la Vtg, ces interférents ont été concentrés. L'effet matrice est donc amplifié car à quantité constante d'analyte, plus la matrice est concentrée, plus le signal mesuré est faible²⁰⁴. Cependant, la SPE est tout de même nécessaire puisque des quantités plus faibles de peptides ont pu être détectées sur le spectromètre de masse trente fois moins sensible.

Lors des essais précédents, seul l'étalon a été étudié. La dernière étape dans la mise au point de la méthode a été de vérifier que le peptide ILIPGVGK issu de la vitellogénine endogène soit bien détecté chez les mâles avec les nouvelles conditions opératoires.

III.4.1.2) Application sur des échantillons mâles de *G.fossarum*

Le peptide ILIPGVGK a donc été recherché dans un échantillon de mâle digéré puis extrait sur phase solide selon le protocole décrit précédemment. Cette recherche a été effectuée sur le spectromètre de masse devant être utilisé lors des dosages de routine ultérieurs. Les chromatogrammes reconstitués correspondant à la transition SRM la plus intense du peptide ILIPGVGK et à celle de l'étalon sont montrés sur la Figure 41 :

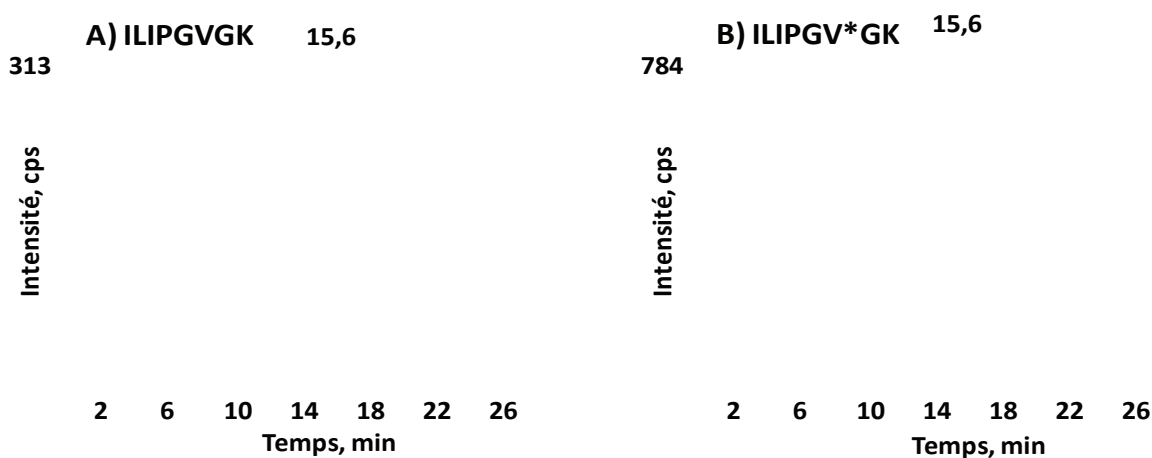


Figure 41 : Chromatogrammes reconstitués du peptide ILIPGVGK (transition SRM 398,8 / 457,3) (A) et de son homologue marqué (transition SRM 401,8 / 463,3) (B) chez le mâle.

Le peptide endogène est détecté avec un rapport signal sur bruit supérieur à dix sur cet appareil. De plus, le temps de rétention du peptide endogène est le même que celui de l'étalon. La méthode développée va donc être appliquée sur une plus grande cohorte d'échantillons. Lors de ces analyses, il s'est avéré qu'un pic interférent était parfois détecté et qu'il était quasiment coélué avec le peptide ILIPGVGK. Un exemple de cette interférence est présenté sur la Figure 42 :

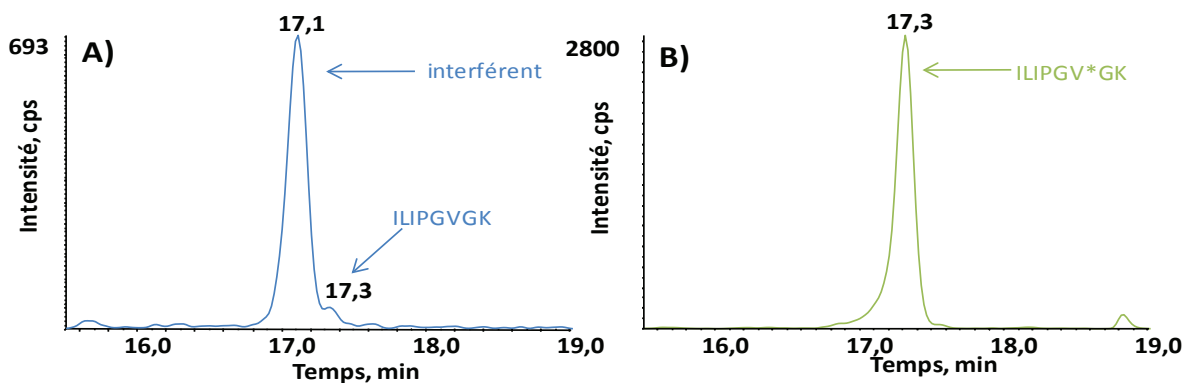


Figure 42 : Chromatogrammes reconstitués du peptide issu de la Vtg (A) et de son homologue marqué (B) chez un mâle.

La Figure 42 montre que le temps de rétention (t_r) du peptide ILIPGVGK est différent de celui de la Figure 41. Ceci s'explique par un changement de chaîne chromatographique et l'ajout d'une précolonne dans les conditions de la Figure 42. Ce peptide ILIPGVGK est interféré par un analyte quasiment coélué ($t_r = 17,1$ min). Cet interférent qui n'est présent que dans certains échantillons (et qui était absent dans les échantillons utilisés lors du développement de la méthode) doit alors être séparé de l'analyte. Afin de vérifier que l'interférent soit issu de l'échantillon et ne soit pas lié à un effet mémoire, cet échantillon a été dilué par deux (ce qui a permis de réinjecter le même échantillon) et injecté sur un autre système LC-MS/MS (autres injecteur, chaîne chromatographique et spectromètre de masse). La séparation a été réalisée sur une autre colonne chromatographique (mais ayant toujours les mêmes dimensions et provenant du même constructeur) et sans précolonne :

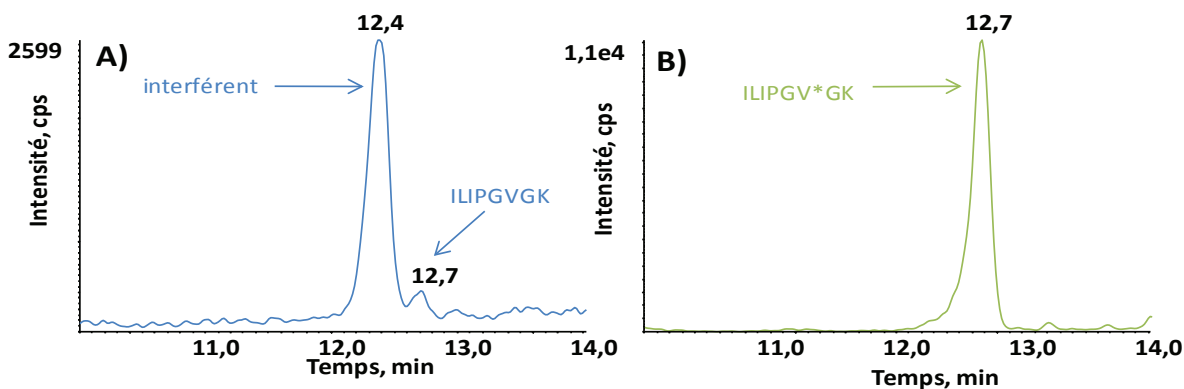


Figure 43 : Chromatogrammes reconstitués du peptide issu de la Vtg (A) et de son homologue marqué (B) à partir du même échantillon que sur la Figure 42 mais en utilisant un autre système LC-MS/MS.

Dans ces conditions, le peptide est élué à 12,7 min et l'interfèrent est également détecté ($t_r = 12,4$ min). Cet interfèrent n'est donc pas lié à un effet mémoire et provient d'une autre protéine de *G. fossarum*. La confirmation ultime serait l'obtention d'un spectre de fragmentation mais le signal étant relativement faible et le peptide donnant peu de fragments, le spectre de l'analyte élué à 12,4 min n'a pas pu être clairement différencié de celui élué à 12,7 min.

Un nouveau gradient a été mis au point afin de séparer l'interfèrent du peptide d'intérêt avec comme contrainte le fait que l'analyse dure au maximum 30 minutes. Ce gradient est décrit au paragraphe II.3) page 93. La séparation obtenue avec un autre échantillon interféré est présentée sur la Figure 44 :

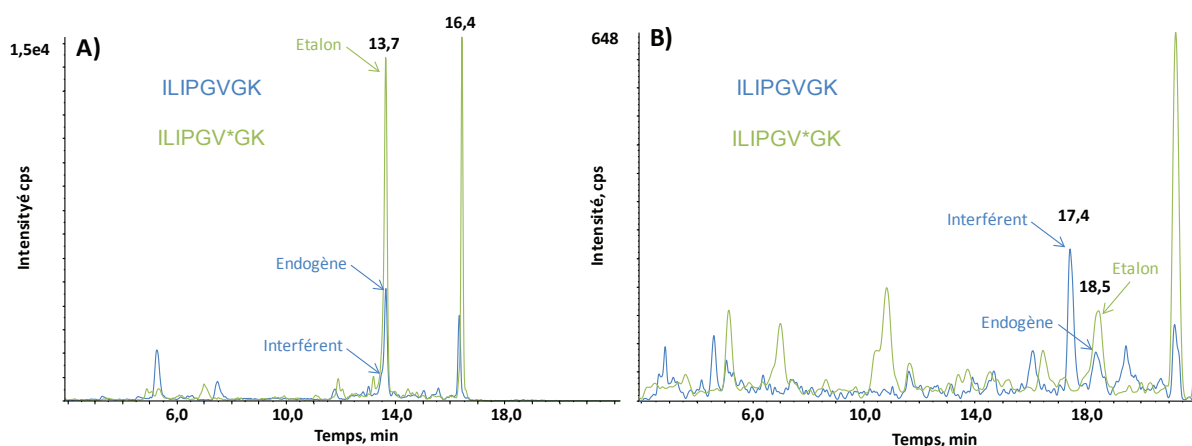


Figure 44 : Chromatogrammes reconstitués obtenus avec l'ancien (A) et le nouveau gradient (B).

La différence de signal entre la partie A et la partie B de la Figure 44 s'explique par une mauvaise stabilité du peptide étudié. En effet, il s'est écoulé un mois entre les deux analyses. Cependant, avec ces nouvelles conditions chromatographiques, l'interfèrent est séparé de l'analyte avec un retour à la ligne de base. Cet interfèrent était resté inaperçu lors du développement de la méthode probablement en raison de son absence dans le pool d'échantillon utilisé lors des études de linéarité.

Une dernière analyse a été réalisée sur une femelle présentant également un pic interfèrent. Un spectre de fragmentation à haute résolution a été obtenu. Pour cela, l'analyse s'est déroulée sur un Q-exactive (Thermo Fisher Scientific). Cet appareil est constitué d'un quadripôle permettant la sélection d'un ion précurseur, suivi d'une cellule de fragmentation puis d'un orbitrap permettant l'analyse des fragments avec une résolution en masse de 140 000. Les ions y_2 à y_6 du peptide ILIPGVGK ont été extraits sur une plage de masse allant de $M_{yi} - 0,005$ à $M_{yi} + 0,005$ (M_{yi} étant la masse mono isotopique de l'ion y_i). L'extraction de ces cinq ions a donné un pic interféré dans chaque cas. L'interfèrent a donc la même masse et les mêmes fragments que le peptide ILIPGVGK. Sachant que le pic chromatographique du peptide de synthèse ne présente pas la même interférence, une hypothèse permettant d'expliquer ce phénomène serait la présence d'un peptide qui ne possède pas le même enchaînement de leucines et isoleucines (par exemple, un peptide ayant pour séquence ILLPGVGK). En effet, ces deux résidus ont exactement la même masse et ne peuvent

donc pas être différenciés lors d'une analyse en ESI suivie d'une fragmentation par CID. En revanche, l'hydrophobicité entre ces deux résidus n'est pas exactement la même : la leucine est un peu plus hydrophobe que l'isoleucine. Puisque l'interférent est élué un peu plus tôt que le peptide ILIPGVGK, parmi les huit combinaisons de peptide possible (en considérant que les trois premiers acides aminés peuvent être une leucine ou une isoleucine), le seul peptide moins hydrophobe que l'ILIPGVGK a pour séquence IIPGVGK. Avec les appareils disponibles au laboratoire, il n'est pas possible de différencier un peptide contenant une leucine de son homologue contenant une isoleucine. Ces deux acides aminés peuvent cependant être distingués par spectrométrie de masse. En effet, il a déjà été montré que dans une source de type MALDI, lorsque l'énergie du laser était suffisamment élevée, des fragments de type d et w résultant de coupures au sein de la chaîne latérale du peptide étaient générés en source. Ces fragments permettent de différencier la leucine et l'isoleucine²⁰⁵. Plus récemment, Gupta *et al.*, ont combiné les fragmentations par ETD permettant de générer des ions z avec une fragmentation par CID permettant d'obtenir une perte de 29 Da dans le cas de l'isoleucine et de 43 Da dans le cas de la leucine²⁰⁶. D'une façon générale, l'ultime moyen de confirmer la séquence de l'interférent serait de synthétiser les huit peptides et de les analyser avec le gradient utilisé lors de l'analyse des échantillons de *G.fossarum*. Ceci permettrait de prouver qu'un des huit peptides (ou plusieurs) a le même temps de rétention que l'interférent. Le coût d'une telle expérience étant relativement élevé par rapport à l'intérêt analytique de vérifier cette hypothèse, les peptides potentiels n'ont pas été synthétisés.

Les conditions chromatographiques développées ici et permettant de séparer l'interférent du peptide ILIPGVGK seront conservées pour la suite des analyses. Les analyses ultérieures correspondent aux applications utilisant la méthode développée.

III.5) Applications

La méthode de quantification de la vitellogénine chez *Gammarus fossarum* présentée précédemment a été développée dans le but de suivre l'évolution de la Vtg chez cette espèce sous différentes conditions. Ce suivi est d'un intérêt majeur puisque très peu d'informations sont disponibles chez les invertébrés en dépit de leur importance en écotoxicologie. La Vtg a été ciblée puisqu'elle est la protéine précurseur des protéines du jaune d'œuf chez la majorité des ovipares. Cette protéine est donc indispensable à la survie de l'espèce. Cependant, chez *G.fossarum*, la fonction de la Vtg n'a pas été confirmée. La première étape des applications va donc être de vérifier la fonction de la vitellogénine chez *G.fossarum*. Ceci va donc être réalisé sur des femelles mais également sur des embryons. L'étude va ensuite se poursuivre sur la modulation de l'expression de la Vtg afin d'une part d'approfondir les connaissances sur le système endocrinien de cette espèce et d'autre part de trouver d'éventuels perturbateurs endocriniens. Cette étude sera réalisée chez les femelles mais également chez les mâles. En effet, puisque les mâles ne sont pas censés exprimer le gène de la Vtg, ils sont de bons candidats pour montrer qu'une substance est un perturbateur endocrinien chez cette espèce ou pour montrer qu'un site a été pollué. Ces résultats ont donné lieu à la publication d'un article dans *Aquatic toxicology*²⁰⁷. Ce paragraphe va présenter seulement quelques exemples d'applications de la méthode de dosage qui ont été réalisés en partenariat avec

l'Unité de Recherche Milieux Aquatiques (UR MALY) de l'Irstea de Lyon. L'objectif ici est de seulement illustrer l'intérêt de la méthode développée mais pas d'entrer dans les détails de l'interprétation biologique de ces résultats puisqu'ils font l'objet à part entière d'une autre thèse.

III.5.1) Vérification de la fonction de la vitellogénine chez *G. fossarum*

Chez de nombreux ovipares, la vitellogénine est une protéine précurseur du jaune d'œuf. Elle est donc fortement impliquée dans la reproduction de l'espèce puisqu'elle sera utilisée comme réserve énergétique lors du développement embryonnaire. Afin de vérifier cette fonction, des femelles à différents stades de mue et des embryons à différents stades de développement ont été analysés (n = 5 par stade). Les résultats obtenus sont présentés sur la Figure 45 :

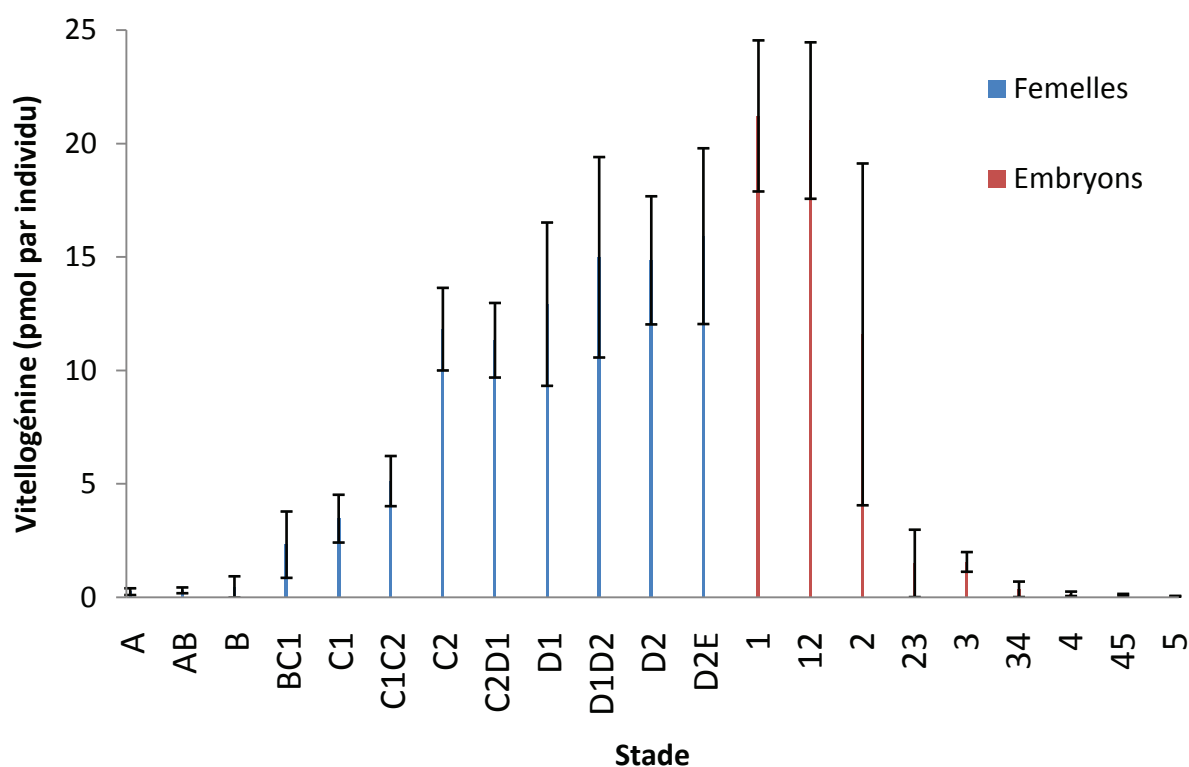


Figure 45 : Evolution de l'expression de la vitellogénine au cours du cycle de reproduction des femelles et du développement embryonnaire (n=5).

Puisque les embryons sont trop petits pour déterminer leur masse, les résultats ont été pondérés par le nombre d'individus : en moyenne, ils ont été groupés par 10 lors de la préparation d'échantillon. Afin de trouver une équivalence chez les femelles, la quantité de Vtg a été pondérée par le nombre d'ovocytes chez ces dernières. La Figure 45 montre un très faible taux de Vtg chez les femelles aux stades A et B puis une forte augmentation lors des stades C1 à D1 où le taux maximal de Vtg est maintenu jusqu'à la ponte des œufs (en fin de stade D2). Chez les embryons de stade 1, le même taux de Vtg est retrouvé que chez les femelles juste avant la ponte. Puis une forte diminution se produit lors des stades 2 et 3 jusqu'à atteindre un taux très faible aux stades 4 et 5. Ceci confirme le

fait que la Vtg soit progressivement accumulée dans les ovocytes par les femelles jusqu'à la ponte des œufs puis que cette protéine soit progressivement consommée par les embryons lors de leur développement. Chez *G. fossarum*, la protéine servant de réserve énergétique lors du développement embryonnaire est donc bien de la Vtg. Ce résultat était toutefois attendu puisque lors de la recherche de la spécificité des peptides détectés, des femelles à différents stades de mue avaient été utilisées afin d'avoir des taux très variables de Vtg (cf. paragraphe III.1.2) page 99). Il fallait cependant compléter ces résultats préliminaires par le suivi de la quantité de Vtg chez les embryons. Cette expérience a également permis de définir un taux moyen de Vtg pour chaque stade de mue. Ceci est d'un intérêt majeur lorsqu'une perturbation endocrinienne veut être mise en évidence chez les femelles. En effet, puisque le taux de Vtg varie naturellement, il faut tenir compte de cette variation lors de l'interprétation des résultats chez des femelles (ou chez des embryons). La méthode développée a ensuite été appliquée pour voir si certaines substances modèles pouvaient faire varier le taux de Vtg chez les femelles.

III.5.2) Modulation du taux de vitellogénine chez les femelles

Pour cela, deux hormones ont été étudiées : la 20-hydroxy ecdysone (20-HE) et le farnesoate de méthyle (MF). Chez les crustacées, les ecdystéroïdes sont des hormones qui régulent entre autres la mue, le développement embryonnaire²⁰⁸⁻²⁰⁹ et la reproduction²¹⁰⁻²¹¹. Quant au MF, de nombreux travaux indiquent qu'il stimule la reproduction des crustacées²¹²⁻²¹³ comme la gamétogenèse chez les mâles et les femelles ou la vitellogenèse. Ainsi, des femelles de *G. fossarum* ont été exposées pendant 21 jours en laboratoire à ces deux hormones avec des concentrations d'hormones allant de 0 à 100 µg / L. A l'issue des 21 jours, les femelles ont été immédiatement broyées et digérées. Les taux de Vtg mesurés sont présentés sur la figure suivante :

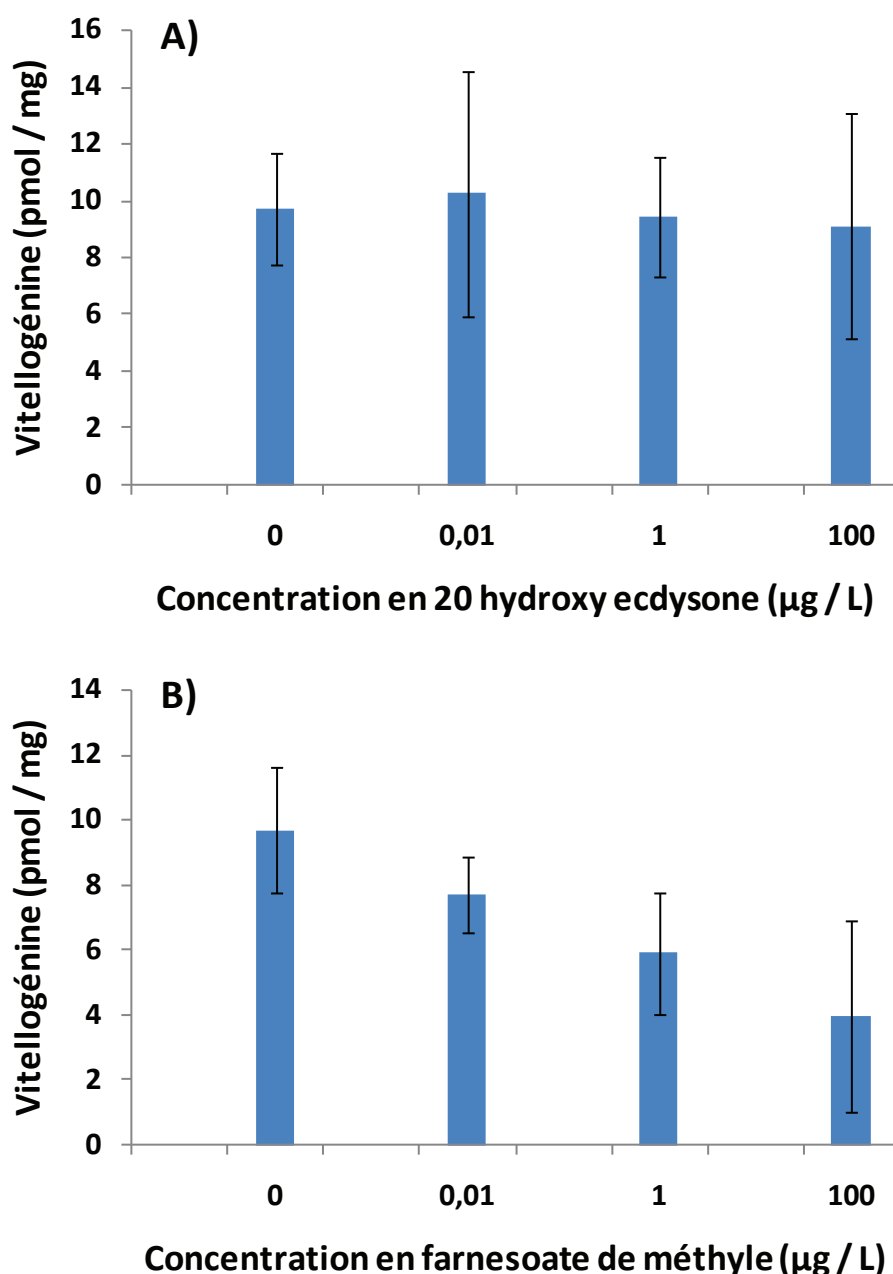


Figure 46 : Evolution de l'expression de la vitellogénine chez les femelles après exposition à la 20-hydroxy ecdysone (A) ou au farnesoate de méthyle (B) (n=15).

Afin de permettre une comparaison de ces deux substances avec les mâles, les taux de Vtg sont exprimés en pmol de protéine par mg d'échantillon et ne sont donc plus pondérés par le nombre d'ovocytes. Pour chaque concentration d'hormone, 15 répliquats ont été réalisés. Puisque le stade de mue présente une forte influence sur le taux de Vtg chez les femelles, seuls les organismes de stade C2 ont été conservés pour le traitement des données (soit 50% des organismes exposés). La Figure 46 ne montre aucune influence de la 20-HE sur l'expression de la Vtg chez les femelles alors que cette protéine est sous exprimée en présence de MF dès 0,01 µg / L.

Ces expériences permettent de mettre en évidence que la 20-hydroxy ecdysone n'intervient pas (ou peu) dans l'expression de la Vtg alors que le farnesoate de méthyle a un effet néfaste sur la reproduction de *G.fossarum*. Le farnesoate de méthyle est donc un perturbateur endocrinien chez les femelles de l'espèce *G.fossarum*. Cependant, puisque le taux de Vtg varie naturellement chez les femelles, les études chez celles-ci nécessitent un tri exhaustif des femelles afin de déterminer leur stade de mue avant leur analyse. L'étude de ces substances a donc ensuite été réalisée chez les mâles. Un autre avantage dans les études chez les mâles réside dans le fait que de fortes augmentations d'expression de la Vtg peuvent être mises en évidence puisque le taux de Vtg de base est censé être très proche de zéro.

III.5.3) Modulation du taux de vitellogénine chez les mâles

Ce paragraphe va traiter de trois substances mises au contact de mâles. Les expositions ont également duré 21 jours à l'issue desquels les échantillons ont été broyés. Parmi ces trois substances, on retrouve les deux hormones précédentes. Comme pour les femelles, la 20-HE ne modifie pas l'expression de la Vtg chez les mâles. Les résultats obtenus avec la seconde hormone et avec un anticancéreux (la cyprotérone) sont présentés sur la figure suivante :

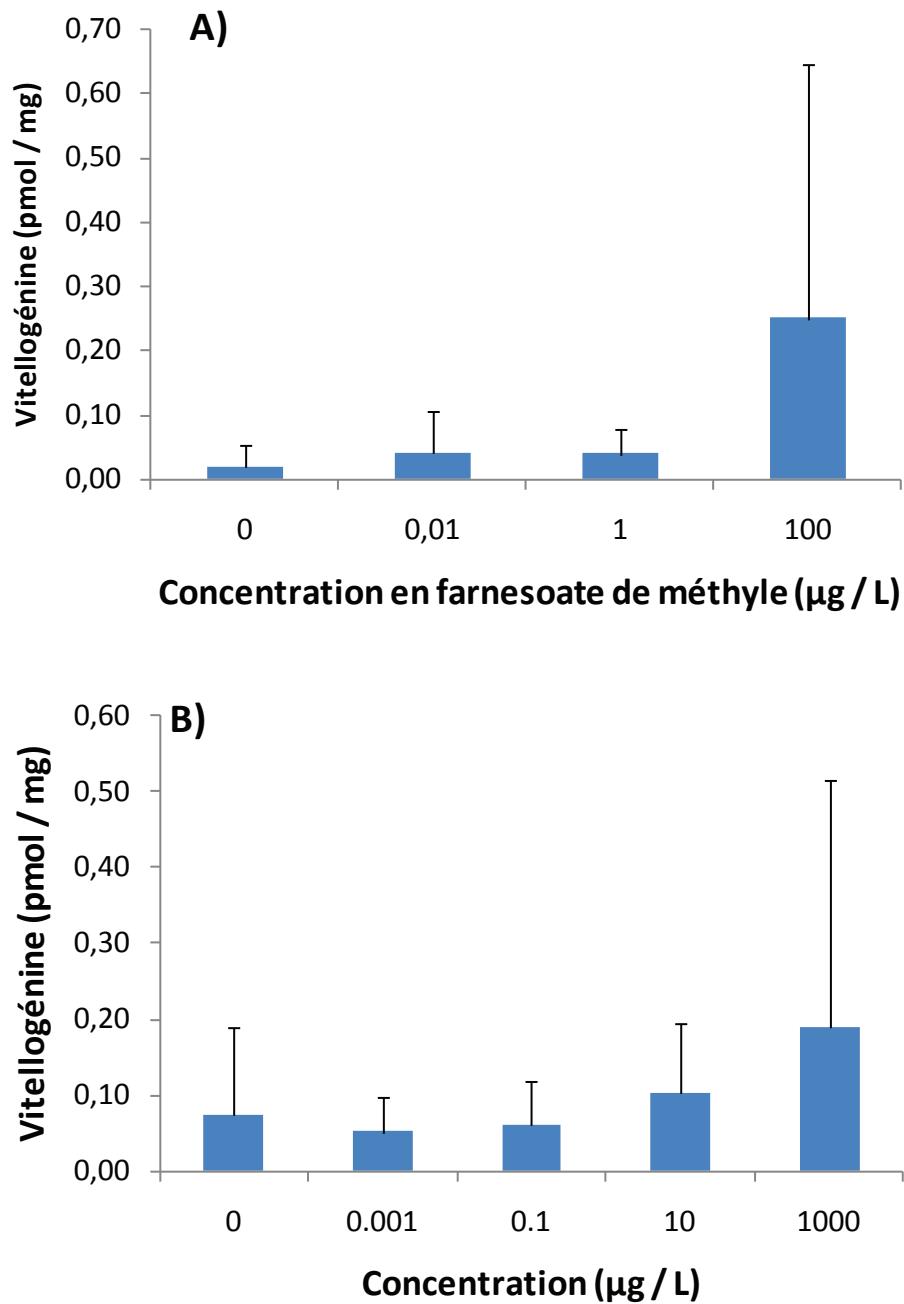


Figure 47 : Evolution de l'expression de la vitellogénine chez les mâles après exposition au farnesoate de méthyle (A) ou à la cyprotérone (B) (n=15).

A l'inverse des femelles, une forte augmentation du taux de Vtg est observée pour des concentrations en MF de 100 µg / L. Une hypothèse dans ces effets opposés serait que chez les mâles, le MF inhibe le rétrocontrôle négatif de la glande androgène sur la synthèse de la Vtg.

Comme pour le MF, l'exposition de mâles à la cyprotérone engendre une induction de l'expression de la Vtg. Evaluer l'impact de telles substances sur la reproduction des invertébrés est d'une importance primordiale afin d'anticiper une future extinction de ces espèces. Les données actuelles

de la littérature ne permettent pas d'interpréter le rôle de ces substances au sein des organismes exposés. Cependant, la mesure du taux de Vtg chez mâles permet d'affirmer que ces substances agissent sur l'expression de la Vtg.

Toutes les données précédentes ont été obtenues après exposition contrôlée des organismes en laboratoire. Puisque l'objectif ultime de la découverte de perturbateurs endocriniens est de doser l'effet d'un polluant sur la faune dans un milieu naturel, la méthode de dosage a ensuite été appliquée dans le but de suivre l'évolution du taux de Vtg chez des mâles prélevés dans plusieurs rivières.

III.5.4) Mesure du taux de vitellogénine chez les mâles sur différents sites de prélèvement

Cinq rivières ont été étudiées : la Cance, le Gier, l'Ardières, le Doux et l'Azergues. Pour chaque rivière, un prélèvement a été effectué quelques kilomètres avant qu'elle ne se jette dans un fleuve (Rhône ou Saône), c'est-à-dire en aval d'un site pollué. Un second prélèvement a été effectué beaucoup plus en amont. Les taux de Vtg mesurés sur chaque prélèvement sont représentés sur la Figure 48 :

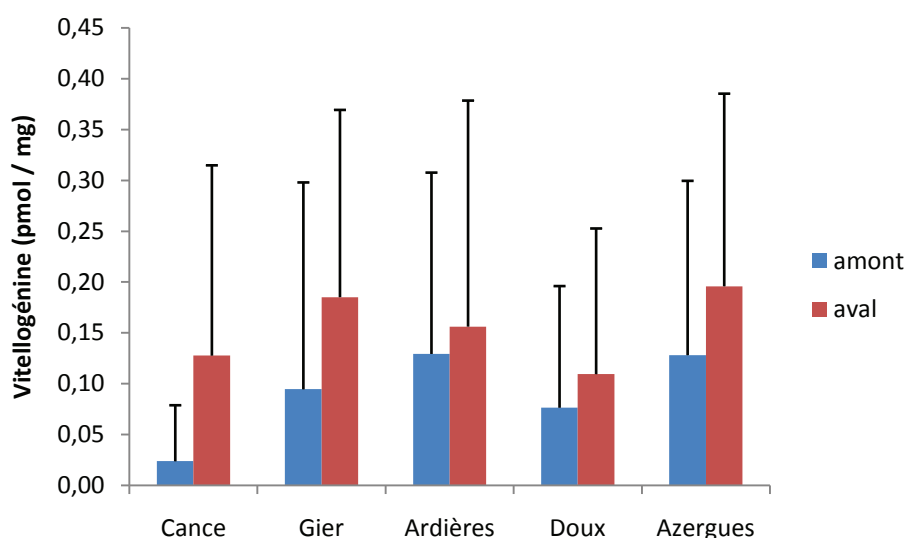


Figure 48 : Différence d'expression de la vitellogénine chez les mâles en amont ou en aval de sites pollués sur différentes rivières (n=15).

Les taux de Vtg sont également exprimés en pmol de protéine par mg d'organisme. Sur chaque site, quinze individus ont été prélevés et analysés. Cette figure montre clairement la grande variabilité biologique entre individus. Cependant, le taux moyen de Vtg est systématiquement plus élevé en aval des sites pollués qu'en amont. L'effet à long terme de cette surexpression n'est pas connu mais il pourrait conduire à une féminisation des mâles ce qui aboutirait à une extinction de l'espèce.

IV) Conclusion

Ce chapitre a présenté le développement d'une méthode de quantification absolue de la vitellogénine chez *Gammarus fossarum* par LC-MS/MS. Bien qu'une telle méthode soit généralement assez aisée à mettre en place chez l'homme (sous réserve que la protéine soit suffisamment concentrée), l'un des grands défis chez la plupart des invertébrés repose dans le fait que ces organismes ne sont pas séquencés. De ce fait, il est difficile de prédire des transitions SRM spécifiques de la protéine d'intérêt. Chez *G.fossarum*, un extrait de la séquence de Vtg a cependant été obtenu. Une méthode de quantification a ainsi pu être développée. Cette méthode est le premier outil permettant de doser de façon spécifique la Vtg chez cette espèce. D'une manière plus générale, il s'agit même de la première méthode de dosage de la Vtg chez un invertébré par LC-MS/MS. Ce nouvel outil a été développé assez rapidement et a pu être appliqué afin de :

- valider la fonction de la Vtg chez *G. fossarum*. En effet, aucune mesure directe de la Vtg n'avait permis de vérifier qu'il s'agissait bien de la protéine servant de réserve énergétique lors du développement embryonnaire chez cette espèce,
- moduler l'expression de la Vtg après exposition contrôlée des crustacées à divers composés dans le but de mieux comprendre la régulation de la vitellogenèse chez *G. fossarum*,
- mettre en évidence la pollution de certains sites par des perturbateurs endocriniens. Ceci présente également un fort intérêt puisque la mesure directe des polluants n'est pas toujours possible (le polluant peut être dégradé ou évacué par l'écoulement de l'eau).

Les premiers résultats obtenus permettent d'observer une sous-expression de la Vtg chez les femelles ou une sur-expression de cette protéine chez les mâles après exposition à diverses substances. Dans les deux cas, la variabilité entre les individus est telle qu'il est à ce jour difficile d'utiliser la Vtg à elle-seule comme un biomarqueur de perturbation endocrinienne chez *G.fossarum*. Les recherches doivent donc être poursuivies afin d'approfondir les connaissances sur la régulation de la Vtg chez *G.fossarum*. La méthode développée ici peut donc être appliquée dans la recherche de nouveaux perturbateurs endocriniens chez des espèces sentinelles peu étudiées mais primordiales dans les écosystèmes. En effet, les gammarus peuvent être exposés à de nombreuses molécules retrouvées en grande quantité dans l'environnement (estrogènes, pesticides, médicaments...) afin d'évaluer l'impact de ces molécules sur l'expression de la Vtg et donc sur la survie de cette espèce.

De nouvelles protéines pourraient également être étudiées afin de trouver un biomarqueur qui soit spécifique à chaque perturbateur ce qui permettrait d'une part de cibler le polluant et d'autre part de mieux comprendre les mécanismes mis en jeu dans l'expression de la Vtg chez *Gammarus fossarum* et d'une manière générale, chez les invertébrés.

Enfin, la même approche a été appliquée en collaboration avec l'Irstea afin de doser la Vtg chez de nombreux invertébrés. Ces travaux ont donné lieu à une publication dans *Environmental Science & Technology*²¹⁴. Ces résultats n'ont cependant pas été présentés dans ce manuscrit. Ce travail a été réalisé en plusieurs étapes. D'abord, des peptides protéotypiques de la Vtg ont été recherchés chez des invertébrés séquencés. Cette approche est également intéressante car elle permettrait de doser la Vtg simultanément dans plusieurs espèces ce qui permettrait un suivi plus généralisé de la faune.

Ensuite, les peptides détectés ont été recherchés chez des espèces non séquencées. Ceci permet d'ouvrir la porte à des dosages par LC-MS/MS de protéines pour lesquelles aucune séquence n'est disponible tout en s'affranchissant des étapes de purification de protéines préalables à un séquençage. Cette méthode repose sur le fait qu'une majorité du génome soit conservée entre deux espèces proches. Par conséquent, un certain nombre de peptides issus d'une protéine doivent être communs à deux espèces.

La quantification absolue de protéines par LC-MS/MS chez les invertébrés n'en est donc qu'à ses débuts mais ces premiers résultats ouvrent la voie à un rapide développement des connaissances chez ces espèces encore peu étudiées mais dont l'intérêt ne fait que s'accroître. En revanche, chez les vertébrés, de nombreux dosages ont déjà été mis au point comme nous l'avons vu lors du premier chapitre. Un exemple de dosage chez l'homme va donc être présenté dans le prochain chapitre en s'attachant plus particulièrement à la résolution d'un problème fréquemment rencontré lorsqu'un dosage veut être mis à la place : que faire des peptides contenant une méthionine ?

**Chapitre III : DOSAGE D'UNE PROTEINE PLASMATIQUE
HUMAINE VIA UN PEPTIDE CONTENANT UNE METHIONINE**

I) Introduction

Le chapitre précédent a permis d'illustrer la méthodologie générale mise en œuvre lorsqu'un dosage de protéine veut être développé par LC-MS/MS. Ce dosage a été réalisé chez un invertébré et nous allons maintenant voir un exemple de dosage d'une protéine présentant un fort intérêt chez l'homme dans le cadre du dépistage de la maladie d'Alzheimer.

La maladie d'Alzheimer est la forme la plus commune de démence. C'est une maladie neurodégénérative qui se caractérise par une diminution de la quantité de peptide amyloïd β 1-42 dans le liquide cébrospinal et par une formation de plaques amyloïdes dans le cerveau. De plus, une autre protéine (la protéine tau) qui est impliquée dans la stabilisation des neurones s'agrège anormalement dans le cerveau de patients atteints de la maladie d'Alzheimer. Ce comportement anormal est lié à une surphosphorylation de la protéine tau sur la thréonine en position 181. Cet état de phosphorylation peut d'ailleurs permettre de prédire le futur développement de la maladie d'Alzheimer sur des patients atteints de légers troubles cognitifs²¹⁵.

D'autres protéines comme l'apolipoprotéine E (Apo E) seraient impliquées dans la maladie d'Alzheimer. L'Apo E est une protéine de 36 kDa dont la séquence est présentée en annexe A. Elle permet notamment le transport des lipides dans le sang. Elle existe principalement sous trois isoformes : Apo E2, Apo E3 et Apo E4 codés respectivement par les allèles ϵ 2, ϵ 3 et ϵ 4. En fonction du génotype de l'individu, différents isoformes seront exprimés comme le montre le schéma suivant :

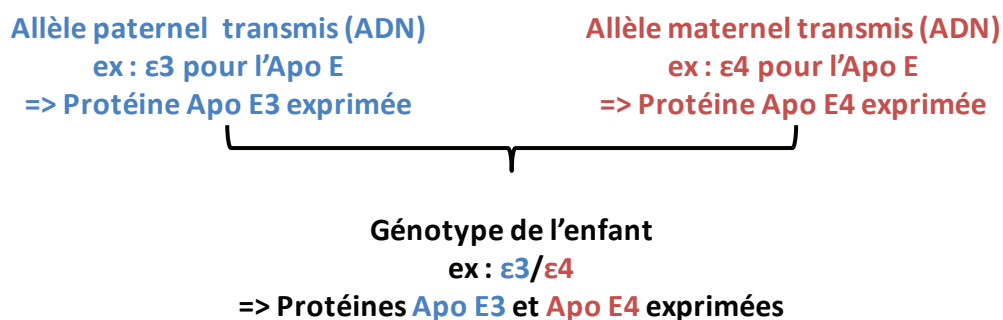


Figure 49 : Relation entre les allèles présents et les protéines exprimées dans le cas de l'apolipoprotéine E.

Puisqu'il existe trois allèles, il y aura donc six génotypes possibles (ϵ 2/ ϵ 2, ϵ 2/ ϵ 3, ϵ 2/ ϵ 4, ϵ 3/ ϵ 3, ϵ 3/ ϵ 4 et ϵ 4/ ϵ 4). Dans ce manuscrit, la désignation « Apo E » fera donc référence à l'apolipoprotéine E totale (par exemple, l'Apo E2 et l'Apo E3 dans le cas du génotype ϵ 2/ ϵ 3). La forme E3 est considérée comme étant la forme sauvage alors que les formes E2 et E4 sont les variants génétiques. La seule différence entre les formes E2 et E3 est le remplacement de l'arginine présente en position 158 sur la forme E3 par une cystéine sur la forme E2. De même, la seule différence entre les formes E3 et E4 consiste en la substitution de la cystéine en position 112 sur la forme E3 par une arginine²¹⁶. Des extraits de séquences correspondant à ces trois formes sont présentés sur la figure suivante :

Séquences d'acides aminés :

- Apo E2 : ... QAR LGADMEDV¹¹²**C**GR...ER LGPLVEQGR... QK ¹⁵⁸**C** LAVYQAGAR ...
- Apo E3 : ... QAR LGADMEDV¹¹²**C**GR... ER LGPLVEQGR... QK ¹⁵⁸**R** LAVYQAGAR ...
- Apo E4 : ... QAR LGADMEDV¹¹²**R**GR... ER LGPLVEQGR... QK ¹⁵⁸**R** LAVYQAGAR ...

Figure 50 : Séquences partielles des trois isoformes majoritaires de l'apolipoprotéine E.

La fréquence des allèles $\epsilon 2$, $\epsilon 3$ et $\epsilon 4$ est d'environ 7%, 78% et 15% respectivement. Cependant, la fréquence d'apparition de l'allèle $\epsilon 4$ dépend du débit métabolique (qui correspond à la vitesse d'utilisation des réserves énergétiques de l'organisme). Ce débit est plus faible dans les régions tempérées que dans les régions de températures extrêmes. Ainsi, la fréquence d'apparition de l'allèle $\epsilon 4$ est plus faible en France qu'autour de l'équateur ou dans le cercle polaire arctique²¹⁷.

De nombreuses études ont mis en évidence un lien entre la présence de l'allèle $\epsilon 4$ et la maladie d'Alzheimer. En effet, la présence de cet allèle multiplie le risque de développer la maladie d'Alzheimer par cinq ou dix si l'allèle est exprimé respectivement une fois ou deux²¹⁸⁻²¹⁹. En revanche la présence de l'Apo E2 serait plutôt protectrice envers la maladie²²⁰⁻²²¹. Le mécanisme d'action de l'Apo E dans la maladie d'Alzheimer n'est pas connu mais il semblerait que l'Apo E soit impliquée dans l'élimination des peptides amyloïdes β ^{216, 222}. De plus, l'Apo E4 semble être moins protectrice que l'Apo E3 envers l'apoptose des neurones²²³.

Plusieurs groupes ont quantifié l'Apo E. Ces dosages sont la plupart du temps réalisés par ELISA. En général, le génotype de l'individu est obtenu par PCR puis l'Apo E totale est quantifiée à partir d'un anticorps mono ou polyclonal²²⁴⁻²²⁵. Cependant, un anticorps spécifique de l'Apo E4 est disponible et peut également être utilisé en parallèle avec un anticorps permettant de doser l'Apo E totale²²⁶⁻²²⁸.

Puisque la maladie d'Alzheimer se caractérise par la formation de plaques dans le cerveau, l'Apo E a été dosée dans du tissu cérébral²²⁷ ou dans le liquide cébrospinal²²⁸⁻²²⁹. Le prélèvement de ce liquide se fait par une technique assez invasive : la ponction lombaire. C'est pourquoi l'Apo E a également été dosée à partir de plasma ou de sérum qui est une matrice plus facilement accessible. En ce qui concerne le lien entre le taux sanguin d'Apo E et la maladie d'Alzheimer, les résultats sont plutôt contradictoires. En effet, certains groupes trouvent que l'Apo E est sous exprimée chez les patients atteints de la maladie d'Alzheimer²³⁰⁻²³¹, d'autres ne trouvent aucune différence²³²⁻²³⁶ et un groupe trouve une surexpression de l'Apo E²³⁷.

Des dosages par LC-MS/MS ont également été proposés mais il n'y a pas eu d'étude réalisée sur des patients atteints de la maladie d'Alzheimer. Lorsqu'une digestion enzymatique de l'Apo E est réalisée par de la trypsine, on obtient entre autres les peptides de séquence LGADMEDVCGR et CLAVYQAGAR pour l'apolipoprotéine E2, les peptides LGADMEDVCGR et LAVYQAGAR pour l'apolipoprotéine E3 et les peptides LGADMEDVR et LAVYQAGAR pour l'apolipoprotéine E4 (cf. Figure 50). Tous les autres peptides sont communs aux trois isoformes. Le seul peptide spécifique de l'apolipoprotéine E2 a donc pour séquence CLAVYQAGAR. De même, le seul peptide spécifique de l'apolipoprotéine E4 a pour séquence LGADMEDVR. Tous les autres peptides (à l'exception des peptides LGADMEDVCGR et

LAVYQAGAR qui sont partagés par seulement deux isoformes) peuvent donc être choisis pour doser simultanément les trois isoformes de l'Apo E.

Ainsi, les groupes de Zhang et Borchers ont quantifié l'Apo E totale à partir de sérum ou plasma humain en utilisant un peptide rapporteur commun aux trois isoformes²³⁸⁻²³⁹ (peptide de séquence SWFEPLVEDMQR pour Zhang et LGPLVEQGR pour Borchers). L'Apo E a également été quantifiée dans du plasma de souris exprimant le gène de l'Apo E humaine²²⁰. Dans cette étude, trois peptides ont été suivis : WVQTLSEQVQEELLSSQVTQELR, SELEEQLTPVAEETR et SELEEQLTPVAEETR. Enfin, Wildsmith *et al.*²⁴⁰ ont quantifié de manière spécifique l'Apo E2 et l'Apo E4 sans réaliser de génotypage préalable. Cette quantification a été réalisée à partir d'astrocytes issus de souris exprimant les Apo E2 et E4. Cette approche est permise par la quantification du peptide spécifique de chaque isoforme obtenu après digestion par de la trypsine.

En revanche, à ce jour, aucune quantification absolue et spécifique de l'apolipoprotéine E4 n'a été réalisée dans du sérum ou du plasma humain par LC-MS/MS chez des patients atteints de la maladie d'Alzheimer. Dans ce contexte, nous avons proposé de mettre en place un dosage spécifique de cet isoforme dans une cohorte de 672 échantillons issus de patients atteints de la maladie d'Alzheimer et de témoins. L'objectif de cette étude est d'apporter un élément de réponse complémentaire aux travaux précédents réalisés par ELISA et pour lesquels les résultats sont contradictoires.

Cependant, le seul peptide spécifique de l'Apo E4 a pour séquence LGADMEDVR et contient donc une méthionine. Or, comme nous l'avons vu dans le premier chapitre, les peptides contenant une méthionine ne sont pas de bons peptides protéotypiques et doivent être évités pour la quantification des protéines puisque ces méthionines peuvent être naturellement oxydées en méthionine sulfoxyde au sein de l'organisme ou lors de la préparation de l'échantillon. Cette modification est plus accentuée avec l'âge du sujet et est d'ailleurs un marqueur de vieillissement²⁴¹. L'oxydation des méthionines génère donc un incrément de masse de 16 Daltons sur le peptide ce qui engendre une erreur lors de la quantification de ces peptides puisque la fraction oxydée n'est pas détectée en SRM. De plus, l'oxydation des méthionines pouvant se produire également de façon non maîtrisée lors de la préparation des échantillons, l'erreur commise lors de la quantification n'est pas forcément répétable. Ce problème potentiel est généralement passé sous silence comme lors de l'étude citée précédemment sur la quantification de l'Apo E4 dans des astrocytes²⁴⁰ ou dans celle du groupe de Zhang²⁴².

Cette propriété d'oxydation des méthionines peut cependant être un avantage et a été largement exploitée par le groupe de Joël Vandekerckhove afin de détecter spécifiquement les peptides contenant une méthionine. Dans cette approche nommée COFRADICTM (COMbined FRActional Dlagonal Chromatography), les peptides sont séparés par chromatographie liquide et l'éluat est collecté par fractions d'une minute. Chaque fraction est ensuite oxydée en présence d'eau oxygénée (ce qui a pour effet de transformer les méthionines en méthionine sulfoxyde) et analysée une nouvelle fois par chromatographie liquide en gardant les mêmes conditions. Si une méthionine est présente dans l'un des peptides, son oxydation va engendrer un changement dans son temps de rétention et le peptide sera alors récupéré afin d'être identifié par spectrométrie de masse²⁴³. Cette approche permet de cibler spécifiquement les peptides contenant une méthionine et permet de fortement simplifier la matrice. Par exemple, leur étude montre que si une fraction est recueillie

entre la 59^{ème} et la 60^{ème} minute puis est oxydée, les peptides contenant une méthionine seront ensuite élués vers la 55^{ème} minute lors de la seconde injection. Ainsi, les molécules éluées vers la 55^{ème} minute lors de la première injection ne seront plus présentes lors de la seconde injection ce qui va permettre une identification plus aisée des peptides à méthionine grâce à un effet matrice fortement réduit. Dans cet exemple, les méthionines ont été oxydées une fois. Il a cependant déjà été reporté que l'utilisation de peroxyde d'hydrogène pouvait aussi oxyder les méthionines deux fois pour former des méthionines sulfones²⁴⁴.

Bien que les peptides contenant au moins une méthionine ne soient pas recommandés lors du choix des peptides protéotypiques de la protéine pour la quantification absolue de protéine par la stratégie AQUA, les éliminer systématiquement peut conduire à se passer d'un peptide rapporteur qui pourrait être le plus sensible. De ce fait, éliminer les peptides à méthionine peut engendrer une diminution de la sensibilité du dosage. En effet, d'après la base de données Peptide Atlas (mise à jour en mai 2010)²⁴⁵, 625 protéines plasmatiques ont été détectées par un seul peptide après digestion enzymatique. Sur ces 625 peptides, 109 contiennent au moins une méthionine, soit 17% des candidats. Si ces 109 peptides sont les seuls ayant été observés, il est donc probable qu'ils constituent les peptides générant le meilleur signal en électrospray. De même, si le seul peptide protéotypique d'un isoforme contient une méthionine, ce qui est le cas pour l'apolipoprotéine E4, il faut s'affranchir de ce problème d'oxydation non contrôlée. Pour cela, une oxydation irréversible et totale de la méthionine est proposée.

II) Matériel et méthodes

II.1) Réactifs

L'acétonitrile, le méthanol et l'eau (qualité LC-MS) proviennent de Fisher Scientific (Strasbourg, France). Le dithiothéitol (DTT), l'iodoacétamide (IAM), l'acide formique (qualité LC-MS), le peroxyde d'hydrogène, le phénol, la trypsine (type IX-S de pancréas porcin) et l'urée viennent de Sigma-Aldrich (St Quentin-Fallavier, France). Les quatre peptides synthétiques (de séquence LGADMEDV*R, LGADMEDV*CGR, CLAV*YQAGAR et LGPLV*EQGR) proviennent de Millegen (Labège, France). Ces peptides présentent un marquage sur la valine (¹³C₅ ¹⁵N₁). Les deux peptides de séquence LGADMEDVR et LGPLVEQGR sont également disponibles sans marquage. Les cartouches d'extraction sur phase solide de type Oasis® HLB 3 cc (60 mg) proviennent de Waters (Milford, MA, USA). Le sérum utilisé est issu de l'Etablissement Français du Sang alors que les différents plasmas ont été récoltés par l'Institut Pasteur de Lille dans des tubes contenant de l'acide éthylène diamine tétra-acétique (EDTA) comme anti coagulant. Enfin, le kit ELISA permettant de doser l'Apo E et l'Apo E4 provient de MBL International (Woburn, MA, USA). Ce kit comprend une plaque 96 puits greffée par des anticorps dirigés contre l'Apo E, du solvant de dilution, une solution de lavage, des anticorps greffés par une enzyme et dirigés contre l'Apo E, d'autres contre l'Apo E4, le substrat de cette enzyme, une solution permettant d'arrêter la réaction enzymatique et les protéines Apo E4 (1 µg) et Apo E (2 µg) lyophilisées.

II.2) Préparation des échantillons

II.2.1) Digestion enzymatique

100 μ L d'échantillon (plasma ou sérum) sont dénaturés dans de l'urée 6 M et 15 mM de DTT pendant 40 min à 60°C. Les échantillons sont ensuite alkylés pendant 40 min à température ambiante et dans le noir par de l'IAM 35 mM. L'échantillon est ensuite dilué par cinq dans du bicarbonate d'ammonium 50 mM à pH 8. 20 μ g de trypsine sont alors ajoutés et la digestion se déroule pendant 16 h à 37°C. La digestion est arrêtée par l'ajout d'acide formique afin d'obtenir une concentration finale de 0,5% (v / v). 100 μ L d'étalons sont alors ajoutés de façon à obtenir une concentration de 37,1 μ g / mL pour l'Apo E et 61,2 μ g / mL pour l'Apo E4.

II.2.2) Oxydation de la méthionine

Le réactif final d'oxydation est de l'acide performique obtenu en dissolvant 25 mg de phénol dans 4,5 mL d'acide formique et 0,5 mL de peroxyde d'hydrogène. La solution est agitée pendant 30 min à température ambiante puis 1,25 mL de ce mélange sont ajoutés au plasma digéré. La réaction d'oxydation se déroule alors pendant 24 h à 0°C. Les analytes sont ensuite extraits sur phase solide.

II.2.3) Extraction des peptides

Les échantillons sont extraits sur des cartouches de type Oasis® HLB 3 cc (60 mg). Les cartouches sont d'abord conditionnées par 1 mL de méthanol puis 1 mL d'eau contenant 0,5% d'acide formique. L'ensemble des 100 μ L de plasma digéré et oxydé est alors déposé. Puis la cartouche est lavée par 1 mL de mélange H₂O / MeOH (95 / 5, v / v) contenant 0,5 % d'acide formique et l'élution est réalisée par ajout de 1 mL de méthanol contenant 0,5 % d'acide formique. L'éluat est alors évaporé à sec et repris dans 100 μ L d'eau contenant 0,5 % d'acide formique.

II.3) Analyse LC-MS/MS

L'analyse a été réalisée sur un système chromatographique HP 1290 series (Agilent Technologies, Waldbronn, Germany) constitué d'un passeur d'échantillons et d'une pompe binaire. 10 μ L d'échantillon sont injectés et séparés sur une colonne Symmetry C₁₈ de dimensions 2,1 x 100 mm, avec des tailles de particules de 3,5 μ m provenant de Waters (Milford, MA, USA). Si rien n'est précisé, l'élution est réalisée à un débit de 300 μ L / min selon le gradient suivant : un plateau de 3 min à 5% de solvant B (ACN + 0,1% FA) suivi d'un gradient de 5 à 16% de B en 8 minutes puis d'un

lavage de la colonne à 100% de B pendant 4 minutes. Enfin, la colonne est rééquilibrée par 95% de solvant A (H₂O + 0,1% FA) pendant 4 minutes. L'éluat est ensuite détecté par un spectromètre de masse hybride (triple quadripôle / piège à ions linéaire) : le 5500 QTRAP® (AB Sciex, Foster City, CA, USA) équipé d'une source Turbo V™. Le contrôle de la LC-MS/MS et l'acquisition des données sont réalisés via le logiciel Analyst 1.5.1. Les données sont retraitées avec le logiciel Multiquant 2.0 (AB Sciex, Foster City, CA, USA). Le spectromètre de masse a été calibré par du polypropylène glycol, de la réserpine et de l'« Agilent Tuning Mix » (provenant tous les trois d'AB Sciex, Foster City, CA, USA) selon les instructions du constructeur. La résolution en Q1 et en Q3, mesurée par la largeur des pics à mi-hauteur a été ajustée à $0,7 \pm 0,1$ a.m.u (unité de masse atomique). Cette valeur est considérée comme étant la résolution unitaire. Le mode positif a été retenu pour l'ionisation sous une tension de spray d'ions de 5500 V. Les pressions de gaz rideau et de nébulisation sont de 50 psi. Dans les deux cas, le gaz utilisé est de l'azote. La source est chauffée à 600°C, la pression du gaz auxiliaire (azote également) est également de 50 psi et celle du gaz de collision est fixée à 9 psi.

II.4) Préparation des standards et des contrôles de qualité

II.4.1) Gammes de peptides

II.4.1.1) Dans l'eau

Une solution mère de chaque peptide à 200 µg / mL a été réalisée à partir de chaque peptide disponible. La solution mère a été diluée successivement dans de l'eau contenant 0,5% d'acide formique de façon à obtenir des concentrations en protéine de 0,5 ; 1 ; 5 ; 10 ; 50 et 100 µg / mL pour les étalons (correspondant à des concentrations peptidiques environ trente-sept fois inférieures *i.e.* à des concentrations allant de 0,014 à 2,8 µg / mL de peptide LGPLVEQGR ou LGADMEDVR) et de 0,75 ; 20 et 75 µg / mL pour les contrôles qualité (QC) (correspondant à des concentrations de 0,020 ; 0,54 et 2,0 µg / mL de peptide). Des gammes contenant en mélange les peptides LGADMEDVR, LGADMEDV*R, LGPLVEQGR et LGPLV*EQGR dans 200 µL de solution ont ainsi été préparées. Ensuite, 60 µL d'acide performique contenant du phénol ont été ajoutés. Les deux gammes ont été maintenues à 0°C puis analysées après 24h de réaction.

II.4.1.2) Dans du plasma

10 plasmas ont été digérés selon le protocole du paragraphe II.2.1). 100 µL de peptide LGPLV*EQGR ont été ajoutés de façon à obtenir les mêmes concentrations en protéine que précédemment : 0,5 ; 1 ; 5 ; 10 ; 50 et 100 µg / mL pour les étalons et 0,75 ; 20 et 75 µg / mL pour les QC. Un point à 0 µg / mL a été obtenu par ajout de 100 µL d'eau acidifiée. Ensuite, l'oxydation des échantillons a été réalisée selon le protocole décrit au paragraphe II.2.2) puis chaque plasma a été extrait sur phase solide selon le protocole décrit au paragraphe II.2.3).

II.4.2) Gammes de plasma

Des gammes de plasma $\epsilon 4/\epsilon 4$ dans du plasma $\epsilon 3/\epsilon 3$ ont également été réalisées. Deux plasma ont alors été utilisés : un plasma $\epsilon 4/\epsilon 4$ de concentration en Apo E mesurée à 46,6 $\mu\text{g} / \text{mL}$ (soit une concentration peptidique de 1,25 $\mu\text{g} / \text{mL}$) et un plasma $\epsilon 3/\epsilon 3$ de concentration en Apo E mesurée à 43 $\mu\text{g} / \text{mL}$ (soit une concentration peptidique de 1,15 $\mu\text{g} / \text{mL}$). Les concentrations estimées en apolipoprotéine E4 sont alors de 0 ; 6,66 ; 13,3 ; 20,0 ; 26,6 ; 33,3 et 46,6 $\mu\text{g} / \text{mL}$ pour les étalons et de 7,99 ; 24,0 et 39,9 $\mu\text{g} / \text{mL}$ pour les QC. Après mélange des deux plasmas, chaque échantillon (volume initial = 100 μL) est digéré comme décrit précédemment. Ensuite, 100 μL d'étalons sont alors ajoutés de façon à obtenir une concentration de 37,1 $\mu\text{g} / \text{mL}$ pour l'Apo E et 61,2 $\mu\text{g} / \text{mL}$ pour l'Apo E4. Enfin, chaque échantillon est oxydé puis extrait sur phase solide selon les protocoles des paragraphes II.2.2) et II.2.3).

II.5) Mise en place d'un échantillon de référence

200 μL de plasma ont été prélevés à partir de 40 tubes issus de patients atteints de la maladie d'Alzheimer et ont été rassemblés afin de constituer un mélange de référence. Parmi ces 40 individus, un patient possède le génotype $\epsilon 2/\epsilon 3$, un autre est $\epsilon 2/\epsilon 4$, quinze sont $\epsilon 3/\epsilon 3$, quinze sont $\epsilon 3/\epsilon 4$, cinq sont $\epsilon 4/\epsilon 4$ et trois sont inconnus (deux ne possèdent pas l'allèle $\epsilon 4$ et le troisième en possède un). Lors de chaque dosage des échantillons inconnus, 3 tubes de 100 μL de cet échantillon de référence sont préparés selon le protocole du paragraphe II.2).

II.6) Dosage par ELISA

Une gamme d'Apo E et d'Apo E4 a été réalisée selon les instructions du fournisseur par reconstitution des protéines lyophilisées dans 100 μL d'eau afin d'obtenir une concentration de 10 $\mu\text{g} / \text{mL}$ d'Apo E4 et de 20 $\mu\text{g} / \text{mL}$ d'Apo E. Cette solution a été diluée par dix puis plusieurs fois par deux dans la solution de dilution fournie avec le kit afin d'obtenir les concentrations de 1000 ; 500 ; 250 ; 125 ; 62,5 ; 31,25 et 15,625 ng / mL pour l'Apo E4 et de 2000 ; 1000 ; 500 ; 250 ; 125 ; 62,5 ; 31,25 ng / mL pour l'Apo E. Un point à 0 ng / mL a été réalisé en prenant seulement le solvant de dilution.

Le plasma (échantillon de référence préparé au paragraphe précédent et neuf échantillons inconnus) a été dilué successivement par 20 puis par 30 dans le solvant de dilution du kit. 100 μL de cette solution de plasma dilué (ou 100 μL d'étalon) ont été déposés dans chaque puits et la plaque a été incubée pendant 60 minutes à température ambiante. Ensuite, chaque puits a été aspiré et lavé cinq fois avec 300 μL de solution de lavage par un laveur de microplaques à bandes (modèle ELx50 de Biotek Instrument, Colmar, France). 100 μL de solution d'anticorps (anti Apo E ou anti Apo E4) ont

ensuite été déposés dans chaque puits. La plaque a été à nouveau incubée pendant 60 minutes à température ambiante puis lavée par cinq fois 300 µL de solution de lavage. 100 µL de substrat de l'enzyme ont alors été ajoutés et la réaction s'est déroulée pendant 30 minutes à température ambiante. Enfin, 100 µL de solution d'arrêt ont été ajoutés et l'absorbance a été lue par un lecteur de plaques Opsys MR de Dynex Technologies (Chantilly, VA, USA) à 620 nm pour déterminer le bruit et à 450 nm pour déterminer la concentration d'Apo E et d'Apo E4.

III) Résultats et discussion

III.1) Sélection des transitions SRM spécifiques à l'Apolipoprotéine E totale et à l'Apolipoprotéine E4

L'Apolipoprotéine E (Apo E) est une protéine de 36 kDa dont la digestion par la trypsine génère potentiellement 48 peptides (*cf.* annexe A pour la liste complète de ces peptides). L'apolipoprotéine E étant une protéine assez concentrée (plusieurs dizaines de µg / mL dans le plasma), plusieurs équipes ont déjà recherché les peptides protéotypiques donnant la meilleure réponse en masse ce qui facilite considérablement le choix du peptide rapporteur^{20, 81, 239}. Ainsi, le peptide de séquence LGPLVEQGR est ressorti comme étant un très bon candidat pour la quantification de l'Apo E totale par LC-MS/MS et a donc été réutilisé ici. Quant à l'Apo E4, le choix est encore plus rapide puisqu'un seul peptide est spécifique comme le montre la Figure 50 page 136. Ce peptide a pour séquence LGADMEDVR. Les transitions SRM ont été choisies après optimisation par infusion des peptides synthétiques. Sauf indication contraire, les transitions suivantes ont été utilisées par la suite :

Tableau 9 : Liste des transitions SRM utilisées pour les peptides protéotypiques de l'Apolipoprotéine E totale et de l'Apolipoprotéine E4.

Q1	Q3	Fragment	Peptide
484,8	701,4	y6	LGPLVEQGR
484,8	588,3	y5	
484,8	489,2	y4	
487,8	707,4	y6	
487,8	594,3	y5	LGPLV*EQGR
487,8	489,2	y4	
503,3	389,3	y3	LGADMEDVR
503,3	518,3	y4	
506,3	395,3	y3	LGADMEDV*R
506,3	524,3	y4	
511,3	908,4	y8	LGADM(ox)EDVR
511,3	844,4	y8-64	
514,3	914,4	y8	LGADM(ox)EDV*R
514,3	850,4	y8-64	

Dans ce tableau, le peptide protéotypique de l'Apo E4 oxydé sur la méthionine est noté LGADM(ox)EDVR. Bien que l'oxydation des méthionines soit décrite comme un phénomène fréquent, nous avons d'abord voulu évaluer l'étendue de cette oxydation aussi bien sur les peptides synthétiques que sur les peptides endogènes.

III.2) Mise en évidence de l'oxydation naturelle de la méthionine

Dans un premier temps, les peptides synthétiques ont été étudiés. Pour illustrer la rapidité de l'oxydation, une solution de peptide LGADMEDVR à 1 µg / mL fraîchement préparée dans de l'eau contenant 5% d'acétonitrile et 0,5% d'acide formique a été analysée. Cette composition de solvant et cette concentration peptidique de 1 µg / mL correspondent à celles qui ont été utilisées lors du stockage des étalons marqués pour les dosages présentés ultérieurement. Immédiatement après injection, la solution a été stockée à – 20°C jusqu'au lendemain où elle a été réinjectée dans les mêmes conditions. Les résultats obtenus sont présentés sur la Figure 51 :

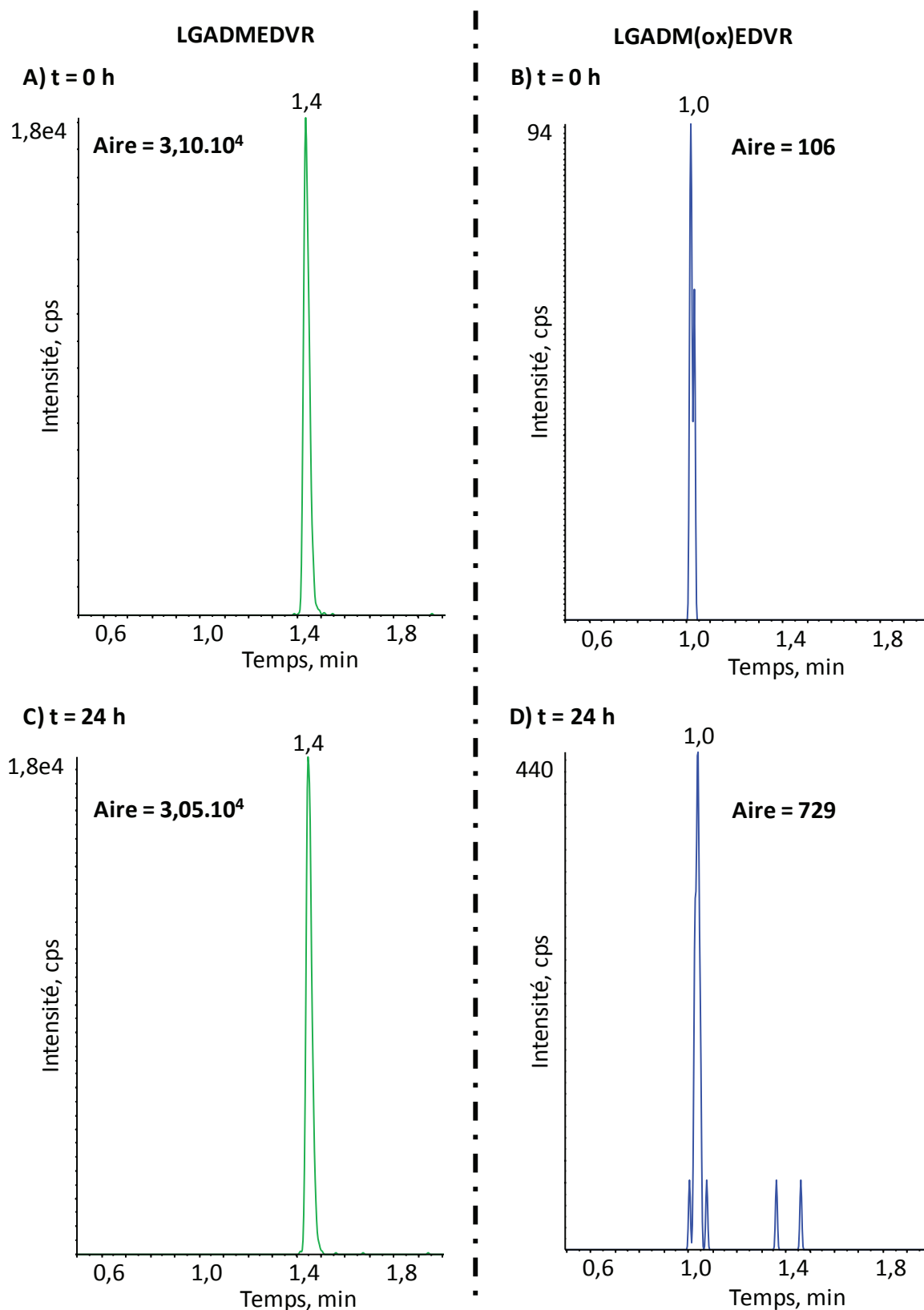


Figure 51 : Chromatogrammes reconstruits du peptide synthétique de séquence LGADMEDVR non oxydé (A, C) et oxydé (B, D). La séparation a été réalisée sur une colonne Zorbax Eclipse plus C₁₈ d'Agilent Technologies (Waldbronn, Allemagne) ayant des particules de 1,8 µm et de dimension 2,1 x 50 mm. L'élution a été réalisée à 600 µL / min avec un gradient linéaire de 5 à 20% d'ACN contenant 0,1% d'acide formique en 1,5 min.

Le premier jour (soit environ une heure après la mise en solution du peptide), l'aire de la forme non oxydée est de $3,10 \cdot 10^4$ (cf. Figure 51 A) et celle de la forme mono oxydée est de 106 (cf. Figure 51 B). La forme mono oxydée est donc négligeable puisqu'elle représente 0,34% de la forme non oxydée. Après 24h de congélation, l'aire de l'espèce non oxydée est de $3,05 \cdot 10^4$ (cf. Figure 51 C). En revanche l'espèce mono oxydée est sept fois plus abondante puisque son aire vaut 729 (cf. Figure 51 D). Le peptide mono oxydé reste très faible par rapport au non oxydé mais commence à devenir non négligeable. En effet, il représente environ 2,4% du peptide non oxydé. Ces pourcentages illustrent seulement que ce peptide peut s'oxyder et que cette oxydation se produit rapidement. Ils ne représentent pas la fraction réelle de peptide oxydé puisque les valeurs présentées correspondent aux rapports d'aires des deux transitions SRM de la Figure 51 et que le facteur de réponse de ces deux formes n'est très probablement pas le même.

Puisque la solution contenant le peptide est un mélange d'eau et d'acide formique, une autre expérience a été réalisée afin d'étudier l'influence de cet acide sur la quantité de peptide oxydé. Deux pesées de peptide ont donc été effectuées et le volume de solvant a été ajusté de façon à obtenir des concentrations peptidiques identiques dans les deux solutions. La première a été solubilisée et diluée dans 0,5% d'acide formique alors que la seconde a subi les mêmes dilutions mais sans acide formique. Ces deux échantillons ont été injectés trois fois chacun immédiatement après la dernière dilution. Le ratio de la forme mono oxydée sur la forme non oxydée est de 0,41% (CV = 31%) en présence d'acide formique et de 0,72 % (CV = 57%) sans acide. Les coefficients de variations aussi élevés sont liés au fait que le signal de la forme mono oxydée est très faible et donc peu répétable. Il faut noter que ce signal n'augmente pas d'une injection à l'autre ce qui traduirait une oxydation de l'échantillon entre deux injections. Après analyse, les échantillons ont été congelés à -20°C jusqu'au lendemain où ils ont été réinjectés dans les mêmes conditions. Dans ce cas, le ratio de la forme mono oxydée sur la forme non oxydée est de 2,1% en présence d'acide formique (CV = 13%) et de 1,4% sans acide (CV = 12%). On peut remarquer que cette oxydation du peptide de synthèse semble répétable puisque les ratios des aires des transitions SRM en présence d'acide formique avant et après décongélation sont du même ordre de grandeur que ceux obtenus la première fois (0,41% dans cette expérience et 0,34% dans la première expérience (cf. Figure 51) avant congélation ; 2,1 et 2,4% respectivement dans la seconde et dans la première expérience après décongélation). Avec ou sans acide formique dans la solution de stockage, la proportion de la forme mono oxydée a augmenté après décongélation des solutions. Cette augmentation est plus importante lorsque la solution contient de l'acide formique. Une solution pour limiter l'oxydation des étalons serait donc de les stocker dans un solvant ne contenant pas d'acide. Ceci permettrait seulement de limiter l'oxydation mais ne l'empêcherait pas puisque même sans acide, la quantité de peptide oxydé a augmenté. Cette oxydation est donc également engendrée par une autre molécule que l'acide formique. Le dioxygène dissout naturellement dans les solvants pourrait en être la cause. Afin de vérifier cette hypothèse, il faudrait par exemple stocker toutes les solutions en remplaçant l'air des tubes par de l'azote ou de l'argon. Ceci n'empêchera cependant pas l'oxydation du peptide issu de l'Apo E4 endogène.

Quelle qu'en soit la raison, cette oxydation des peptides synthétiques peut être évitée en préparant pour chaque analyse une solution fraîche d'étalons mais le coût de l'analyse serait alors beaucoup plus élevé.

Puisque les méthionines s'oxydent sur le peptide de synthèse et que cette oxydation intervient assez rapidement, nous avons donc cherché à évaluer l'étendue de l'oxydation de cette méthionine dans le plasma sur le peptide issu de l'Apo E4 endogène. En effet, une oxydation variable pourrait être rencontrée suite à des temps de préparation des plasmas (collecte, centrifugation et congélation) variables d'un individu à l'autre si le protocole de collecte n'est pas uniforme et parfaitement contrôlé.

Pour illustrer l'oxydation naturelle du peptide endogène, huit plasmas ont été digérés et analysés sans ajouter le réactif d'oxydation. Les chromatogrammes obtenus sont présentés sur la Figure 52 :

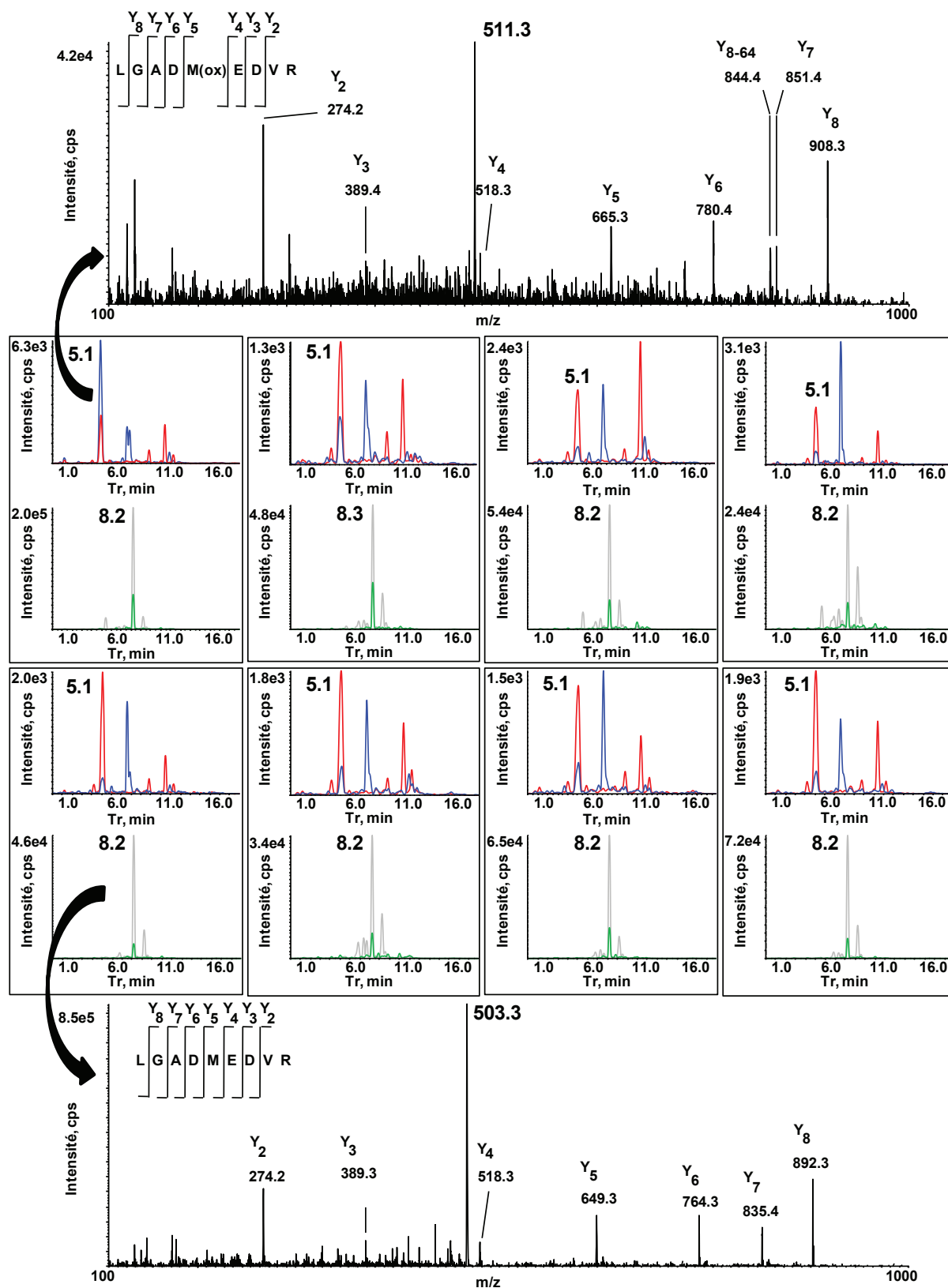


Figure 52 : Chromatogrammes reconstruits des formes non oxydées (endogène en vert, étalon en gris) et mono oxydées (endogène en bleu et étalon en rouge) du peptide séquence LGADMEDVR issu de plasma $\epsilon 3/\epsilon 4$ avec les spectres MS² correspondants (spectre de la forme mono oxydée endogène en haut et de la non oxydée en bas).

Sur chaque chromatogramme, une seule transition SRM par espèce (peptide endogène et étalon marqué, avec zéro ou une oxydation) est représentée. Le temps de rétention de la forme non oxydée est de 8,2 min. Afin de confirmer la présence de ce peptide, un spectre de fragmentation de l'ion précurseur doublement chargé ($m/z = 503,3$) a été réalisé (en bas de la Figure 52). Toute la série d'ions y est identifiée sans ambiguïté ce qui confirme la présence du peptide non oxydé. De même, le peptide mono oxydé est élué à 5,1min et son spectre de fragmentation ($m/z = 511,3$ pour le précurseur doublement chargé) est présenté en haut de la Figure 52. Le peptide étant assez faiblement concentré, les ions caractéristiques du peptide mono oxydé sont peu intenses mais permettent tout de même d'identifier le peptide. De plus, les rapports d'intensité entre les fragments sont similaires ce qui laisse supposer que la présence d'un atome d'oxygène sur la chaîne latérale de la méthionine ne va pas modifier la probabilité du proton mobile à venir au niveau de la liaison peptidique pour induire la fragmentation du peptide. Ainsi, la probabilité d'obtenir le fragment y_8 est la même sur le peptide non oxydé que sur le mono oxydé. En revanche, une perte de la chaîne latérale de la méthionine est observée ce qui génère des fragments y avec une perte de 64 Da. C'est le cas de l'ion à $m/z = 844,4$ qui est le fragment y_8 ayant perdu la chaîne latérale de la méthionine.

Au total, 68s plasma $\epsilon 3/\epsilon 4$ ont été analysés (27 issus d'individus témoins et 41 issus de patients atteints de la maladie d'Alzheimer) dans le but de déterminer l'étendue de l'oxydation naturelle du peptide LGADMEDVR, protéotypique de l'Apo E4. Les résultats obtenus sont présentés sur la Figure 53 :

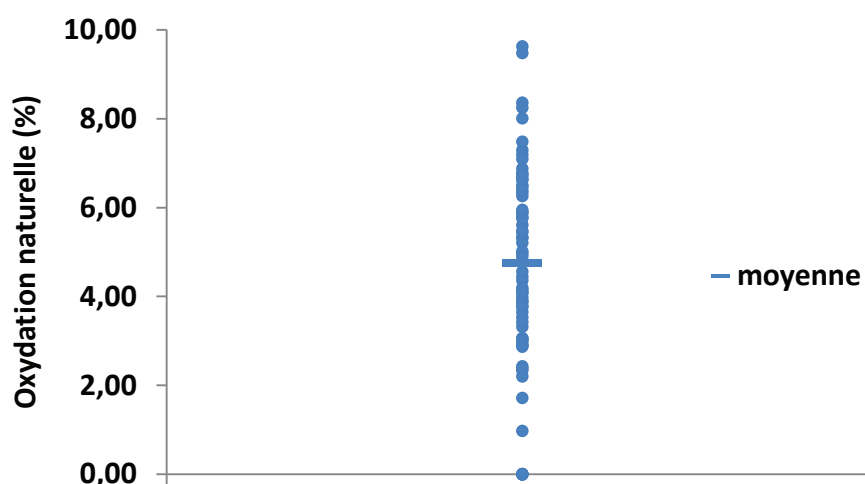


Figure 53 : Oxydation naturelle du peptide protéotypique de l'apolipoprotéine E4 dans le plasma (n = 68).

Les valeurs données dans la Figure 53 correspondent au rapport entre l'aire de la transition SRM 511,3 / 908,4 (fragment y_8 du peptide mono oxydé) sur l'aire de la transition SRM 503,3 / 892,4 (fragment y_8 du peptide non oxydé) et sont exprimées en pourcentages. Cette représentation part du principe que le facteur de réponse entre la forme non oxydée et la forme mono oxydée est le même, c'est-à-dire que le rendement d'ionisation en tenant compte de l'effet matrice soit le même ce qui n'est très certainement pas le cas puisque les temps de rétention de ces deux formes sont différents ($t_r = 5,1$ min pour la forme oxydée et $t_r = 8,2$ min pour la forme non oxydée). Elle suppose également

que l'efficacité de fragmentation des deux espèces soit la même. La valeur numérique donnée n'est donc très probablement pas exacte mais il est certain que cette valeur est différente de zéro. De plus, elle illustre l'hétérogénéité de l'oxydation naturelle qui peut être rencontrée dans différents plasmas. En effet, l'oxydation varie de 0 à 10% avec une moyenne de 4,8%. Cette hétérogénéité est donc une source d'erreur lors d'un dosage éventuel de ce peptide et donc de la protéine.

Cette oxydation peut être présente dans le plasma de départ (soit *in vivo*, soit lors de sa collecte ou de sa conservation) mais peut également être provoquée lors de la préparation de l'échantillon. Afin de vérifier l'impact de la préparation (dénaturation, digestion enzymatique et extraction), du plasma a été digéré de façon classique ou en présence d'un mélange anti-oxydant. Ce mélange est composé de 10 mM d'ascorbate de sodium et de 10 mM de tris(2-carboxyethyl)phosphine (TCEP) et a été précédemment utilisé afin de stabiliser une solution contenant de la méthionine²⁴⁶. Trois conditions ont été testées : (i) conditions habituelles (digestion enzymatique, ajout des étalons et extraction), (ii) digestion du plasma en présence des étalons marqués et (iii) digestion du plasma en présence des étalons et de l'anti-oxydant. Pour chaque condition, trois échantillons ont été préparés. Dans un premier temps, nous avons d'abord voulu vérifier si les taux mesurés d'Apo E totale et d'Apo E4 étaient les mêmes avec ces trois protocoles. Les résultats obtenus sont présentés sur la Figure 54 :

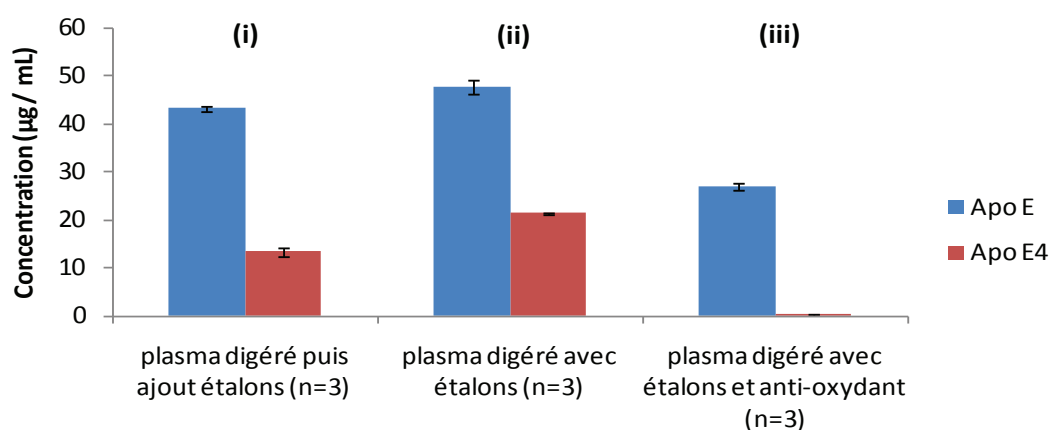


Figure 54 : Quantification de l'Apo E et de l'Apo E4 dans le plasma digéré avec ou sans anti-oxydant.

La comparaison entre les conditions (ii) et (i) (*i.e.* la différence de résultat liée au fait d'ajouter les étalons internes respectivement avant ou après digestion enzymatique) montre que le fait de digérer l'échantillon en présence des étalons engendre une légère surestimation des taux d'apolipoprotéine E et E4 par rapport aux conditions classiques. Ceci peut être lié à une perte de l'étalon (suite à une modification chimique et / ou à une dégradation) lors de la digestion enzymatique comme cela a déjà été décrit²⁰².

La comparaison entre les conditions (iii) et (ii) (*i.e.* la différence de résultat liée au fait de digérer les échantillons respectivement avec ou sans l'anti-oxydant) montre que le taux d'Apo E mesuré ne représente que 60% de celui mesuré lors de la digestion sans anti-oxydant et le peptide spécifique de l'Apo E4 n'est plus détecté. Deux hypothèses peuvent alors être émises : la dénaturation des

protéines est moins efficace lors de l'utilisation de l'anti-oxydant ce qui va empêcher l'accès de la trypsine aux sites de clivage de l'Apo E ou alors, ce mélange a engendré une inhibition de la trypsine.

La réponse pourrait être apportée en faisant une expérience au cours de laquelle deux échantillons sont préparés : le premier est préparé dans les conditions (iii) présentées ci-dessus. Le second échantillon doit être dénaturé selon le protocole classique avec du DTT puis alkylé par l'IAM. A l'issue de l'alkylation, le mélange anti-oxydant doit alors être ajouté. Si ces deux échantillons conduisent au même résultat, le faible taux d'Apo E mesuré est dû à une inhibition de la trypsine par le mélange anti-oxydant. En revanche, si le second échantillon donne des résultats similaires à ceux obtenus dans les conditions (ii), cela signifie que le mélange anti-oxydant n'a pas permis une dénaturation suffisante de l'Apo E afin que cette dernière puisse être digérée par la trypsine. L'objectif de l'étude n'étant pas de déterminer les causes du mauvais rendement de digestion observé dans les conditions (iii) mais de vérifier si les conditions utilisées habituellement génèrent une oxydation des méthionines, cette expérience n'a pas été réalisée.

Le taux d'Apo E4 n'a pas pu être mesuré lorsque la digestion est réalisée en présence du mélange anti-oxydant. Par conséquent, il est difficile de déterminer si le protocole de digestion enzymatique engendre une oxydation de la méthionine du peptide spécifique de l'Apo E4. L'influence de ce protocole a donc été étudiée par la suite uniquement sur le peptide marqué LGADMEDV*R et les résultats sont reportés sur la Figure 55. Comme précédemment, pour chaque condition, trois échantillons ont été préparés :

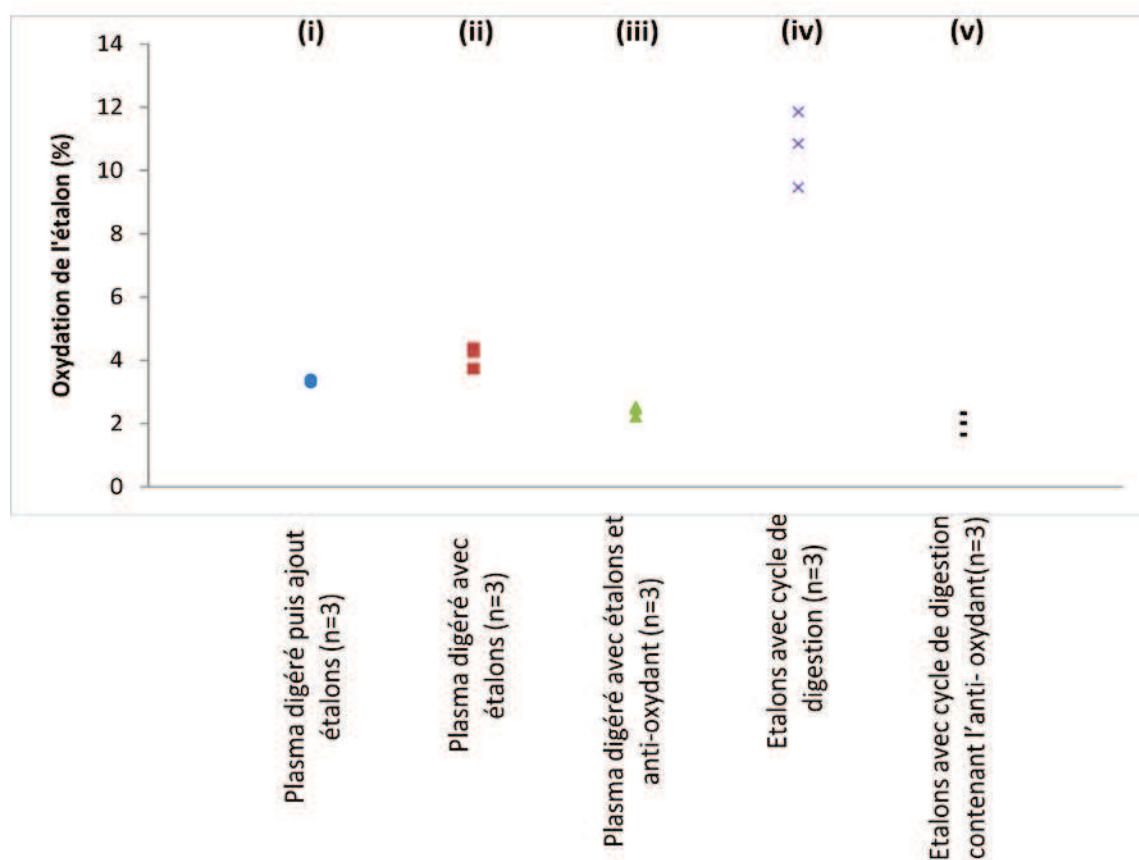


Figure 55 : Oxydation naturelle du peptide LGADMEDV*R lors de la digestion du plasma avec ou sans anti-oxydant.

Les conditions (i), (ii) et (iii) sont les mêmes que celles présentées sur la Figure 54. Dans les séries (iv) et (v), les étalons ont subi les mêmes cycles de température que le plasma lors de la digestion mais les réactifs (urée, DTT, IAM, bicarbonate d'ammonium et trypsine) et le plasma, ont été remplacés par de l'eau en quantité identique. Ensuite, les étalons ont subi les cycles habituels de température (60°C pendant 40 min, puis 40 min à température ambiante et 16h à 37°C). En revanche, pour la dernière série (condition (v)), le TCEP et l'ascorbate n'ont pas été remplacés par de l'eau.

Dans la première série (disques bleus), l'oxydation mesurée pour l'étalon est de $3,36 \pm 0,06$ % (valeur moyenne obtenue pour trois répétitions). Dans la deuxième série (carrés rouges), cette valeur vaut $4,13 \pm 0,34$ %. La dénaturation et / ou la digestion des échantillons s'accompagne donc d'une légère oxydation du peptide LGADMEDV*R de 0,77%. Cette suroxydation est donc assez faible par rapport aux valeurs mesurées dans les 68 plasmas (*cf.* Figure 53). Ces étapes de dénaturation et / ou digestion n'expliquent donc pas l'oxydation moyenne de 4,8% rencontrée dans les 68 plasmas. Les plasmas sont donc probablement oxydés naturellement avant le début de la dénaturation des échantillons.

Lorsque la digestion du plasma est réalisée en présence de TCEP et d'ascorbate (*cf.* condition (iii)), l'oxydation de ce peptide n'est plus que de $2,40 \pm 0,17$ %. Cette valeur numérique peut être biaisée par le fait que dans ce cas, l'effet matrice subi par les formes mono et non oxydées soit différent car la digestion enzymatique n'est pas totale. En effet, le temps de rétention de la forme mono oxydée passe de 4,9 min (CV = 2,9%) à 5,2 min (CV = 1,4%). De plus, la digestion étant incomplète, de nouveaux peptides sont générés et peuvent être coélus avec les peptides LGADMEDV*R et LGADM(ox)EDV*R.

Lorsque les cycles habituels de température sont appliqués sur les étalons en l'absence de matrice (*cf.* condition (iv)), une oxydation importante est observée ($10,7 \pm 1,2$ %). En revanche, lorsque ces cycles de température sont appliqués sur les étalons en l'absence de matrice mais en présence de TCEP et d'ascorbate (*cf.* condition (v)), l'oxydation de l'étalon ne vaut plus que $2,00 \pm 0,34$ %.

Cette figure montre que les conditions de digestion utilisées classiquement génèrent une oxydation de l'échantillon et que cette oxydation peut être inhibée par des réactifs comme le TCEP et l'ascorbate. En revanche dans le plasma, l'oxydation du peptide LGADMEDV*R est très faiblement amplifiée sans ajout d'anti-oxydants ce qui suggère l'existence d'autres anti-oxydants présents naturellement dans le plasma. L'hétérogénéité d'oxydation naturelle mesurée précédemment (*cf.* Figure 53) peut donc être considérée comme une hétérogénéité présente initialement dans l'échantillon et non comme un biais ajouté lors de la préparation de l'échantillon.

L'oxydation générée par le protocole de digestion des échantillons est donc bien maîtrisée et répétable (*cf.* Figure 55) puisque le coefficient de variation sur le pourcentage d'étalon oxydé est de seulement 1,7%. Ne pas s'occuper de cette oxydation ne semble donc pas introduire de biais dans le dosage si on veut seulement comparer deux conditions (taux d'Apo E chez les patients atteints de la maladie d'Alzheimer et témoins). En revanche, on ne maîtrise pas toutes les étapes situées en amont de la digestion enzymatique (oxydation naturelle au sein de l'organisme et oxydation éventuellement induite par la collecte et le stockage du plasma). La Figure 53 page 148 montre que cette oxydation est très variable d'un individu à un autre et ne peut donc plus être négligée sous peine de fausser les conclusions de l'étude. Afin de s'affranchir de ce biais que nous ne pouvons pas maîtriser, nous avons

développé un protocole d'oxydation totale de la méthionine. Le fait d'oxyder totalement les méthionines doit donc permettre de réaliser un dosage répétable quel que soit leur taux d'oxydation initial.

III.3) Développement de l'oxydation totale de la méthionine

III.3.1) Choix du réactif

Afin de réaliser l'oxydation totale de la méthionine, différents réactifs ont été testés. Le réactif le plus courant est le peroxyde d'hydrogène. Il peut être utilisé à 4°C pendant plusieurs heures²⁴⁷ ou à température ambiante pendant environ 30 minutes^{243, 248-253}. Les premiers essais ont donc été réalisés avec du peroxyde d'hydrogène (H_2O_2). Une solution de peptide LGADMEDV*R (noté M_4) a été incubée pendant 30 minutes à température ambiante avec 3% d' H_2O_2 . Le spectre de masse de la solution peptidique a été réalisé immédiatement après et comparé à celui issu du peptide en solution dans l'eau acidifiée n'ayant pas subi l'oxydation :

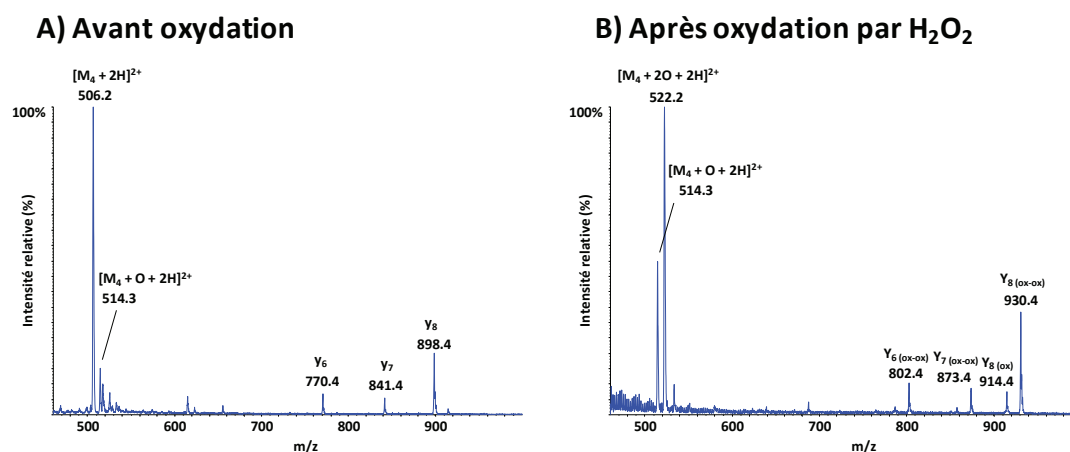


Figure 56 : Spectres de masse du peptide LGADMEDV*R dans l'eau acidifiée (A) ou après réaction pendant 30 min à température ambiante avec 3% de peroxyde d'hydrogène (B).

La Figure 56 A) montre une nouvelle fois la présence du peptide synthétique mono oxydé ($m/z = 514,3$) dans la solution non oxydée de peptide ($m/z = 506,2$). Quelques fragments produits en source sont également obtenus (fragments y_6 , y_7 et y_8). Après réaction avec 3% d' H_2O_2 pendant 30 minutes (cf. Figure 56 B), l'espèce non oxydée disparaît mais il se forme un mélange entre les peptides mono ($m/z = 514,3$) et doublement oxydés ($m/z = 522,2$). De même, quelques fragments sont produits en source. De telles conditions ne permettent donc pas de réaliser une quantification sur ce peptide puisque le problème est simplement déplacé : il y a un mélange entre les formes mono et doublement oxydées au lieu d'un mélange entre le peptide non oxydé et son homologue mono oxydé. De plus, le ratio entre les formes mono et doublement oxydées est très probablement dépendant de la quantité d'espèce mono oxydée présente initialement en solution. Ce ratio va donc toujours varier en fonction de l'état d'oxydation initiale de l'échantillon. Le biais sur le taux d'Apo E4 mesuré sera donc toujours présent et variable.

Cette réaction d'oxydation n'affecte pas uniquement notre peptide d'intérêt : elle va également se produire sur tous les peptides oxydables présents dans l'échantillon. Parmi ces peptides, d'autres pourraient s'avérer intéressants. Par exemple, si on souhaite également quantifier l'Apo E2, nous avons vu sur la Figure 50 page 136 que le seul peptide spécifique de cet isoforme a pour séquence CLAVYQAGAR. Ce peptide contient donc deux résidus susceptibles d'être oxydés : la cystéine et la tyrosine. La même expérience a donc été réalisée sur le peptide marqué de séquence C(Cam)LAV*YQAGAR (noté M₂). Ce peptide ayant été alkylé par de l'iodoacétamide, on utilise la terminologie C(Cam) pour désigner la cystéine. Les spectres de masse sont présentés sur la Figure 57 :

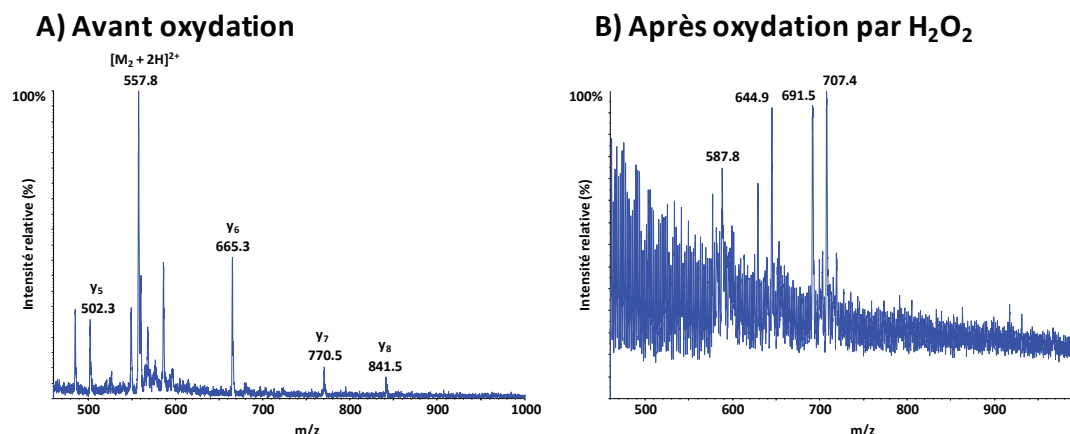


Figure 57 : Spectres de masse du peptide C(Cam)LAV*YQAGAR dans l'eau acidifiée (A) ou après réaction pendant 30 min à température ambiante avec 3% de peroxyde d'hydrogène (B).

Le spectre de la Figure 57 A) permet de distinguer l'ion parent doublement chargé ($m/z = 557,8$) ainsi que quelques fragments de la série d'ions y. En revanche, après réaction avec le peroxyde d'hydrogène (cf. partie B), aucun ion caractéristique du peptide M₂ n'a pu être identifié. L'utilisation de peroxyde d'hydrogène conduit donc à la disparition de ce peptide et à de multiples sous produits puisqu'aucune espèce majoritaire n'a été détectée (même en dessous de 450 Da). Il apparaît donc qu'il va être difficile de doser simultanément l'Apo E2 et l'Apo E4. Notre étude se focalisant plutôt sur l'Apo E4, les produits formés n'ont pas été recherchés. L'étude s'est plutôt consacrée en la modification de certains paramètres afin d'aboutir à une seule espèce lors de l'oxydation du peptide contenant une méthionine.

Toutes les études citées précédemment utilisent le peroxyde d'hydrogène comme réactif d'oxydation et observent la formation de l'espèce mono oxydée sur la méthionine comme c'est le cas ici. En revanche, il est rarement fait mention de l'espèce doublement oxydée.

Jaquinod *et al.* ont cependant rapporté que l'utilisation d'une quantité plus importante d'H₂O₂ (7%) sur des protéines issues d'une séparation par SDS-PAGE permettait d'aboutir à une double oxydation de la méthionine au bout de seulement 15 minutes de réaction²⁴⁴. Une réaction dans 7% d'H₂O₂ à 0°C a donc ensuite été réalisée afin de voir si l'oxydation du peptide contenant la méthionine pouvait être totale :

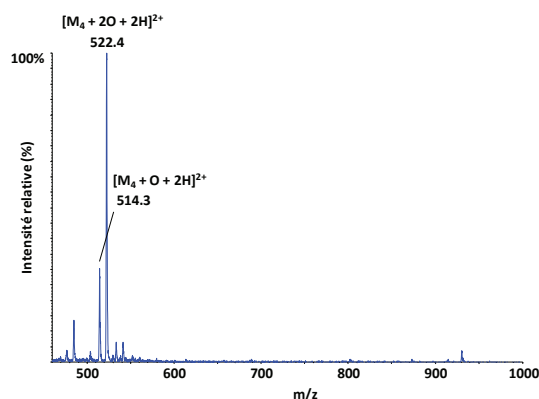


Figure 58 : Spectre de masse du peptide LGADMEDV*R après réaction pendant 20h à 0°C avec 7% de peroxyde d'hydrogène.

La Figure 58 montre à nouveau un mélange entre les formes mono et doublement oxydées. On peut toutefois remarquer que le ratio entre ces deux formes est déplacé vers l'espèce doublement oxydée. En effet, dans ces nouvelles conditions, l'espèce mono oxydée ne représente plus que 30 % de la doublement oxydée alors qu'elle représentait 50 % de cette espèce dans les conditions utilisant seulement 3 % d'H₂O₂ (cf. Figure 56 B).

Quelles que soient les conditions opératoires, les résultats obtenus avec le peroxyde d'hydrogène n'ont pas permis d'obtenir une oxydation totale vers une seule espèce. Il a donc été nécessaire d'évaluer un autre réactif. Plusieurs auteurs ont montré que l'utilisation de peracide permettait une conversion totale des méthionines en méthionines sulfones (espèce doublement oxydée)²⁵⁴⁻²⁵⁷. Ces protocoles emploient généralement 3% d'acide performique pendant une durée inférieure à 4h et à température ambiante. De l'acide performique a donc été ajouté à 3% (v / v) et la réaction s'est déroulée une nouvelle fois à température ambiante pendant 4h :

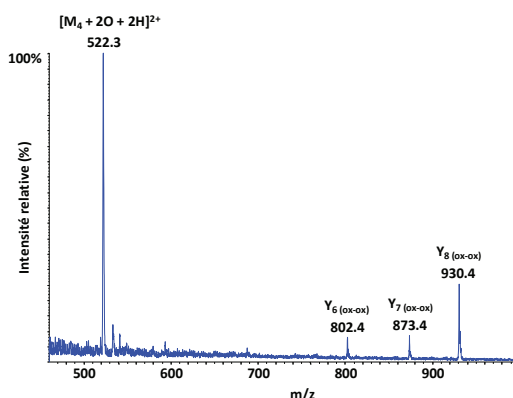


Figure 59 : Spectre de masse du peptide LGADMEDV*R après réaction pendant 4h à température ambiante avec 3% d'acide performique.

Comme le montre la Figure 59, dans ces conditions, une double oxydation totale sur la méthionine de ce peptide est obtenue. Comme précédemment, on retrouve également quelques fragments

produits en source. Des essais d'oxydation du peptide de séquence C(Cam)LAV*YQAGAR ont ensuite été réalisés avec de l'acide performique. Puisqu'il a été montré que l'acide performique peut causer d'autres modifications chimiques que l'oxydation souhaitée (élimination du groupement thiol de la cystéine, coupure après une asparagine ou un tryptophane, formylation des lysines, thréonines et sérines, oxydation des tyrosines ou chloration de ces dernières)²⁵⁸, la concentration de réactif ainsi que la température de réaction ont été abaissées afin de limiter ces réactions collatérales. La quantité de réactif a donc été ajustée à 1% (v / v) et la réaction s'est déroulée pendant 20h à 0°C :

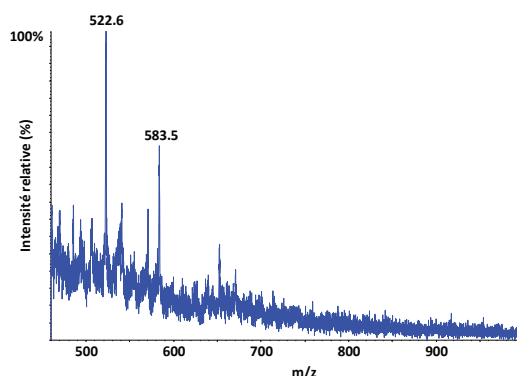


Figure 60 : Spectre de masse du peptide C(Cam)LAV*YQAGAR après réaction pendant 20h à 0°C avec 1% d'acide performique.

Comme avec le peroxyde d'hydrogène (*cf.* Figure 57 B), l'oxydation par de l'acide performique ne permet pas d'identifier un ion caractéristique de ce peptide et aucune forme majoritaire n'a pu être détectée. Il apparaît évident que l'un des acides aminés de ce peptide réagit avec l'oxydant. Parmi ces acides aminés, la tyrosine est celui qui semble le plus enclin à être modifié. En effet, la chaîne latérale de cet acide aminé comporte un groupement aromatique contenant une fonction alcool. Sous l'effet d'un oxydant comme le peroxyde d'hydrogène ou l'acide performique, la tyrosine perd probablement un radical hydrogène pour former un radical tyrosyl qui va soit réagir avec un autre radical²⁵⁹ soit se décomposer de manière successive par rupture homolytique de façon à donner de multiples sous produits. Ce dernier phénomène expliquerait pourquoi aucun ion caractéristique du peptide spécifique de l'Apo E2 n'a été détecté. De plus, il a déjà été rapporté que les tyrosines pouvaient être modifiées lors de réactions d'oxydation et que l'ajout de phénol permettait de protéger cet acide aminé²⁶⁰. La même expérience a alors été réalisée en ajoutant 0,5% de phénol (m / v) dans le mélange réactionnel :

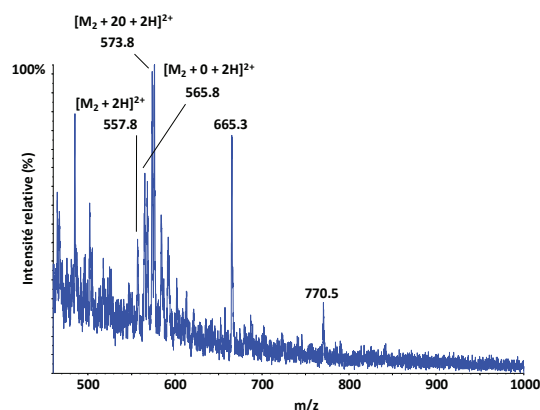


Figure 61 : Spectre de masse du peptide C(Cam)LAV*YQAGAR après réaction pendant 20h à 0°C avec 1% d'acide performique contenant 0,5% de phénol.

L'ajout de phénol permet de détecter le peptide spécifique de l'Apo E2 avec zéro ($m/z = 557,8$), un ($m/z = 565,8$) ou deux ($m/z = 573,8$) atomes d'oxygène sur la cystéine. En présence de phénol, les radicaux libres présents en solution vont donc probablement réagir principalement sur le phénol qui est présent en plus grande quantité que le peptide C(Cam)LAV*YQAGAR ce qui va permettre de protéger la chaîne latérale de la tyrosine de ce peptide et ainsi permettre sa détection. Le rapport signal sur bruit étant relativement faible par rapport à celui observé sur la Figure 57-A page 153, il est probable que la protection de la chaîne latérale ne soit pas totale. De plus, l'action de l'acide performique conduit à une oxydation non totale de la cystéine avec un mélange entre des formes présentant trois états d'oxydation. Encore une fois, il apparaît donc difficile d'envisager la quantification simultanée de l'Apo E4 et de l'Apo E2. Des essais plus poussés permettant d'aboutir à une seule espèce pour le peptide spécifique de l'Apo E2 n'ont pas été réalisés puisque ce peptide est moins intéressant pour notre étude.

Afin de vérifier que dans ces nouvelles conditions, la méthionine du peptide spécifique de l'Apo E4 soit totalement oxydée deux fois et que le peptide commun ne soit pas modifié, les peptides de séquence LGADMEDV*R et LGPLV*EQGR ont également été oxydés par 1% d'acide performique (v/v) en présence de 0,5% de phénol (m/v) à 0°C :

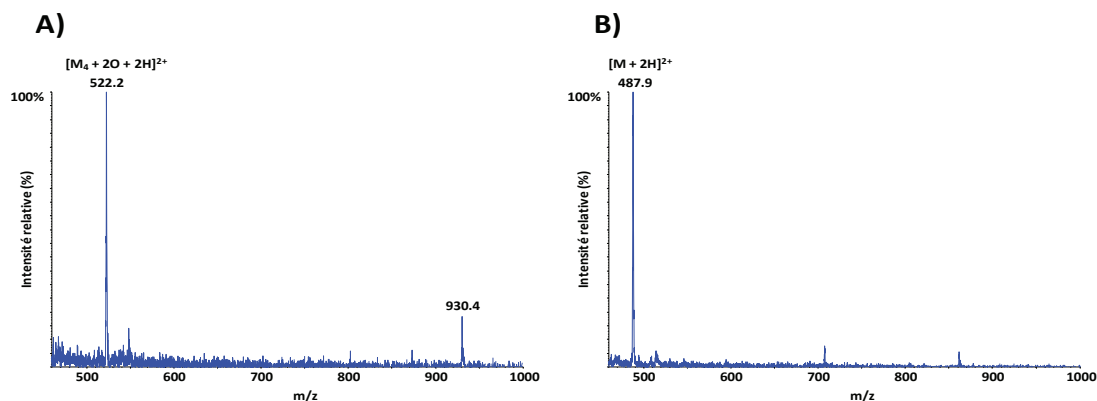


Figure 62 : Spectres de masse des peptides LGADMEDV*R (A) et LGPLV*EQGR (B) après réaction pendant 20h à 0°C avec 1% d'acide performique contenant 0,5% de phénol.

La partie A de la Figure 62 montre que la présence de phénol n'empêche pas d'aboutir à une double oxydation totale de la méthionine du peptide LGADMEDV*R qui est spécifique de l'Apo E4 alors que la partie B montre que le peptide commun aux trois isoformes n'est pas modifié par ces conditions d'oxydation. De plus, aucun produit secondaire n'a été identifié. Ces expériences confirment donc les résultats obtenus dans les travaux cités précédemment dans lesquels un peracide était capable d'oxyder totalement les méthionines en méthionines sulfones. Ces expériences ont été réalisées dans un milieu réactionnel très simple : de l'eau avec seulement les peptides marqués d'intérêt.

L'étape suivante va donc être d'une part de vérifier si une double oxydation totale est toujours obtenue lorsque les peptides sont présents dans une matrice complexe telle que du sérum et d'autre part de définir la durée nécessaire pour que l'oxydation soit totale dans cette matrice complexe.

III.3.2) Optimisation de la durée de réaction

La méthode finale doit permettre de doser l'Apo E et l'Apo E4 dans du plasma. Dans un premier temps, l'optimisation du temps d'oxydation a été réalisée sur du sérum car cette matrice est assez proche du plasma et était la seule disponible au laboratoire. Dans un second temps, les résultats seront confirmés dans du plasma.

Le mélange contenant 1% d'acide performique (v / v) et 0,5% de phénol (m / v) a donc été ajouté à du sérum digéré (volume initial de 100 μ L) contenant les étalons suivants à une concentration équivalent à 1,2 mg d'Apo E par mL de sérum : LGPLV*EQGR (peptide commun aux trois isoformes), LGADMEDV*R (peptide spécifique de l'Apo E4), LGADMEDV*C(Cam)GR (peptide commun aux Apo E2 et E3) et C(Cam)LAV*YQAGAR (peptide spécifique de l'Apo E2). Une concentration aussi élevée de peptide a été utilisée afin de pouvoir détecter les peptides modifiés même lorsque le rendement de la réaction est faible. En effet, pour réaliser cette cinétique sans se soucier du temps que prendrait une extraction sur phase solide, cette extraction n'a pas été réalisée. Par conséquent, les peptides sont dans un mélange fortement dilué. Une concentration plus importante de ces peptides est donc nécessaire pour permettre leur détection. Après ajout des étalons, le mélange a donc été immédiatement mis dans un tube placé sur le portoir de l'injecteur dont la température a été fixée à 4°C. Au bout de 0, 2, 3, 4, 5, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24 et 45 heures, 20 μ L de sérum ont été injectés et l'aire de chaque forme (contenant 0, 1 ou 2 oxygènes sur la méthionine et sur la cystéine) a été mesurée :

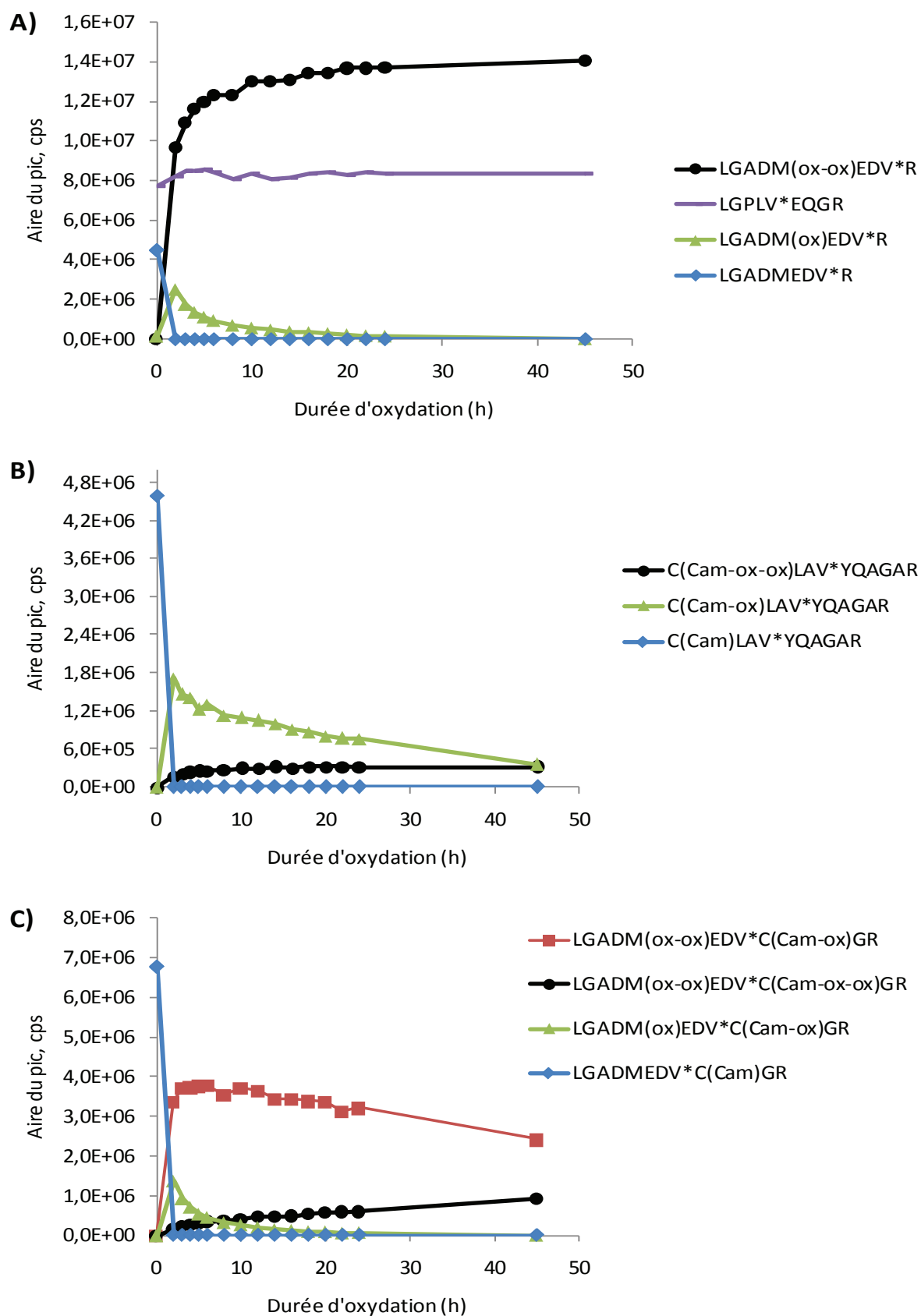


Figure 63 : Cinétique d'oxydation des peptides LGADMEDV* R et LGPLV*EQGR (A), C(Cam)LAV*YQAGAR (B) et LGADMEDV*C(Cam)GR (C) par de l'acide performique contenant du phénol dans du sérum digéré.

La Figure 63-A) montre que l'aire du peptide de séquence LGPLV*EQGR (peptide commun aux trois isoformes) ne varie pas même après 45h de réaction. Ce résultat était attendu puisque ce peptide ne contient aucun acide aminé susceptible d'être oxydé. En ce qui concerne le peptide de séquence LGADMEDV*R (spécifique de l'Apo E4), la forme non oxydée est détectée uniquement avant ajout du réactif. En effet, dès 2h de réaction, elle disparaît pour laisser place à un mélange entre les formes mono et doublement oxydées. Puis la forme mono oxydée décroît exponentiellement pour former l'espèce doublement oxydée. Un plateau est atteint après 20h de réaction.

La Figure 63-B) illustre le cas d'un peptide contenant une cystéine (peptide de séquence C(Cam)LAV*YQAGAR, spécifique de l'Apo E2). Tout comme pour le peptide contenant une méthionine, la forme non oxydée disparaît dès 2h de réaction pour former l'espèce mono oxydée. Ensuite, cette espèce est progressivement oxydée une seconde fois mais la réaction n'est pas totale même après 45h.

Enfin, la Figure 63-C) présente un peptide contenant une méthionine et une cystéine (peptide LGADMEDV*C(Cam)GR rencontré dans l'Apo E2 et l'Apo E3). Comme précédemment, la forme non oxydée (M_0C_0) disparaît dès 2h de réaction pour former une espèce oxydée une fois sur la méthionine et une fois sur la cystéine (M_1C_1) et également l'espèce doublement oxydée sur la méthionine et mono oxydée sur la cystéine (M_2C_1). Ensuite, le peptide M_1C_1 est progressivement oxydé en son homologue doublement oxydé sur la méthionine (M_2C_1). En parallèle, ce peptide M_2C_1 s'oxyde à nouveau pour donner la forme doublement oxydée sur la méthionine et doublement oxydée sur la cystéine (M_2C_2). Comme pour le peptide C(Cam)LAV*YQAGAR, la seconde oxydation sur la cystéine n'est pas totale même après 45h de réaction alors que la double oxydation de la méthionine est totale.

Le peptide spécifique de l'Apo E2 (CLAVYQAGAR) et celui présent sur les Apo E2 et Apo E3 (LGADMEDVCGR) ne permettent donc pas d'aboutir à une double oxydation totale de la cystéine dans ces conditions. Or, puisque le peptide présentant un intérêt majeur dans l'étude de la maladie d'Alzheimer est celui de séquence LGADMEDVR (seul peptide spécifique de l'Apo E4), des essais plus poussés pour aboutir à une seule forme sur les deux peptides CLAVYQAGAR et LGADMEDVCGR n'ont pas été réalisés. Ces essais pourraient inclure en premier lieu une augmentation de la quantité de réactif et de la température d'oxydation. Dans un second temps, des oxydants plus forts pourraient être recherchés si ces conditions ne sont toujours pas suffisantes pour aboutir à une seule espèce.

Pour la suite, une oxydation pendant 24h à 0°C a été utilisée. Des expériences supplémentaires auraient également pu être menées afin de diminuer ce temps de réaction et ainsi gagner une journée lors de la préparation des échantillons. En effet, lors du protocole actuel de préparation d'échantillon, la digestion enzymatique est arrêtée un matin (au deuxième jour de préparation). L'oxydation intervient à ce niveau et l'étape finale (qui dure environ cinq heures) est une extraction sur phase solide suivie d'une évaporation de l'échantillon. Ainsi, pour pouvoir réaliser l'oxydation, la purification et l'évaporation dans la même journée, il faudrait que l'oxydation dure environ quatre heures. Cette durée étant assez éloignée des 24h actuelles, le protocole présent n'a pas été modifié et la préparation totale (dénaturation, digestion enzymatique, oxydation, extraction et évaporation) est étalée sur trois jours consécutifs ce qui peut représenter un frein pour appliquer cette méthode lors de dosages à très haut débit sachant que lors des dosages présentés plus loin, entre quarante et

cinquante échantillons ont été gérés simultanément. Mettre au point une méthode à très haut débit n'étant pas le premier objectif ici, l'étude s'est poursuivie en conservant cette longue préparation d'échantillon.

Tous les essais précédents ont été réalisés dans du sérum. Or, puisque le dosage final aura lieu dans du plasma, l'étape suivante a consisté à vérifier dans un échantillon de plasma contenant l'Apo E4 si les formes endogènes avec zéro ou une oxydation étaient détectées en utilisant le protocole d'oxydation décrit au paragraphe II.2.2) page 139. Pour cela, un plasma $\epsilon 4/\epsilon 4$ a été digéré deux fois, les étalons marqués ont été ajoutés puis un digest a été directement extrait pendant que l'autre a d'abord été oxydé. Les chromatogrammes obtenus sont présentés sur la figure suivante :

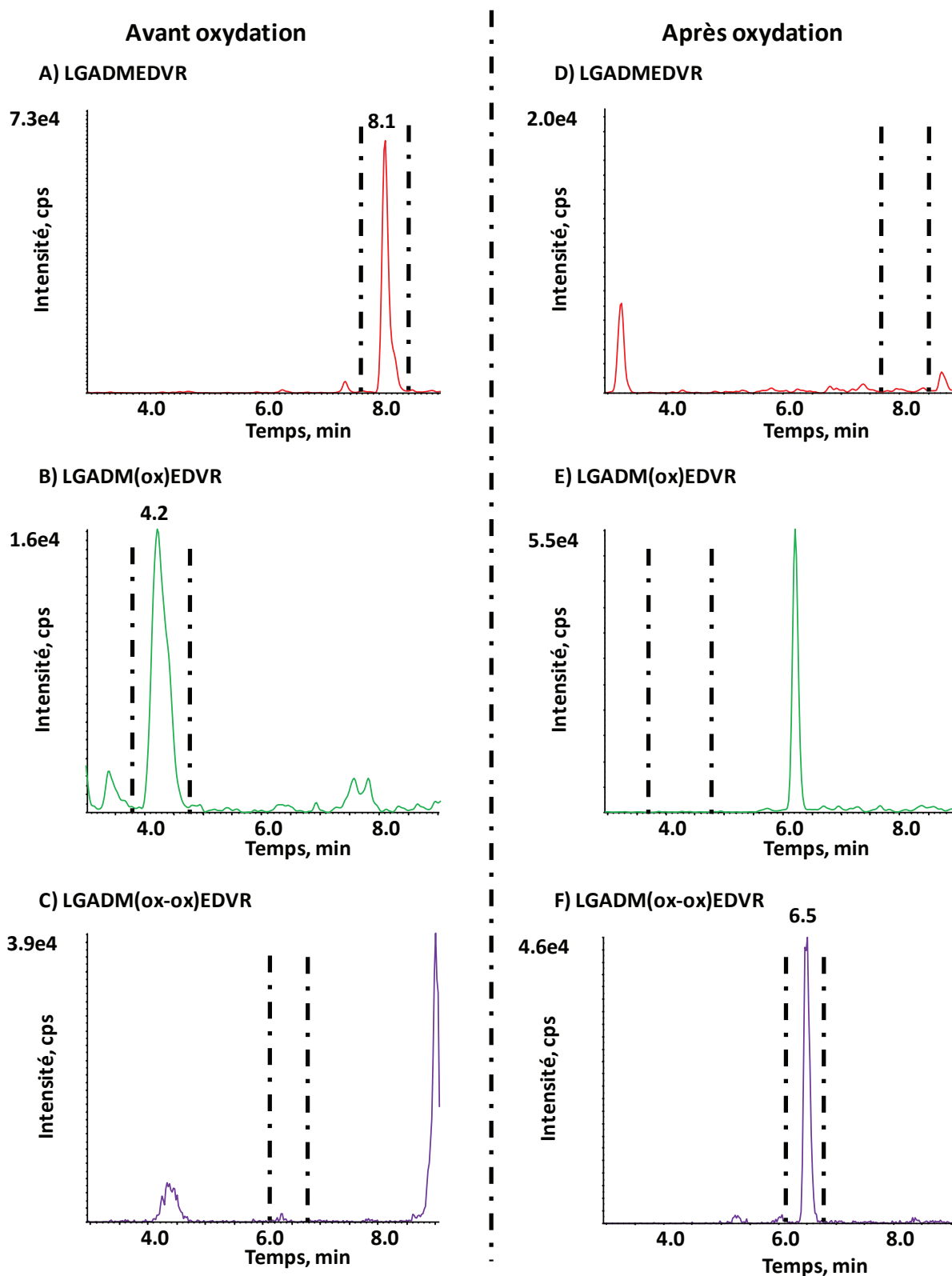


Figure 64 : Chromatogrammes reconstitués du peptide LGADMEDVR dans du plasma $\epsilon 4/\epsilon 4$ avant (A-B-C) ou après (D-E-F) oxydation à l'acide performique contenant du phénol. Chaque chromatogramme correspond à la forme non oxydée (A-D) ($t_r = 8.1$ min), mono oxydée (B-E) ($t_r = 4.2$ min) ou doublement oxydée (C-F) ($t_r = 6.5$ min) sur la méthionine.

La Figure 64-A et la Figure 64-B montrent respectivement les peptides LGADMEDVR ($t_r = 8,1$ min) et LGADM(ox)EDVR ($t_r = 4,2$ min) issus de l'Apo E4 endogène en l'absence du réactif d'oxydation. La forme doublement oxydée ($t_r = 6,5$ min) est absente à l'état naturel (Figure 64-C). En revanche, après oxydation, les formes non oxydées (Figure 64-D) et mono oxydées (Figure 64-E) ne sont plus détectées. Le peptide LGADM(ox-ox)EDVR est quant à lui bien détecté à 6,5 min dans ces conditions. Un point de contrôle supplémentaire est apporté par les temps de rétention. En effet, le peptide doublement oxydé doit être élué après le peptide mono oxydé mais avant le peptide non oxydé comme cela a déjà été décrit²⁵⁵.

Les conditions utilisées aboutissent à une double oxydation totale de la méthionine et vont donc permettre de quantifier le peptide protéotypique de l'apolipoprotéine E4 sans se soucier du biais causé par l'oxydation naturelle de la méthionine de ce peptide. L'étape suivante a consisté à vérifier la linéarité de la réponse des peptides sélectionnés afin de pouvoir effectuer la quantification de ces peptides grâce à un étalonnage à un seul point comme cela a été réalisé au chapitre précédent pour la vitellogénine.

III.4) Linéarité de la réponse des peptides sélectionnés

III.4.1) Conditions chromatographiques

Précédemment, les essais ont été réalisés sur une colonne de dimensions 2,1 x 100 mm avec une taille de particules de 3,5 μm et la durée d'analyse était de 19 minutes ce qui permet d'analyser 72 échantillons par tranche de 24 heures (*cf.* paragraphe II.3) page 139 pour les détails du gradient). Afin d'optimiser le temps machine lors du dosage ultérieur des 711 échantillons, l'objectif fixé dans le choix du nouveau gradient a donc été d'utiliser une méthode dont la durée n'excède pas cinq minutes. Le fait de diminuer la durée de séparation chromatographique risque d'engendrer une forte hausse de l'effet matrice. Cependant, l'Apo E étant une protéine assez concentrée (de l'ordre de plusieurs dizaines de microgrammes par mL), si l'effet matrice est important, elle sera tout de même détectée.

Les trois moyens les plus simples pour raccourcir la durée de la séparation chromatographique sont de :

- diminuer la longueur de la colonne,
- augmenter le débit de la phase mobile,
- augmenter la pente du gradient de solvant éluant.

D'abord, si la longueur de la colonne est diminuée, la résolution chromatographique va également être abaissée puisque cette résolution est proportionnelle à la racine carrée de la longueur de la colonne¹.

$$^1 R = \frac{1}{4} \sqrt{\frac{L}{H} \frac{\alpha-1}{\alpha} \frac{k'_2}{1+k'_2}}$$

avec R, la résolution chromatographique entre les composés 1 et 2,

Pour mieux comprendre l'influence du débit de la phase mobile sur la résolution, il faut revenir sur l'équation de van Deemter :

$H = A + \frac{B}{u} + C \cdot u$; avec H la hauteur équivalente à un plateau théorique, u la vitesse linéaire de la phase mobile, A l'anisotropie d'écoulement, B la diffusion longitudinale et C la résistance au transfert de masse. Si H est en m et u en m.s^{-1} , alors le terme A est en m, B en $\text{m}^2.\text{s}^{-1}$ et C en s^{-1} .

Cette équation permet de déterminer la vitesse linéaire optimale de la phase mobile pour une taille de particules donnée. Ensuite, en fonction du diamètre de la colonne, cette vitesse linéaire est convertie en débit optimal.

Cette hauteur H représente la largeur de la bande contenant les analytes au sein de la colonne chromatographique et est reliée à l'efficacité de la colonne par la relation :

$H = \frac{L}{N}$ avec L, la longueur de la colonne chromatographique et N, l'efficacité de la colonne.

Ainsi, plus la hauteur H est petite, plus la colonne est efficace et plus les pics seront fins. Et comme en électrospray le signal est proportionnel à la concentration au sommet du pic, la réponse sera plus importante si H diminue. De même, si les pics sont plus fins, l'effet matrice diminue ce qui va encore améliorer la réponse.

Cette hauteur H dépend donc des trois paramètres A, B et C. L'anisotropie d'écoulement augmente avec le diamètre des particules, l'irrégularité du remplissage de la colonne et la variation de la granulométrie de la phase stationnaire. La diffusion longitudinale est proportionnelle au coefficient de diffusion du composé dans la phase mobile et au facteur de tortuosité qui augmente avec la température et la pression. Tout comme l'anisotropie d'écoulement, la résistance au transfert de masse augmente avec le diamètre des particules et si la colonne n'est pas régulièrement remplie. Cette résistance au transfert de masse est proportionnelle au carré du diamètre des particules et inversement proportionnelle au coefficient de diffusion du soluté dans la phase mobile.

D'après cette équation, des courbes représentant l'évolution de la hauteur équivalente à un plateau théorique (H) en fonction de la vitesse linéaire de la phase mobile (u) peuvent être obtenues en fonction de la granulométrie de la phase stationnaire :

L, la longueur de la colonne chromatographique,
H, la hauteur équivalente à un plateau théorique,
 k'_2 , le facteur de rétention du composé 2,
et α , la sélectivité entre les composés 1 et 2 ($\alpha = \frac{k'_2}{k'_1}$)

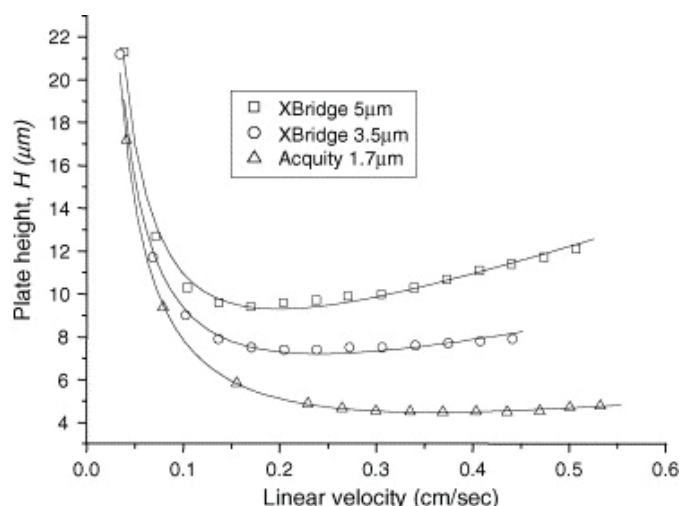


Figure 65 : Courbes de van Deemter obtenues après injection d'acétophénone sur trois colonnes de granulométrie différente (d'après de Villiers *et al.*²⁶¹).

Ces courbes permettent de voir que pour une taille de particules donnée, un débit optimal (correspondant à la valeur de H la plus faible) peut être calculé. Si ce débit est augmenté, la hauteur H augmente lentement à cause de la résistance au transfert de masse (terme C) qui devient prépondérante. En revanche, si le débit est en dessous de la valeur optimale, la hauteur H va augmenter rapidement à cause de la diffusion longitudinale (terme B). Si H augmente, il va en résulter une baisse rapide de la résolution chromatographique et donc une augmentation de l'effet matrice. Ces courbes permettent également de voir que si la granulométrie de la phase stationnaire diminue (pour passer par exemple de 3,5 à 1,7 μm), la hauteur H est abaissée et la vitesse linéaire optimale de la phase mobile (et donc le débit optimal) est augmentée. Le fait de diminuer cette granulométrie est donc un moyen simple d'augmenter la résolution de la séparation chromatographique (puisque H diminue) et de diminuer les temps d'analyse (puisque le débit de la phase mobile est également augmenté). L'inconvénient majeur d'un tel changement est la contre pression dans la colonne qui va être fortement augmentée puisqu'elle est inversement proportionnelle au carré du diamètre des particules.

Afin de remplir le cahier des charges fixé (à savoir une séparation de moins de cinq minutes au lieu des dix-neuf minutes actuelles), le choix de la colonne chromatographique s'est porté vers une colonne de plus faible taille de particules (1,8 μm au lieu de 3,5 μm) et plus courte (50 mm au lieu de 100 mm). Le diamètre de la colonne est quant à lui resté le même. La colonne utilisée est la Zorbax Eclipse plus C_{18} d'Agilent Technologies (Waldbronn, Allemagne). L'élution a donc été réalisée à 600 $\mu\text{L/min}$ (au lieu de 300 $\mu\text{L/min}$) avec de l'eau contenant 0,1 % d'acide formique (v/v) comme phase mobile A et de l'acétonitrile contenant également 0,1 % d'acide formique (v/v) comme phase mobile B. L'élution commence par un plateau de 1,3 min avec 8% de B, suivi d'un gradient linéaire de 8 à 20 % de B en 1,2 min. Ensuite, la colonne est lavée pendant 0,8 min avec 100 % de B puis rééquilibrée pendant 1,5 min. La colonne est placée dans un four dont la température est fixée à 25°C.

Avant d'effectuer les dosages, il reste à vérifier que la réponse des peptides soit linéaire en fonction de leur concentration. Pour cela, plusieurs gammes vont être réalisées.

III.4.2) Linéarité des peptides de synthèse dans l'eau

Il a été précédemment vérifié que l'ajout d'acide performique et de phénol engendrait une double oxydation de la méthionine du peptide LGADMEDVR sans modifier le peptide LGPLVEQGR. L'étape suivante est donc la vérification de la linéarité de la réponse de ces deux peptides après ajout du réactif d'oxydation. Ces linéarités ont d'abord été étudiées dans l'eau. Sachant que les concentrations moyennes d'Apo E rapportées dans la littérature sont situées autour de 40 $\mu\text{g} / \text{mL}$ ^{224-226, 232-234}, des gammes allant de 0,5 à 100 μg en équivalent protéine par mL de solution ont été réalisées (soit des concentrations en peptides environ 37 fois inférieures). Les courbes correspondant à ces peptides sont présentées sur la Figure 66 et les exactitudes associées dans le Tableau 10 :

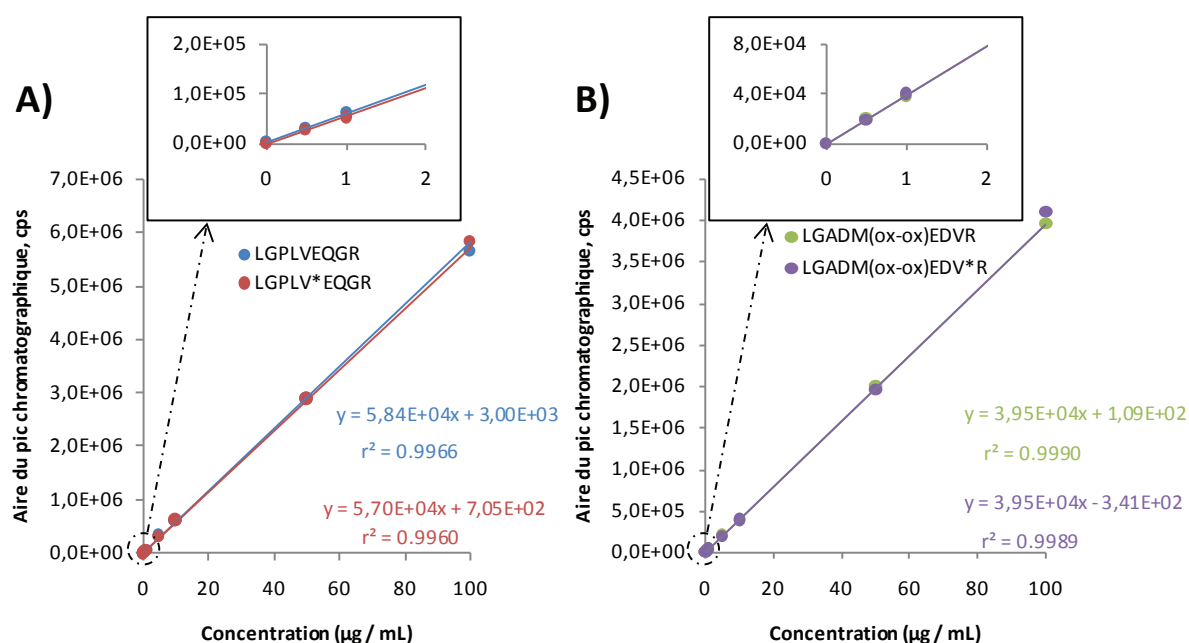


Figure 66 : Courbes d'étalonnage des peptides LGPLVEQGR, LGPLV*EQGR (A) et LGADM(ox-ox)EDVR, LGADM(ox-ox)EDV*R dans l'eau après ajout d'acide performique et de phénol.

Tableau 10 : Exactitudes associées aux courbes de la Figure 66.

Type	Concentration (µg/mL)	Exactitude (%) LGPLVEQGR	Exactitude (%) LGPLV*EQGR	Exactitude (%) LGADM(ox-ox)EDVR	Exactitude (%) LGADM(ox-ox)EDV*R
Etalon	0	N/D ^(a)	N/D	N/D	N/D
Etalon	0,5	91,8	92,1	102,3	99,2
Etalon	1	99,9	91,2	94,9	102,4
Etalon	5	110,9	105,0	102,4	95,4
Etalon	10	102,2	108,2	99,3	100,3
Etalon	50	98,7	101,3	101,1	99,0
Etalon	100	96,5	102,3	99,9	103,7
Contrôle Qualité	0,75	123,2	91,5	96,8	108,6
Contrôle Qualité	20	98,7	110,4	96,1	104,9
Contrôle Qualité	75	92,0	105,3	96,4	105,5

^(a) N/D : Non déterminée

Les deux courbes correspondant au peptide LGPLVEQGR et à son homologue marqué sont superposées et linéaires de 0,5 à 100 µg / mL. Le coefficient de détermination est supérieur à 0,99 pour les deux courbes et les exactitudes associées au modèle de régression sont comprises entre 80 et 120%. De même, les deux courbes correspondant aux peptides LGADM(ox-ox)EVR et LGADM(ox-ox)EDV*R se superposent et la réponse est linéaire entre 0,5 et 100 µg / mL. La double oxydation de la méthionine permet la conservation de la linéarité de la réponse du peptide spécifique de l'Apo E4. Un autre point important à souligner est que puisque la réponse du peptide LGADMEDVR est linéaire après oxydation, cela signifie que le protocole d'oxydation est répétable. En effet, si ce n'était pas le cas (et que par conséquent l'oxydation ne soit pas totale), l'aire des points pour lesquelles l'oxydation a été incomplète serait plus faible et le coefficient de détermination serait alors abaissé. Cependant, puisque la réaction a été effectuée dans l'eau, il n'y a aucune molécule pouvant interférer l'oxydation et le réactif est donc en très large excès ce qui limite les risques de réaction incomplète. Il reste donc à vérifier que ces conclusions soient les mêmes dans le plasma.

III.4.3) Linéarité des peptides de synthèse dans le plasma

Aucun plasma humain ne contenant pas d'apolipoprotéine E (ni E2, ni E3, ni E4) n'est disponible. Par conséquent, il n'est pas possible de faire des gammes de peptide léger de séquence LGPLVEQGR (peptide commun aux trois isoformes). Pour ce peptide, seule une gamme de peptide marqué (LGPLV*EQGR) a donc été réalisée. Après ajout du peptide de synthèse dans le plasma digéré, l'ensemble a été oxydé. Les résultats sont présentés dans la Figure 67 et dans le Tableau 11 :

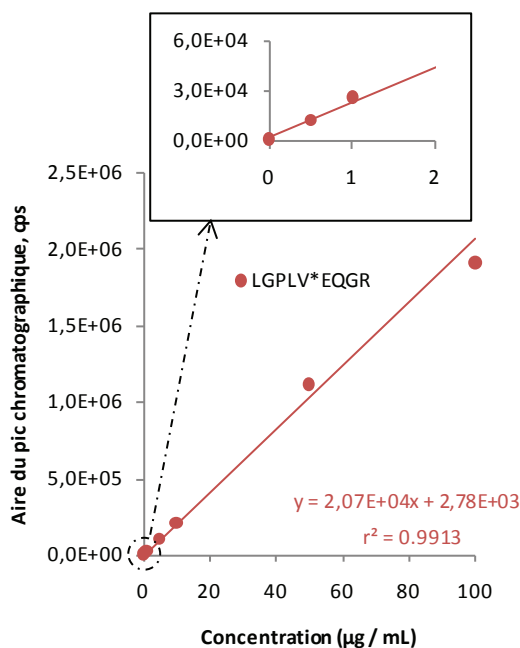


Figure 67 : Courbe d'étalonnage du peptide LGPLV*EQGR dans du plasma après ajout d'acide performique et de phénol.

Tableau 11 : Exactitudes associées à la courbe de la Figure 67.

Type	Concentration (µg/mL)	Exactitude (%)
Etalon	0	N/D ^(a)
Etalon	0,5	94,5
Etalon	1	112,2
Etalon	5	94,2
Etalon	10	99,2
Etalon	50	107,8
Etalon	100	92,3
Contrôle Qualité	0,75	83,0
Contrôle Qualité	20	106,6
Contrôle Qualité	75	98,7

^(a) N/D : Non déterminée

Dans le plasma, le fait d'ajouter l'acide performique et le phénol n'empêche pas d'obtenir une réponse linéaire de l'étalon du peptide commun (de séquence LGPLV*EQGR) entre 0,5 et 100 µg / mL. Il reste donc à étudier la linéarité du peptide endogène issu de l'Apo E4.

III.4.4) Gammes de plasma $\epsilon 4/\epsilon 4$ dans du plasma $\epsilon 3/\epsilon 3$

Afin de valider la répétabilité de l'ensemble du protocole de préparation (digestion enzymatique, oxydation et extraction), des gammes de plasma $\epsilon 4/\epsilon 4$ ont été réalisées dans un plasma blanc d'Apo E4, à savoir un plasma $\epsilon 3/\epsilon 3$ (cf. paragraphe II.4.2) page 141). Au total, neuf gammes ont été préparées (trois gammes par jour pendant trois jours). Le peptide marqué LGADMEDV*R a été ajouté à la concentration de 1,7 μg de peptide par mL de plasma quelle que soit la dilution de plasma réalisée. La courbe d'étalonnage a ainsi pu être tracée en corrigeant l'aire du peptide issu de l'Apo E4 endogène par celle de l'étalon marqué afin de s'affranchir de l'effet matrice qui peut varier entre deux points de gamme. Les résultats sont présentés sur la figure suivante :

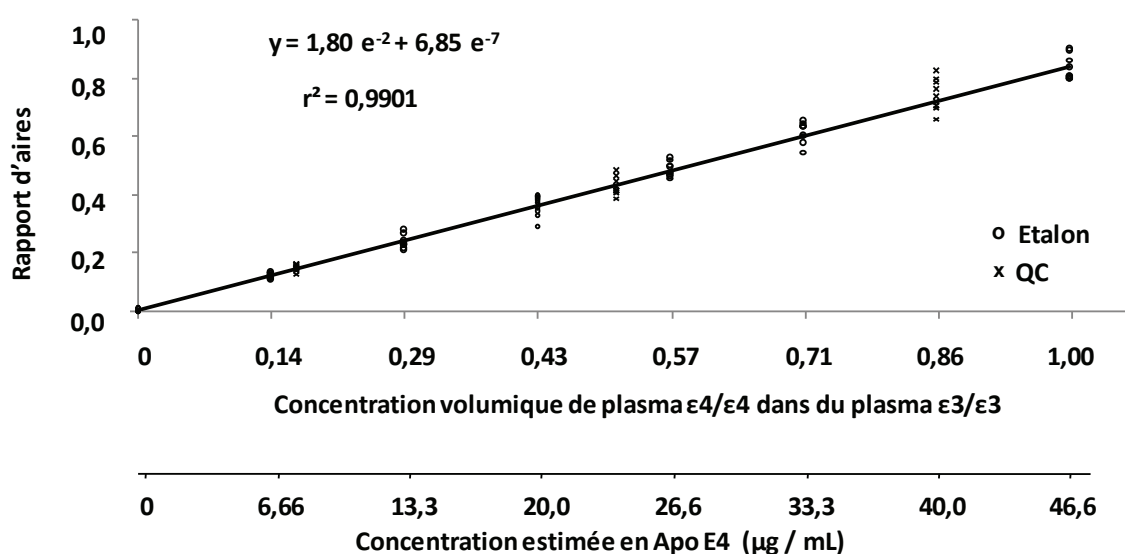


Figure 68 : Gammes de plasma $\epsilon 4/\epsilon 4$ dans du plasma $\epsilon 3/\epsilon 3$ ($n = 9$).

Le tableau suivant recense les exactitudes associées à chaque concentration ainsi que les coefficients de variation (en %) des neuf mesures réalisées pour chaque étalon et pour chaque contrôle qualité :

Tableau 12 : Exactitudes et coefficients de variation associés aux gammes de la Figure 68.

Type	n	Concentration estimée (µg / mL)	CV (%)	Exactitude (%)
Etalon	9	0,0	4,8	N/D ^(a)
Etalon	9	6,66	7,2	99,2
Etalon	9	13,3	9,5	97,3
Etalon	9	20,0	9,5	99,6
Etalon	9	26,6	5,0	101,2
Etalon	9	33,3	5,8	102,0
Etalon	9	46,6	5,0	98,9
Contrôle Qualité	9	7,99	6,6	99,7
Contrôle Qualité	9	24,0	6,8	98,6
Contrôle Qualité	9	40,0	7,2	102,9

^(a) N/D : Non déterminée

Puisqu'aucun plasma pour lequel la concentration absolue de l'Apo E4 n'est connue et que la protéine pure de concentration connue n'était pas disponible au laboratoire, l'abscisse de la Figure 68 correspond à la concentration volumique du plasma ϵ_4/ϵ_4 dans du plasma ϵ_3/ϵ_3 . En effet, pour réaliser ces gammes, différents volumes de plasma ϵ_4/ϵ_4 ont été ajoutés dans un plasma ϵ_3/ϵ_3 . La seconde abscisse correspond aux concentrations estimées d'Apo E4 : le plasma ϵ_4/ϵ_4 ayant été utilisé pour réaliser ces gammes a préalablement été dosé par LC-MS/MS en présence de l'étalon interne marqué ce qui a permis d'estimer sa concentration.

Le coefficient de détermination reste supérieur à 0,99 ce qui témoigne également d'une bonne répétabilité du processus de préparation d'échantillon de l'Apo E4 pour des concentrations allant de 6,7 à 46,7 µg / mL. De plus, quelque soit la concentration étudiée, l'exactitude est comprise entre 97 et 103% avec un coefficient de variation toujours inférieur à 10%.

Les exactitudes associées à chaque point de gamme et à chaque contrôle qualité sont rassemblées dans le Tableau 13 :

Tableau 13 : Exactitudes correspondant aux gammes de la Figure 68.

Type	Concentration estimée (µg / mL)	Exactitude	Type	Concentration estimée (µg / mL)	Exactitude
Etalon	0	N/D ^(a)	Etalon	33,3	104,9
Etalon	0	N/D	Etalon	33,3	107,7
Etalon	0	N/D	Etalon	33,3	108,5
Etalon	0	N/D	Etalon	33,3	105,5
Etalon	0	N/D	Etalon	33,3	100,5
Etalon	0	N/D	Etalon	33,3	105,4
Etalon	0	N/D	Etalon	33,3	90,8
Etalon	0	N/D	Etalon	33,3	95,3
Etalon	0	N/D	Etalon	33,3	99,8
Etalon	6,7	102,5	Etalon	46,6	102,7
Etalon	6,7	111,2	Etalon	46,6	105,9
Etalon	6,7	107,0	Etalon	46,6	106,7
Etalon	6,7	98,3	Etalon	46,6	95,1
Etalon	6,7	100,7	Etalon	46,6	94,9
Etalon	6,7	97,6	Etalon	46,6	95,4
Etalon	6,7	88,1	Etalon	46,6	95,6
Etalon	6,7	92,9	Etalon	46,6	94,6
Etalon	6,7	94,3	Etalon	46,6	99,3
Etalon	13,3	96,8	QC	7,99	98,3
Etalon	13,3	108,9	QC	7,99	108,8
Etalon	13,3	114,9	QC	7,99	107,6
Etalon	13,3	94,6	QC	7,99	102,4
Etalon	13,3	93,8	QC	7,99	97,6
Etalon	13,3	98,5	QC	7,99	97,2
Etalon	13,3	89,0	QC	7,99	88,3
Etalon	13,3	86,0	QC	7,99	103,7
Etalon	13,3	93,1	QC	7,99	93,4
Etalon	20,0	106,7	QC	24,0	106,7
Etalon	20,0	108,4	QC	24,0	97,5
Etalon	20,0	97,4	QC	24,0	102,2
Etalon	20,0	103,7	QC	24,0	89,4
Etalon	20,0	105,1	QC	24,0	110,5
Etalon	20,0	108,8	QC	24,0	95,4
Etalon	20,0	80,9	QC	24,0	96,9
Etalon	20,0	93,8	QC	24,0	93,8
Etalon	20,0	91,5	QC	24,0	94,6
Etalon	26,6	108,7	QC	39,9	110,9
Etalon	26,6	108,4	QC	39,9	109,1
Etalon	26,6	104,5	QC	39,9	113,8
Etalon	26,6	97,9	QC	39,9	99,3
Etalon	26,6	98,8	QC	39,9	101,6
Etalon	26,6	99,0	QC	39,9	105,2
Etalon	26,6	95,2	QC	39,9	96,9
Etalon	26,6	102,2	QC	39,9	97,1
Etalon	26,6	95,8	QC	39,9	91,7

^(a) N/D : Non déterminée

Ce tableau permet de voir qu'à l'exception d'un point, les exactitudes sont comprises entre 85 et 115 %. L'exception concerne un point à 20 µg / mL pour lequel elle n'est que de 80,9 %. Cependant, un point peut être exclu parmi les 63 utilisés pour calculer le modèle de régression linéaire.

Pour les trois niveaux de contrôle qualité, les variations intra et inter jour ont également été calculées :

Tableau 14 : Exactitudes et coefficients de variation intra-jour et inter-jour associés aux gammes de la Figure 68.

variation intra-jour (n = 3)				variation inter-jour (n = 9)		
concentration estimée (µg / mL)	concentration déterminée (moyenne +/- écart- type)	CV (%)	Exactitude (%)	concentration déterminée (moyenne +/- écart-type)	CV (%)	Exactitude (%)
7,99	8,38 +/- 0,46	5,49	104,9	7,96 +/- 0,53	6,6	99,7
24	24,5 +/- 1,1	4,47	102,1	23,6 +/- 1,6	6,8	98,6
40	44,5 +/- 1,0	2,15	111,3	41,1 +/- 3,0	7,2	102,8

Ce tableau montre que le protocole de préparation d'échantillon est répétable au sein de la même journée puisque les coefficients de variation déterminés pour ces trois niveaux de concentration sont compris entre 2,2 et 5,5%. De même, après avoir répété la préparation de ces échantillons sur trois journées différentes, les CV restent inférieurs à 7,2 % et l'exactitude est proche de 100 % ce qui témoigne de la bonne répétabilité de l'ensemble du protocole de préparation des échantillons à des concentrations d'Apo E4 endogènes très proches de celles qui seront retrouvées ultérieurement lors des dosages.

Toutes les gammes du paragraphe III.4) permettent de valider la répétabilité de la préparation d'échantillon (de la digestion à l'extraction) tout en gardant une réponse linéaire jusqu'à 46,6 µg / mL pour le peptide spécifique de l'Apo E4. L'étude de linéarité de la réponse de ce peptide par dilution de plasma ϵ_4/ϵ_4 dans du plasma ϵ_3/ϵ_3 n'a pas pu être réalisée au-delà de cette concentration par manque de plasma ϵ_4/ϵ_4 plus concentré. On peut toutefois supposer que la réponse restera linéaire au-delà de 46,6 µg / mL puisque cette réponse était linéaire jusqu'à 100 µg / mL lors des gammes de peptide synthétique dans l'eau (cf. Figure 66 page 165). De plus, le rendement de digestion de l'Apo E4 dans le plasma doit probablement être le même lorsque cette protéine est concentrée à 46,6 µg / mL ou à 100 µg / mL. En effet, ce rendement pourrait être affecté si la quantité de trypsine devenait insuffisante pour palier l'augmentation de la quantité de protéines à digérer. Puisque les 53,4 µg / mL d'écart ne représentent même pas 0,1% de la quantité de protéine présente dans le plasma, le rapport entre la concentration totale de protéines dans le plasma et la quantité de trypsine ajoutée (200 µg pour 100 µL de plasma) ne va donc pas changer. Par conséquent, le rendement de digestion ne devrait pas être affecté par des concentrations d'Apo E4 supérieures à 46,6 µg / mL.

Le point de gamme le plus bas pour l'Apo E4 est de 6,66 µg / mL ce qui est supérieur aux concentrations qui seront rencontrées lors des dosages ultérieurs. Puisqu'à cette concentration, les

coefficients de variations sont inférieurs à 15% et que les exactitudes sont comprises entre 85 et 115%, la limite de quantification de la méthode est située en dessous de 6,66 $\mu\text{g} / \text{mL}$. Cependant, la recherche précise de cette limite n'a pas d'intérêt dans cette étude puisque les concentrations d'Apo E4 seront supérieures à 6,66 $\mu\text{g} / \text{mL}$.

Puisque ni l'Apo E pure, ni une matrice blanche d'Apo E ne sont disponibles, des gammes d'Apo E n'ont pas pu être réalisées dans du plasma humain. Cependant, les réponses du peptide marqué et du peptide synthétique léger sont les mêmes dans l'eau. De plus, la réponse du peptide marqué est linéaire dans le plasma entre 0,5 et 100 $\mu\text{g} / \text{mL}$. On peut donc supposer que la réponse du peptide endogène soit également linéaire dans le plasma sur cette plage de concentrations. Concernant la répétabilité de digestion de l'Apo E, le coefficient de variation sur les aires mesurées du peptide endogène (corrigé par son étalon) est de seulement 9,2 % ($n = 81$). Cette valeur tient compte non seulement de l'ensemble du protocole de préparation d'échantillon mais également des variations de concentration de l'Apo E totale. En effet, le plasma $\epsilon 4/\epsilon 4$ utilisé lors de ces gammes a une concentration estimée de 46,6 $\mu\text{g} / \text{mL}$ en Apo E totale et le plasma $\epsilon 3/\epsilon 3$ a été dosé à 43,0 $\mu\text{g} / \text{mL}$. Cet écart de 7,7% entre le point de gamme le moins concentré et le plus concentré va augmenter la variation mesurée pour déterminer la répétabilité de la digestion. En effet, si on fait le même calcul indépendamment pour chaque point de gamme (= 9 par niveau de concentration), ce coefficient est alors inférieur à 5 % pour huit niveaux de concentrations sur les dix (il est inférieur à 9 % pour les deux autres niveaux de concentration). Ces résultats permettent de conclure que la digestion de l'Apo E est très répétable. Bien que le rendement absolu de digestion ne puisse être calculé, on peut supposer qu'il soit très proche de 100 % car l'Apo E a été répertoriée comme étant une protéine facile à digérer²⁰. De plus, même si ce rendement n'est pas de 100 %, l'objectif de l'étude est de comparer le taux d'Apo E totale et d'Apo E4 entre des plasmas issus d'individus sains et d'autres issus d'individus atteints de la maladie d'Alzheimer. Par conséquent, même si le dosage est biaisé à cause d'une digestion incomplète, des différences entre ces deux groupes peuvent être trouvées puisque le protocole de préparation d'échantillon est répétable. En effet, le biais éventuel introduit par une digestion incomplète sera le même dans tous les échantillons et ne va donc pas empêcher de trouver une différence de taux plasmatique d'Apo E ou d'Apo E4 entre les deux cohortes d'individus (sain vs Alzheimer). La cohorte de patients a pu par la suite être dosée.

III.5) Dosage de l'Apo E et de l'Apo E4 dans le plasma

Après avoir bien validé la répétabilité de tout le protocole d'oxydation ainsi que la linéarité de la réponse des peptides rapporteurs sélectionnés, nous avons pu doser de nombreux échantillons afin de déterminer si la concentration plasmatique d'Apo E totale et / ou d'Apo E4 pouvait permettre de différencier les patients atteints de la maladie d'Alzheimer des autres. Cette étude a également pour but d'éclaircir les résultats contradictoires obtenus jusqu'à présent par des dosages ELISA.

III.5.1) Mise en place d'un contrôle au cours des dosages

Pour réaliser l'étude, 711 plasmas étaient disponibles avec le génotype de la majorité des individus. L'Apo E totale et l'Apo E4 ont donc été dosées dans ces 711 échantillons. Une campagne de dosage d'une telle ampleur a été réalisée sur un intervalle de temps de quasiment deux mois sachant qu'un peu plus de cent échantillons étaient préparés chaque semaine. Afin de vérifier qu'aucun biais ne soit introduit dans le dosage lors de cette période, les échantillons ont dans un premier temps été mélangés de manière aléatoire (pour ne pas doser les plasmas issus de patients atteints de la maladie d'Alzheimer après les échantillons témoins ou vice-versa). De plus, 200 μ L de plasma ont été prélevés dans 40 tubes puis mélangés. Ces 8 mL de plasma ont ensuite été aliquotés et ont servi d'échantillon contrôle qualité lors des dosages. Le Tableau 15 liste les génotypes des 40 plasmas utilisés pour réaliser le contrôle qualité :

Tableau 15 : Génotype des 40 plasmas utilisés pour réaliser l'échantillon servant de contrôle qualité.

Génotype	n
$\epsilon 2/\epsilon 3$	1
$\epsilon 2/\epsilon 4$	1
$\epsilon 3/\epsilon 3$	15
$\epsilon 3/\epsilon 4$	15
$\epsilon 4/\epsilon 4$	5
Inconnu ($\epsilon 2/\epsilon 2$, $\epsilon 2/\epsilon 3$ ou $\epsilon 3/\epsilon 3$)	2
Inconnu ($\epsilon 2/\epsilon 4$ ou $\epsilon 3/\epsilon 4$)	1
total	40

Les 711 échantillons ont été préparés en 17 séries. Pour chaque série, l'échantillon servant de contrôle qualité a été préparé (digestion, oxydation, extraction) et dosé en triplicata, excepté pour la première série où le contrôle qualité a été préparé en cinq exemplaires. De plus, lors des deux dernières séries, un contrôle qualité a été retiré suite à un problème lors de la préparation. Au total, cet échantillon a été dosé 51 fois sur 17 jours de préparation. Les résultats de ces dosages sont présentés sur la Figure 69 :

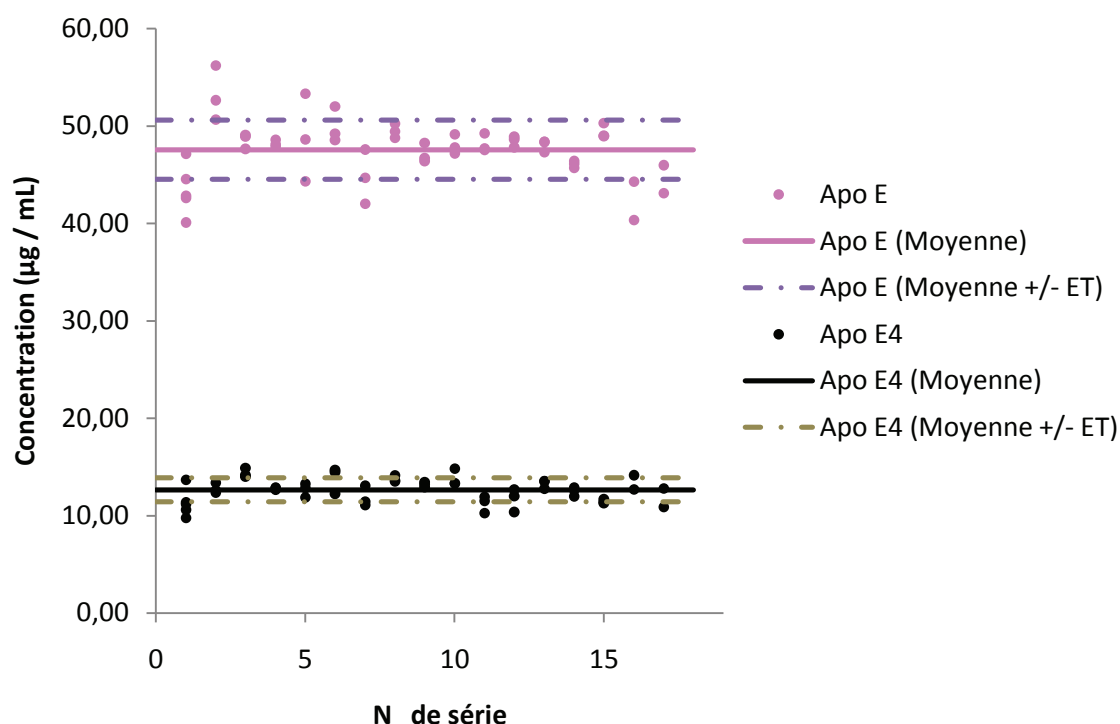


Figure 69 : Dosage de l'Apo E et de l'Apo E4 dans l'échantillon de contrôle qualité (n = 51).

Pour l'Apo E totale et l'Apo E4, la moyenne mesurée est représentée par un trait plein et la moyenne plus ou moins l'écart-type par des pointillés. La moyenne et la répétabilité de ces mesures sont présentées dans le tableau suivant :

Tableau 16 : Moyennes et coefficients de variation des valeurs mesurées d'Apo E et d'Apo E4 sur les 51 préparations de l'échantillon contrôle qualité.

	Apo E	Apo E4
Moyenne +/- Ecart-type (µg / mL)	47,6 +/- 3,0	12,6 +/- 1,2
CV (%)	6,4	9,7

Dans cet échantillon, les taux moyens d'Apo E et d'Apo E4 sont respectivement de 47,6 et 12,6 µg / mL. Les coefficients de variation sont dans les deux cas inférieurs à 10% ce qui témoigne d'une bonne répétabilité de l'ensemble du processus de préparation d'échantillon tout au long de la période de dosage. Le fait que les taux mesurés d'Apo E et d'Apo E4 soient constants sur cette période montre également deux choses. D'une part, le stockage des échantillons dans notre laboratoire n'a pas engendré de détérioration de ceux-ci. D'autre part, la concentration des peptides marqués ayant servi d'étalon interne est restée stable pendant toute la période de dosage.

La stabilité des échantillons et des étalons ainsi que la répétabilité de l'ensemble du processus de préparation des échantillons ont pu permettre une comparaison directe des taux d'Apo E et d'Apo E4 déterminées dans les 711 échantillons entre les individus sains et ceux atteints de la maladie d'Alzheimer.

III.5.2) Résultat des dosages

Sur ces 711 échantillons, ceux dont le résultat en LC-MS/MS donnait un génotype en désaccord avec celui attendu ont été exclus. En effet, il a déjà été rapporté que le taux d'Apo E totale était lié au génotype. Une décroissance du taux d'Apo E est décrite selon la possession des allèles suivants : $\epsilon 2 > \epsilon 3 > \epsilon 4$ ^{220, 227, 231, 262}. Connaître le génotype de chaque échantillon est donc indispensable pour comparer les deux cohortes car il faudra les traiter génotype par génotype. Les échantillons exclus concernent : (i) les échantillons n'étant pas supposés posséder l'allèle $\epsilon 4$ et pour lesquels l'Apo E4 a été détectée, (ii) les échantillons étant supposés posséder l'allèle $\epsilon 4$ et pour lesquels l'Apo E4 n'a pas été détectée, (iii) les échantillons supposés $\epsilon 4/\epsilon 4$ pour lesquels la concentration déterminée à partir du peptide commun est différente de celle déterminée à partir du peptide spécifique de l'Apo E4, (iv) les échantillons étant supposés posséder un seul allèle $\epsilon 4$ pour lesquels la concentration déterminée à partir du peptide commun est la même que celle déterminée à partir du peptide spécifique de l'Apo E4 et, (v) les échantillons pour lesquels le génotype n'était pas renseigné. Dans les quatre premiers cas, les échantillons ont été entièrement préparés une seconde fois et le résultat du dosage par LC-MS/MS a abouti aux mêmes conclusions ce qui laisse supposer une erreur dans le génotypage et / ou dans l'étiquetage des échantillons. Ces cinq possibilités ont entraîné le rejet de 36 échantillons. De plus, pour deux échantillons, le taux d'Apo E4 mesuré était inférieur à 6,66 $\mu\text{g} / \text{mL}$ qui est le point le plus bas obtenu lors des gammes de plasma (*cf.* Figure 68 page 168). Ces deux échantillons ont donc également été retirés. La mesure des taux plasmatiques d'Apo E et d'Apo E4 a donc été établie sur 673 plasmas.

L'objectif de l'étude est de comparer le taux d'Apo E totale et d'Apo E4 entre deux cohortes de plasmas (patients atteints de la maladie d'Alzheimer et témoins) afin d'essayer de les distinguer. Puisque le génotype a une forte influence sur le taux d'Apo E, nous nous sommes d'abord intéressés au génotype de chacun des 673 échantillons :

Tableau 17 : Génotypes des 223 plasmas témoins et des 450 atteints de la maladie d'Alzheimer.

Génotype	n		
	Témoin	Alzheimer	Total
$\epsilon 2/\epsilon 2$	2	1	3
$\epsilon 2/\epsilon 3$	20	11	31
$\epsilon 2/\epsilon 4$	6	20	26
$\epsilon 3/\epsilon 3$	146	182	328
$\epsilon 3/\epsilon 4$	47	175	222
$\epsilon 4/\epsilon 4$	2	61	63
Total	223	450	673

Dans le but de vérifier l'influence du génotype sur le taux moyen d'Apo E totale, les taux mesurés ont été comparés entre chaque génotype. Afin de ne pas introduire une variation liée à l'état de santé du donneur, cette comparaison a été réalisée seulement sur les individus atteints de la maladie d'Alzheimer (et l'unique individu $\epsilon 2/\epsilon 2$ a été exclu car un seul échantillon risque de ne pas être représentatif de l'ensemble des individus $\epsilon 2/\epsilon 2$). La comparaison des taux mesurés a été réalisée par analyse de variance à un facteur via l'utilitaire d'analyse d'Excel 2007. Un exemple complet d'analyse de variance est présenté en annexe B. Les moyennes (et l'écart-type) obtenues pour chaque génotype ainsi que les valeurs p correspondant à la probabilité que les moyennes entre deux génotypes soient identiques sont reportées dans le tableau suivant :

Tableau 18 : Taux d'Apo E moyens mesurés chez les 449 individus atteints de la maladie d'Alzheimer en fonction du génotype.

Génotype	Apo E totale (moyenne +/- écart-type)	p
$\epsilon 2/\epsilon 3$	77,3 +/- 10,5	0,040*
$\epsilon 2/\epsilon 4$	66,6 +/- 14,5	0,015*
$\epsilon 3/\epsilon 3$	57,1 +/- 16,5	4,36E-04*
$\epsilon 3/\epsilon 4$	51,4 +/- 14,0	1,76E-06*
$\epsilon 4/\epsilon 4$	41,0 +/- 15,1	

Les résultats confirment une décroissance significative ($p < 0,05$) du taux d'Apo E selon les génotypes $\epsilon 2/\epsilon 3 > \epsilon 2/\epsilon 4 > \epsilon 3/\epsilon 3 > \epsilon 3/\epsilon 4 > \epsilon 4/\epsilon 4$. Ces résultats sont donc conformes aux taux qui ont été décrits dans la littérature. De plus, la décroissance de la quantité totale d'Apo E en fonction du génotype permet de renforcer la qualité du dosage proposé par LC-MS/MS

De plus, le Tableau 17 page 174 confirme que l'allèle $\epsilon 3$ est le plus abondant dans la population puisque quasiment la moitié des échantillons dosés ont le génotype $\epsilon 3/\epsilon 3$. De même, l'allèle $\epsilon 2$ est le plus rare : seulement 3 échantillons ont le génotype $\epsilon 2/\epsilon 2$. Ceci est en accord avec la répartition des allèles $\epsilon 2$, $\epsilon 3$ et $\epsilon 4$ dans la population : l'allèle $\epsilon 3$ est le plus fréquent alors que l'allèle $\epsilon 2$ est le plus rare. De plus, parmi les 63 échantillons $\epsilon 4/\epsilon 4$, seulement 2 ne sont pas porteurs de la maladie d'Alzheimer (et 47 échantillons parmi les 222 pour le génotype $\epsilon 3/\epsilon 4$). Ceci est dû au fait que la présence de l'allèle $\epsilon 4$ augmente le risque de développer la maladie d'Alzheimer par un facteur supérieur à deux pour les individus porteurs d'un seul allèle ou supérieur à dix pour les homozygotes $\epsilon 4/\epsilon 4$ ²⁶³.

Afin de ne pas introduire de biais dans la comparaison des taux d'Apo E et d'Apo E4, les résultats entre les individus témoins (en bleu) et les porteurs de la maladie d'Alzheimer (en rouge) ont été comparés en fonction du génotype. Ces résultats sont présentés sur la Figure 70 :

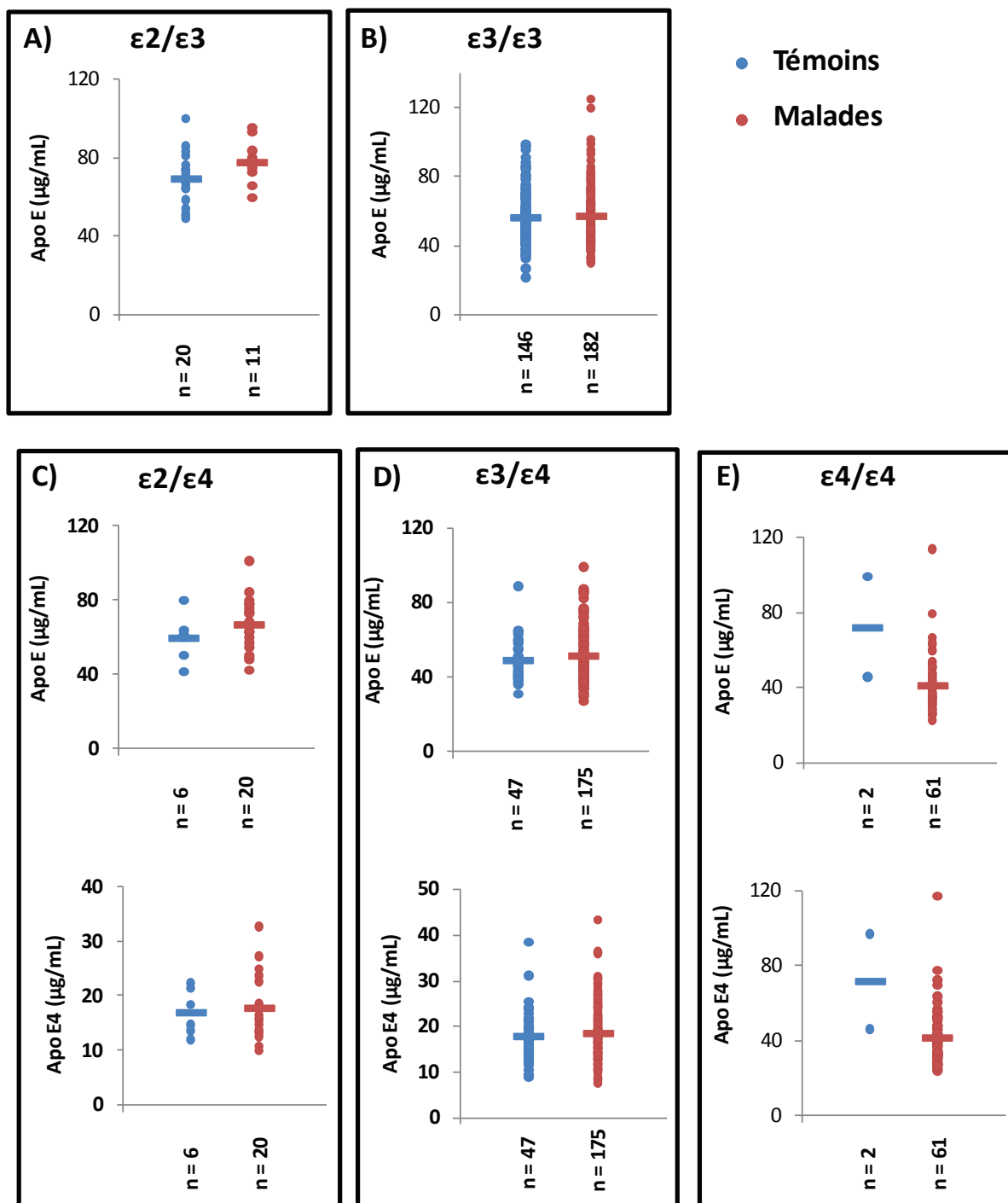


Figure 70 : Résultats des dosages de l'Apo E et de l'Apo E4 sur les échantillons témoins (en bleu) et les patients atteints de la maladie d'Alzheimer (en rouge) en fonction de leur génotype : $\epsilon 2/\epsilon 3$ (A), $\epsilon 3/\epsilon 3$ (B), $\epsilon 2/\epsilon 4$ (C), $\epsilon 3/\epsilon 4$ (D) et $\epsilon 4/\epsilon 4$ (E).

La valeur moyenne est représentée dans chaque cas par un trait horizontal. Ce graphique illustre la très grande variabilité biologique entre les différents patients quel que soit leur génotype. La concentration à elle seule ne permet pas de distinguer directement les patients sains de ceux atteints de la maladie d'Alzheimer. Les taux mesurés au sein de chaque groupe ont donc été comparés par une analyse de variance à un facteur afin de déterminer si une différence statistiquement

significative entre chaque groupe pouvait être dégagée. Celle-ci reflèterait seulement une tendance et le taux seul d'Apo E ou d'Apo E4 ne permettrait en aucun cas de diagnostiquer la maladie d'Alzheimer puisque la répartition des concentrations mesurées entre les deux groupes se recoupe quel que soit le génotype de l'individu. Les résultats de cette analyse de variances sont présentés dans le tableau suivant :

Tableau 19 : Taux moyens d'Apo E et d'Apo E4 chez les individus atteints de la maladie d'Alzheimer et chez les témoins en fonction du génotype.

Groupe	Génotype	n	Apo E (moyenne + / - écart-type)	p	Apo E4 (moyenne + / - écart-type)	p
Témoin	$\epsilon 2/\epsilon 3$	20	68,5 +/- 13,0	0,065	17,0 +/- 4,3	0,751
Alzheimer		11	77,2 +/- 10,5			
Témoin	$\epsilon 2/\epsilon 4$	6	59,3 +/- 13,0	0,279	17,0 +/- 4,3	0,751
Alzheimer		20	66,6 +/- 14,5		17,8 +/- 5,8	
Témoin	$\epsilon 3/\epsilon 3$	146	55,6 +/- 14,5	0,394	17,6 +/- 5,5	0,357
Alzheimer		182	57,1 +/- 16,5			
Témoin	$\epsilon 3/\epsilon 4$	47	48,6 +/- 10,4	0,199	17,6 +/- 5,5	0,357
Alzheimer		175	51,4 +/- 14,0		18,5 +/- 6,0	
Témoin	$\epsilon 4/\epsilon 4$	2	71,9 +/- 37,8	0,008*	71,2 +/- 35,9	0,013*
Alzheimer		61	41,0 +/- 15,1		41,2 +/- 15,7	

Ce tableau indique que pour les génotypes $\epsilon 2/\epsilon 3$, $\epsilon 2/\epsilon 4$, $\epsilon 3/\epsilon 3$ et $\epsilon 3/\epsilon 4$, aucune différence significative n'est trouvée pour le taux d'Apo E ou d'Apo E4 ($p > 0,05$). En revanche, les résultats pour le génotype $\epsilon 4/\epsilon 4$ indiqueraient des taux plus élevés chez les témoins (valeur moyenne de 71,9 $\mu\text{g} / \text{mL}$ pour les témoins et 41 $\mu\text{g} / \text{mL}$ pour les malades). Cependant, seulement deux échantillons témoins étaient disponibles. Parmi ces deux échantillons l'un est mesuré à 45,2 $\mu\text{g} / \text{mL}$ et l'autre à 98,7 $\mu\text{g} / \text{mL}$. La moyenne mesurée élevée est liée à ce second échantillon. Puisque le taux d'Apo E chez un individu $\epsilon 4/\epsilon 4$ doit être inférieur à celui mesuré chez un individu $\epsilon 3/\epsilon 4$ (théorie qui est vérifiée chez les patients atteints de la maladie d'Alzheimer pour lesquels 61 plasmas $\epsilon 4/\epsilon 4$ étaient disponibles), cette valeur devrait être inférieure à 48,3 $\mu\text{g} / \text{mL}$. Ce point de contrôle permet de mettre en évidence le fait que l'échantillon pour lequel le taux d'Apo E est de 98,7 $\mu\text{g} / \text{mL}$ est probablement un point aberrant et ne peut pas être gardé pour comparer le taux d'Apo E entre les patients Alzheimer et les témoins. Si cet échantillon est retiré, la différence entre les deux groupes n'est alors plus significative ($p = 0,780$ pour l'Apo E et $p = 0,771$ pour l'Apo E4). Il faudrait cependant disposer de plus d'échantillons $\epsilon 4/\epsilon 4$ témoins afin de confirmer le fait que l'échantillon pour lequel le taux d'Apo E mesuré à 98,7 $\mu\text{g} / \text{mL}$ soit effectivement un échantillon aberrant. En conclusion, le taux plasmatique d'Apo E totale ou d'Apo E4 ne permet pas d'établir une différence entre les patients atteints de la maladie d'Alzheimer et les témoins ce qui confirme certaines études réalisées par ELISA²³²⁻²³⁶.

Puisque la moyenne seule ne permet pas de distinguer les échantillons sains et malades, des analyses en composantes principales (ACP) ont été réalisées. L'ACP permet de représenter un grand nombre de variables dans un espace en deux ou trois dimensions par le calcul de nouveaux axes, nommés composantes qui sont le reflet des variables disponibles (*cf.* annexe B pour plus de détails). Pour ces représentations, de nouvelles variables étaient présentes pour chaque échantillon : le sexe des patients, leur âge, et trois sites de polymorphisme au niveau d'un nucléotide (SNP) : en position 219, 427 et 491. En effet, en position 219, les individus peuvent avoir l'enchaînement de nucléotides GG, GT ou TT (G étant la guanine et T la thymine) ; en position 427, il existe les formes TT, TC ou CC (C étant la cytosine) et en position 491, il peut se trouver les enchaînements AA, AT ou TT (A étant l'adénine). Sur les 673 échantillons dosés, l'ensemble des informations précédentes n'étaient disponibles que pour 570 échantillons. L'analyse de données a donc été réalisée en excluant les 103 échantillons pour lesquels des données manquaient.

Dans un premier temps, une analyse sur l'âge des donneurs a été réalisée :

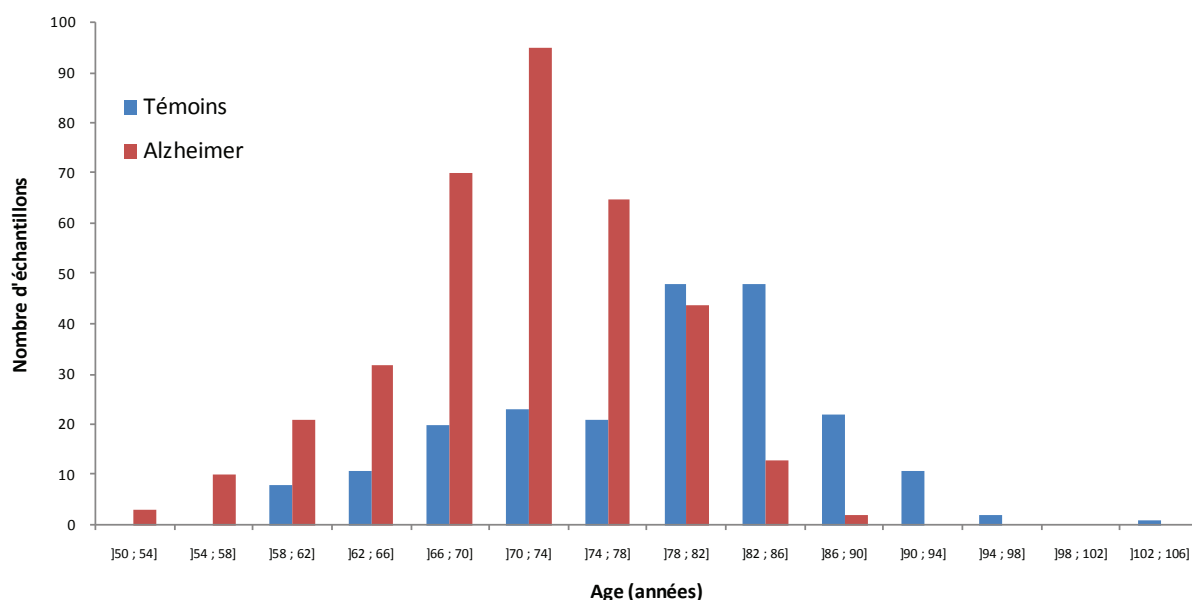


Figure 71 : Répartition des échantillons témoins et malades en fonction de l'âge des patients.

Ce graphique permet de voir que la répartition des âges n'est pas la même entre les échantillons témoins et malades. En effet, les individus sains ont 79 ans en moyenne contre seulement 72 ans pour les malades. L'influence de l'âge sur le taux d'Apo E et d'Apo E4 a donc été recherchée par ACP :

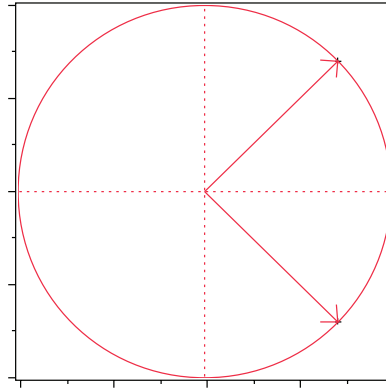


Figure 72 : Analyse en composantes principales de l'influence de l'âge sur le taux d'apolipoprotéine E.

Cette ACP a été réalisée en prenant seulement les plasmas de patients atteints de la maladie d'Alzheimer, dont le génotype est $\epsilon 3/\epsilon 4$ et pour lesquels toutes les informations étaient disponibles (sexe, âge et les trois SNP) (soit 141 échantillons). Les deux axes représentant l'âge et le taux d'Apo E (ou d'Apo E4) mesuré étant perpendiculaires, ces deux variables sont indépendantes. L'âge du donneur n'a donc pas d'influence sur le taux plasmatique d'Apo E ou d'Apo E4. Il faut toutefois souligner le fait qu'il a déjà été rapporté que le taux d'Apo E augmente un peu avec l'âge. L'étude s'est cependant penchée sur des tranches de 10 ans avec une population allant de 25 à 64 ans. Le taux d'Apo E atteint un plateau vers $41 \mu\text{g} / \text{mL}$ à partir de 35 ans pour les hommes (ce taux était de $38 \mu\text{g} / \text{mL}$ pour les plus jeunes) alors qu'il augmente progressivement pour les femmes (il passe de 36 à $42,6 \mu\text{g} / \text{mL}$)²⁶⁴. La majorité des donneurs de l'étude actuelle sont plus âgés. Dans ce cas, le taux d'Apo E ou d'Apo E4 ne semble donc pas être corrélé avec l'âge du donneur (qui va de 50 à 105 ans). L'ensemble des échantillons témoins a donc été conservé pour les analyses suivantes.

Pour chaque génotype, une ACP a donc été réalisée en prenant comme variables quantitatives le taux plasmatique d'Apo E et d'Apo E4 et comme variables qualitatives les cinq autres facteurs disponibles (âge, sexe et les trois polymorphismes). Par exemple, voici la projection obtenue pour les échantillons $\epsilon 3/\epsilon 3$:

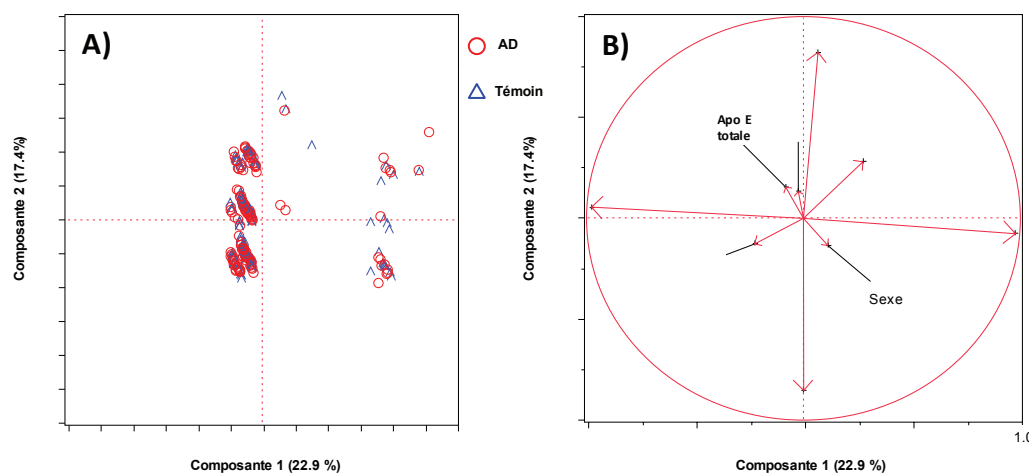


Figure 73 : Analyse en composantes principales des résultats obtenus pour le génotype $\epsilon 3/\epsilon 3$.

Une explication plus détaillée des étapes préliminaires ayant permis d'aboutir à ces résultats est donnée en Annexe B. Dans la Figure 73 B sont projetées les composantes permettant de définir les axes du graphique de la partie A. Pour qu'une variable soit représentative, il faut que ses axes soient projetés près du cercle des corrélations de rayon 1. La Figure 73 B montre donc que seulement quatre variables sont bien représentées : APOE219A, APOE219B, APOE427A et APOE427B. Ces variables correspondent aux différentes combinaisons de nucléotides pouvant être rencontrées en position 219 et 427. Les autres descripteurs sont mal projetés sur le cercle des corrélations et ne sont donc pas représentatifs. Ainsi, l'axe 1 (abscisses) dépend essentiellement du polymorphisme en position 427 et représente 22,9 % de la variation observée dans le taux d'Apo E alors que l'axe 2 (ordonnées) dépend quant à lui du polymorphisme en position 219 et représente 17,4 % de la variation observée. De ce fait, deux groupes sont clairement distingués dans la partie A de la Figure 73 : à gauche, les échantillons dont la séquence nucléotidique en position 427 est TT, et à droite, celle dont la séquence est TC. Dans chacun de ces deux groupes, trois sous-groupes apparaissent verticalement et sont le reflet du polymorphisme en position 219. Au sein de chacun de ces sous-groupes, deux séries parallèles sont distinguées. Ces deux séries correspondent au sexe des patients. En revanche, au sein de chaque couche, il n'y a pas de distinction entre les témoins (triangles bleus) et les malades (cercles rouges). Ceci est notamment lié au fait que seulement 40 % de la variation observée dans le taux d'Apo E mesuré est expliquée par ces deux axes. D'autres facteurs entrent donc en jeu et il faudrait disposer de plus de données sur chaque échantillon afin d'expliquer la plus grande variation possible.

Puisque l'Apo E4 semble impliquée dans les mécanismes conduisant au développement de la maladie d'Alzheimer, la même analyse a été effectuée pour les échantillons $\epsilon 3/\epsilon 4$ mais en tenant compte du taux d'Apo E4 :

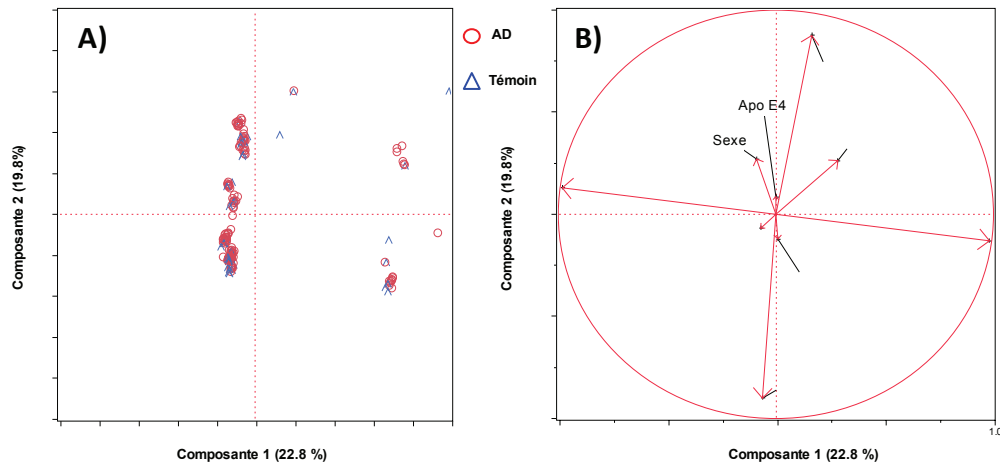


Figure 74 : Analyse en composantes principales des résultats obtenus pour le génotype $\epsilon 3/\epsilon 4$.

Les mêmes conclusions que pour le génotype $\epsilon 3/\epsilon 3$ peuvent être tirées : les axes 1 et 2 dépendent respectivement des polymorphismes en position 427 et 219 et expliquent environ 40 % de la variation observée dans la mesure du taux d'Apo E4. Les autres descripteurs sont mal projetés sur le cercle de corrélation et ne sont donc pas représentatifs. Les mêmes groupes et sous-groupes apparaissent dans la partie A et correspondent aux polymorphismes en position 427 et 219 mais aussi au sexe des patients. Ici non plus, aucune distinction n'est faite entre les témoins et les patients atteints de la maladie d'Alzheimer.

Puisque deux couches représentant le sexe de l'individu sont distinguées sur chaque ACP, le taux moyen d'Apo E et d'Apo E4 a été calculé chez les hommes et chez les femmes. Les résultats ont également été représentés en fonction de chaque génotype :

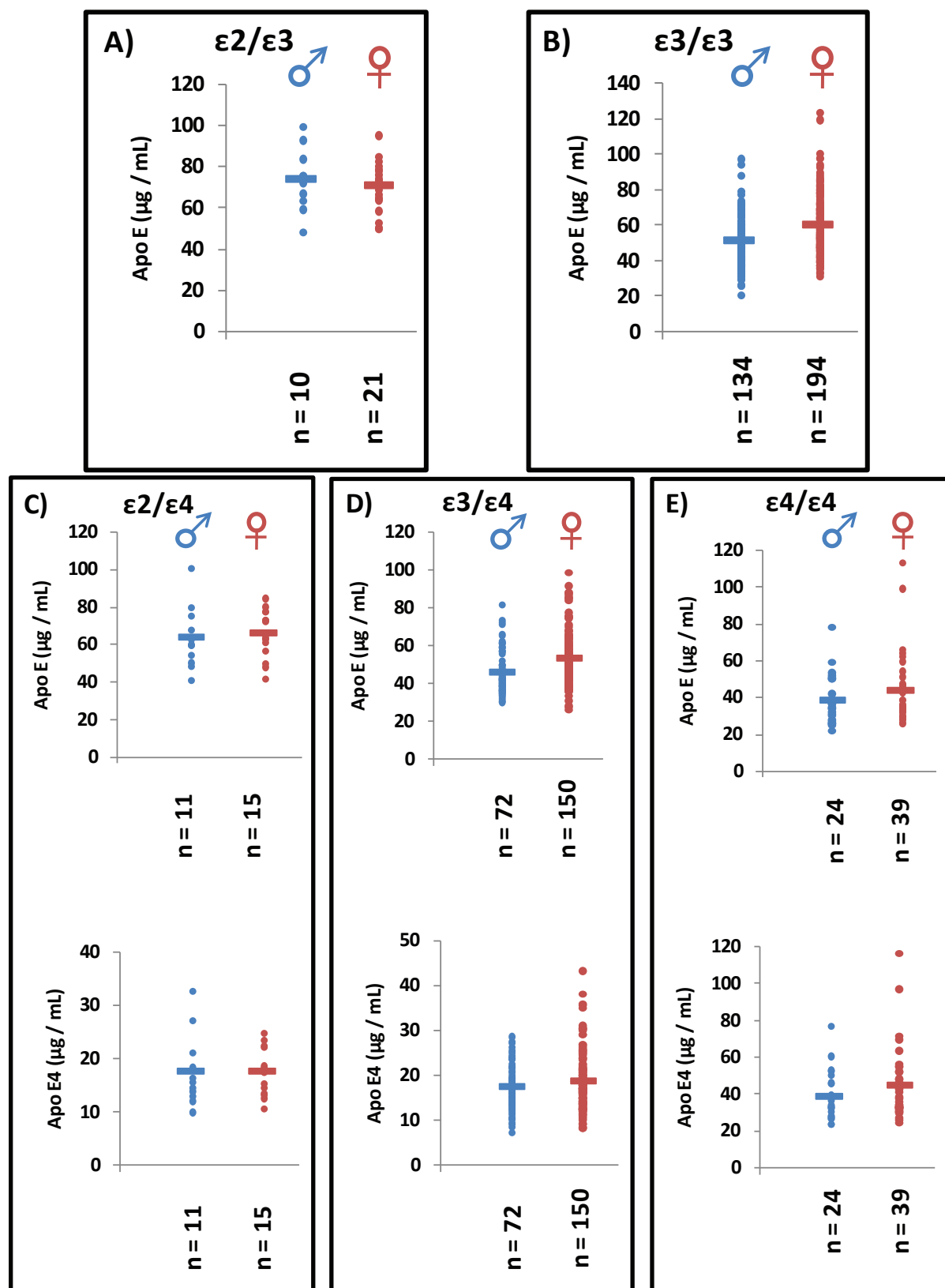


Figure 75 : Résultats des dosages de l'Apo E et de l'Apo E4 chez les hommes (en bleu) et les femmes (en rouge) en fonction de leur génotype : $\epsilon 2/\epsilon 3$ (A), $\epsilon 3/\epsilon 3$ (B), $\epsilon 2/\epsilon 4$ (C), $\epsilon 3/\epsilon 4$ (D) et $\epsilon 4/\epsilon 4$ (E).

A l'exception du génotype $\epsilon 2/\epsilon 3$, le taux d'Apo E totale ou d'Apo E4 mesuré chez les femmes est supérieur à celui rencontré chez les hommes. Ces résultats confirment plusieurs travaux qui avaient abouti aux mêmes conclusions (un taux d'Apo E supérieur chez les femmes)²⁶⁵⁻²⁶⁷. Il faut cependant s'attarder sur une grande étude réalisée sur plus de 4000 donneurs²⁶⁸. Cette étude a conclu que le taux d'Apo E était supérieur chez les femmes jusqu'à 26 ans et que cette tendance s'inversait par la suite. Si l'on s'intéresse seulement aux individus de plus de 26 ans, l'étude a été réalisée sur 923 femmes (âge moyen de 40 ans) et 885 hommes (âge moyen de 42 ans). Les taux moyens d'Apo E mesurés sont respectivement de 48,6 $\mu\text{g} / \text{mL}$ chez les hommes et 44,1 $\mu\text{g} / \text{mL}$ chez les femmes. Deux raisons expliquent que le taux mesuré est supérieur chez les hommes dans cette cohorte. D'abord, le taux d'Apo E augmente avec la consommation d'alcool et de tabac²⁶⁹. Or les 885 hommes de cette étude fument en moyenne deux fois plus de cigarettes et consomment cinq fois plus d'alcool que les femmes. Une analyse de variance a été réalisée et n'a pas révélé de lien entre le taux d'Apo E et ces deux paramètres. Cependant, cette analyse de variance s'est penchée sur ces deux facteurs séparément l'un de l'autre. Il se pourrait que la consommation d'alcool amplifie l'augmentation du taux d'Apo E liée à la consommation de tabac et que cette amplification devienne alors significative. De plus, l'âge des femmes de cette étude est de 39,9 ans avec un écart-type de seulement 4,8 ans. En admettant que la répartition des âges suive une loi normale, cela signifie que 95 % des femmes de cette étude ont entre 30,3 et 49,5 ans. Or, nous avons vu précédemment que le taux d'Apo E devenait supérieur chez les femmes au-delà de 55 ans car ce taux augmente chez les femmes alors qu'il se stabilise chez les hommes²⁶⁴. Puisque la majorité des donneurs de notre étude a plus de 60 ans, il est donc logique que nous ayons trouvé un taux d'Apo E supérieur chez les femmes.

Concernant le génotype $\epsilon 2/\epsilon 3$, il faut souligner le fait que peu d'échantillons masculins sont disponibles ($n = 10$). De plus, la variabilité est assez grande puisque les taux mesurés vont de 49 à 100 $\mu\text{g} / \text{mL}$. Un nombre d'échantillons plus important permettrait probablement de confirmer que le taux d'Apo E chez les femmes est supérieur à celui des hommes mêmes pour les individus porteurs du génotype $\epsilon 2/\epsilon 3$. De manière plus intéressante, le taux moyen d'Apo E totale entre les hommes et les femmes est statistiquement différent pour les génotypes $\epsilon 3/\epsilon 3$ ($p = 3,76.10^{-7}$) et $\epsilon 3/\epsilon 4$ ($p = 2,97.10^{-4}$). En revanche, le taux d'Apo E4 n'est pas différent ($p = 0,176$) pour le génotype $\epsilon 3/\epsilon 4$.

De nouvelles analyses de variance à un facteur ont alors été réalisées afin de comparer les taux d'Apo E chez les hommes porteurs du génotype $\epsilon 3/\epsilon 3$ afin de distinguer les individus sains de ceux atteints de la maladie d'Alzheimer. Une nouvelle fois, aucune différence significative n'a été trouvée. La même analyse a été réalisée sur les individus porteurs du génotype $\epsilon 3/\epsilon 4$ et chez les femmes $\epsilon 3/\epsilon 3$ ou $\epsilon 3/\epsilon 4$. Aucune différence n'a été trouvée dans ces groupes. De même, en faisant une ACP sur chacun de ces quatre groupes, les individus porteurs de la maladie d'Alzheimer ne peuvent pas clairement être distingués.

Toutes les analyses statistiques testées ne permettent pas de différencier les individus sains de ceux atteints de la maladie d'Alzheimer par la simple mesure du taux plasmatique d'Apo E totale ou d'Apo E4 et en incluant les quelques descripteurs disponibles (âge, sexe et trois SNP). Ces dosages viennent apporter un élément supplémentaire aux résultats déjà publiés qui sont contradictoires puisque le taux d'Apo E totale (ou d'Apo E4) a été décrit comme étant supérieur, égal ou inférieur chez les patients atteints de la maladie d'Alzheimer. Lors de ces études, les dosages réalisés sont

basés sur une reconnaissance entre un anticorps et l'Apo E. La méthode proposée ici est orthogonale et complémentaire aux précédentes et vient donc appuyer les études pour lesquelles aucune différence n'a été observée.

D'une manière générale, en ELISA, l'Apo E totale est dosée dans les échantillons inconnus et le génotype du donneur est déterminé en parallèle. Cependant, il existe un seul anticorps commercialisé et permettant de doser spécifiquement l'Apo E4. Ce kit ELISA est vendu par la société MBL International (Woburn, MA, USA). Quelques échantillons ont alors été dosés par ELISA avec cet anticorps afin de comparer les résultats obtenus par LC-MS/MS et avec ceux obtenus par ELISA. Les taux mesurés avec ce kit ELISA ont été très supérieurs à ceux déterminés par LC-MS/MS (d'un facteur quatre à dix). Deux hypothèses sont alors à envisager : soit les résultats obtenus par LC-MS/MS sont sous-estimés, soit le kit ELISA utilise surdose l'Apo E totale et l'Apo E4.

Un sous-dosage par LC-MS/MS peut avoir plusieurs origines. La première est liée au rendement de digestion enzymatique de la protéine cible. En effet, si ce rendement ne vaut que 50%, le taux mesuré de protéine sera alors biaisé d'un facteur deux. Pour calculer ce rendement, il faudrait disposer de chaque isoforme de l'Apo E et : soit avoir une matrice blanche d'apolipoprotéine E, soit que ces isoformes soient marqués par des isotopes stables. Ces protéines pures doivent alors être ajoutées en quantité connue dans le plasma avant la digestion enzymatique. A l'issue de cette digestion, les peptides rapporteurs marqués sont ajoutés en quantité connue également. Le rapport entre la quantité de peptide libéré par la protéine ajoutée avant la digestion et la quantité de peptide étalon va donner le rendement de digestion de la protéine. Une matrice blanche d'Apo E ou les isoformes marqués n'étant pas disponibles, cette estimation du rendement de digestion n'a pas pu être réalisée. En revanche, des peptides issus de clivages manqués avant et après les peptides d'intérêt ont été recherchés mais n'ont pas été observés. De plus, puisque l'Apo E a été répertoriée comme étant une protéine facile à digérer²⁰, il est donc probable que son rendement de digestion soit de 100%.

Une deuxième possibilité permettant d'expliquer un sous-dosage par LC-MS/MS serait que les peptides protéotypiques suivis soient modifiés. En effet, dans ce cas, leur masse va changer et ils ne seraient alors plus détectés par spectrométrie de masse. Cependant, aucune modification des peptides étudiés n'est décrite dans la littérature. Cette hypothèse est donc une nouvelle fois peu probable.

On peut donc supposer que le dosage réalisé ici par ELISA soit faussé. Les taux d'Apo E totale et d'Apo E4 déterminés en ELISA sont issus d'un étalonnage externe. Cet étalonnage a été réalisé selon les instructions du fournisseur en solubilisant d'abord le mélange contenant les deux protéines servant d'étalon (2 µg d'Apo E totale et 1 µg d'Apo E4 lyophilisées). La solution ainsi obtenue a ensuite été diluée successivement pour atteindre les concentrations ayant servi pour définir les courbes d'étalonnage. L'hypothèse la plus probable qui permette d'expliquer le surdosage en ELISA serait que les concentrations attendues en protéine étalon soient beaucoup plus élevées que les concentrations réellement présentes en solution. Cette différence de concentration peut provenir (i) d'une mauvaise solubilisation des protéines, (ii) d'une adsorption des protéines sur les supports utilisés lors des dilutions (contenants et / ou cônes de pipette), (iii) ou du fait que la quantité initiale de protéines n'est pas celle supposée. Ces trois possibilités permettent de mettre le doigt sur

certaines difficultés rencontrées lorsque l'on souhaite travailler sur des protéines entières plutôt que sur des peptides. En effet, il est beaucoup plus facile de synthétiser un peptide qu'une protéine. Par conséquent, de plus grosses quantités de peptides sont obtenues et des pesées plus précises peuvent ainsi être réalisées.

Un autre phénomène décrit dans le premier chapitre de ce manuscrit et lié aux dosages par ELISA pourrait expliquer ce surdosage de l'Apo E et de l'Apo E4. Il s'agit de la présence dans le plasma des patients d'anticorps qui vont se fixer d'une part sur l'anticorps greffé sur la plaque 96 puits et d'autre part sur l'anticorps ajouté dirigé contre l'Apo E ou l'Apo E4.

Quelle que soit la raison de ce surdosage, il est en accord avec les résultats obtenus par ailleurs avec le même kit ELISA²³¹. De plus, des concentrations d'Apo E aussi élevées n'ont été rapportées que par l'utilisation de ce kit ELISA et les taux d'Apo E déterminés par LC-MS/MS dans notre étude sont en accord avec ceux ayant été obtenus par plusieurs autres groupes ayant utilisé différents kit ELISA^{224-227, 235, 263}. Le kit proposé ici est donc une bonne illustration des difficultés qui peuvent être rencontrées en ELISA lorsqu'aucun anticorps vraiment validé n'est disponible. Ce phénomène renforce le besoin de disposer d'approches alternatives comme la spectrométrie de masse.

IV) Conclusion et perspectives

La méthode présentée ici permet de doser des protéines via un peptide protéotypique contenant une méthionine en s'affranchissant du biais éventuel lié à l'oxydation non contrôlée de la chaîne latérale de ce résidu. Bien que le peroxyde d'hydrogène soit le réactif le plus couramment utilisé afin d'oxyder les méthionines, il s'avère que l'utilisation de ce réactif conduit à un mélange entre des formes mono et doublement oxydées. En revanche, l'utilisation d'acide performique permet d'aboutir à une double oxydation totale et irréversible de ce résidu. De plus, l'ajout de phénol permet d'empêcher la réaction entre l'acide performique et les tyrosines. La réaction d'oxydation dure alors 24 heures. Afin d'augmenter le débit d'analyse, il pourrait donc être intéressant de diminuer ce temps de réaction. Parmi les pistes à explorer, il y a bien sûr la modulation de la concentration du réactif ainsi que la modulation de la température de réaction. L'utilisation d'énergie ultrason ou des micro-ondes permet également d'accélérer les vitesses de réactions en augmentant localement la température et / ou la pression¹⁹. Une expérience intéressante à réaliser serait par exemple d'ajouter le réactif lors de la digestion enzymatique. Il faudra alors bien veiller à ce que la trypsine soit toujours active dans ces conditions. En effet, la trypsine possède deux méthionines. On peut cependant supposer que l'oxydation de ces deux méthionines ne modifie pas l'activité de la trypsine. En revanche, elle possède 12 cystéines impliquées dans six ponts disulfure. Or, l'acide performique oxyde les ponts disulfure pour former des acides cystéiques. La rupture de ces ponts disulfure va engendrer une perte de la structure tertiaire de la trypsine et donc très certainement une perte de son activité. Si l'oxydation doit se dérouler pendant la digestion enzymatique, il faudra alors soit trouver un autre réactif qui permette d'oxyder les méthionines sans réduire les ponts

disulfure, soit évaluer l'impact d'un ajout plus important de trypsine afin de palier la baisse de l'activité tryptique suite à l'inactivation de l'enzyme.

Bien que des efforts pourraient être fournis afin de diminuer le temps nécessaire pour préparer un échantillon, il faut toutefois évaluer le problème pour un grand nombre d'échantillons. En effet, le challenge de cette méthode ne réside pas dans la recherche d'une protéine à l'état de trace car le taux plasmatique l'Apo E est situé au-delà de la dizaine de $\mu\text{g} / \text{mL}$. Une séparation chromatographique très rapide a donc pu être mise en place : les échantillons ont été séparés sur une colonne de longueur de 5 cm et ayant des tailles de particules inférieures à 2 μm . La séparation a alors été réalisée en moins de cinq minutes ce qui a permis de rattraper le surplus de temps lié au protocole d'oxydation. En effet, sachant que 50 échantillons ont été préparés pour chaque série et que dans une semaine, trois séries de préparation peuvent être réalisées, 150 échantillons pouvaient être analysés chaque semaine. Ceci représente donc un temps machine de 12,5 h. Si deux personnes s'occupent de la préparation d'échantillon simultanément, 300 échantillons peuvent être prêts chaque semaine ce qui représente un temps machine de 25h. Si le protocole classique était appliqué (*i.e.* digestion et extraction sur phase solide mais sans oxydation), quatre séries de préparation pourraient être réalisées par semaine, soit 200 échantillons. Une séparation sur une colonne chromatographique conventionnelle dure environ 30 min donc ceci représenterait 100 h de temps machine soit 4 jours par semaine. En revanche, si deux personnes se consacrent à la préparation d'échantillon, l'analyse des 400 échantillons hebdomadaires nécessiterait un temps machine de 200 h. Or une semaine ne contient que 168 h. Ceci illustre que dans les campagnes de dosage de nombreux échantillons, le facteur limitant est généralement le temps nécessaire pour réaliser l'analyse par LC-MS/MS et non pas la durée de préparation d'échantillon même si elle est étalée sur trois jours consécutifs comme c'est le cas ici.

L'oxydation des méthionines par l'acide performique a donc été appliquée ici pour le dosage de l'apolipoprotéine E4 dont le seul peptide protéotypique contient une méthionine (séquence LGADMEDVR). L'Apo E4 étant impliquée dans la maladie d'Alzheimer, il est important de disposer d'outils pour la doser. En effet, les dosages actuels sont réalisés par des techniques faisant appel à l'utilisation d'anticorps. De plus, les résultats dans la littérature sont contradictoires : certains groupes trouvent des taux plus élevés²³⁷, identiques^{232, 233, 234, 235} ou plus faibles entre les échantillons témoins et malades^{230, 231}. Après avoir rigoureusement validé la méthode développée (notamment la répétabilité du protocole de préparation d'échantillon), les taux d'Apo E4 et d'Apo E totale ont été déterminés dans 673 plasmas répartis en 223 témoins et 450 porteurs de la maladie d'Alzheimer. Ce nombre de dosages représente à ce jour la plus grande cohorte analysée par LC-MS/MS. Les analyses statistiques des résultats (analyse de variance et analyse en composantes principales) n'ont pas permis de distinguer ces deux cohortes. Ceci n'est pas forcément surprenant puisque les résultats dans la littérature sont contradictoires. Cependant, les analyses réalisées n'ont inclus que peu de paramètres : génotype, âge, sexe des donneurs et trois modifications de l'ADN. Il aurait donc été intéressant de disposer d'autres paramètres qui sont connus pour influencer le taux d'Apo E. En effet, certains de ces paramètres sont connus pour augmenter l'expression de l'Apo E. Ces paramètres comprennent notamment la consommation d'alcool²⁷⁰, de tabac²⁶⁹, l'indice de masse corporelle²⁶⁸, le rapport taille-hanche²⁶⁸. De même, l'utilisation de médicaments ayant pour but de diminuer le taux de lipides plasmatiques diminue également le taux d'Apo E²⁶⁹. De plus, l'origine du donneur peut avoir un impact sur le taux d'Apo E. En effet, il a déjà été montré qu'un sud européen

avait un taux d'Apo E supérieur à un nord européen²⁷¹. Il existe d'autres paramètres influençant le taux d'Apo E mais qui seraient moins pertinents dans notre étude. Par exemple, la prise de contraceptifs diminue le taux d'Apo E²⁶⁵. Cependant, puisque 354 femmes parmi les 360 de notre étude statistique ont plus de 60 ans, on peut aisément imaginer qu'elles ne prennent pas de contraceptifs.

Les données disponibles n'ayant pas permis de distinguer ces deux cohortes, il peut être conclu que les taux plasmatiques d'Apo E et d'Apo E4 ne sont pas des biomarqueurs de la maladie d'Alzheimer. De plus, la maladie d'Alzheimer se traduit par la formation de plaques amyloïdes dans le cerveau. Si une différence de concentration en Apo E dans le liquide céphalo-rachidien (LCR) existe, elle n'est pas forcément visible dans le plasma puisque les variations de concentrations en Apo E entre ces deux liquides ne sont pas corrélées²²⁹.

CHAPITRE IV : APPORTS DE LA CHROMATOGRAPHIE LIQUIDE POUR LA QUANTIFICATION

I) Introduction

Comme nous l'avons vu dans le chapitre bibliographique, les limites de quantification actuelles par LC-MS/MS se situent aux environs du ng de protéine par mL de plasma ou sérum après la déplétion des protéines majoritaires et fractionnement de l'échantillon^{17, 68}. A ce jour, ces limites ne sont donc pas suffisantes pour permettre de doser les protéines les moins concentrées (comme par exemple l'interleukine-6 dont la concentration est inférieure à 2 pg / mL²⁷²). Tout moyen d'abaisser ces limites est donc intéressant à explorer.

Différentes voies de recherche sont possibles afin d'abaisser ces limites de quantification. Tout d'abord, il y a l'efficacité d'ionisation. En effet, la sensibilité dépend du rendement d'ionisation de l'analyte et de sa transmission jusqu'au détecteur. Actuellement, environ 1% des ions présents en solution vont rejoindre l'intérieur du spectromètre de masse²⁷³. De nombreux groupes travaillent donc sur l'optimisation des sources d'ionisation. Par exemple, le groupe de Smith a développé une source composée de multiples capillaires qui vont permettre de diviser le débit issu de la chromatographie et permettre ainsi un meilleur processus d'ionisation²⁷⁴. Cette source a ensuite été complétée par deux entonnoirs à ions : le premier à pression élevée (18 Torr), va permettre d'envoyer beaucoup de gaz afin de désolvater les ions tandis que le second (pression de 1 à 2 Torr) permet le transfert des ions vers une zone de vide plus poussé. Ce montage a été appliqué soit à un temps de vol²⁷⁵, soit à un triple quadripôle²⁷⁶ et un gain de sensibilité d'un facteur soixante-dix a été atteint. A ce jour, ce dispositif n'est cependant pas commercialisé. Une autre approche permettant de gagner en sensibilité consiste à dériver les analytes²⁷⁷⁻²⁷⁹. Les objectifs de la dérivation peuvent être d'introduire une charge permanente, d'augmenter l'hydrophobicité de l'analyte afin d'augmenter son activité de surface (*i.e.* la capacité de l'analyte à rejoindre la surface de la goutte lors de l'évaporation du solvant car plus l'activité de surface d'un analyte est importante, plus il sera rapidement désolvaté et donc plus le signal généré sera important), ou de faciliter la fragmentation de l'analyte et permettre ainsi une analyse en SRM. Un gain d'un facteur soixante-dix ou plus peut ainsi être généré. Cependant, ce procédé nécessite l'ajout d'une étape lors de la préparation d'échantillon. Ceci va d'une part nécessiter une durée de préparation plus longue, et d'autre part risquer de diminuer la répétabilité de la méthode. En effet, il y a un risque d'avoir une réaction de dérivation incomplète ce qui peut également limiter le gain de sensibilité. Une difficulté supplémentaire réside dans le fait de trouver un réactif peu onéreux qui puisse être greffé sur des peptides particuliers. En effet, si tous les peptides sont dérivés, tous auront une meilleure activité de surface. De ce fait, aucun gain de signal ne risque d'être observé. Il faut donc cibler les acides aminés les plus rares afin de dériver le moins de peptides possibles. Les réactifs dirigés contre les thiols des cystéines présentent donc un intérêt lors de cette approche. L'inconvénient est que le choix des peptides protéotypiques est donc limité aux peptides contenant une cystéine. Ces peptides ne sont pas forcément ceux qui donneront le meilleur signal donc le gain final sur la méthode de dosage ne sera pas le reflet du gain observé pour le peptide contenant la cystéine.

Avant d'envisager des modifications chimiques sur les analytes qui ne seront pas forcément reproductibles ou des modifications instrumentales, le gain en sensibilité peut se faire de façon plus simple en optimisant par exemple la préparation d'échantillon mais également la chromatographie. En effet, la séparation chromatographique est souvent négligée et peut pourtant apporter un gain en

sensibilité. Empiriquement, pour la séparation de peptides, les phases mobiles utilisées sont constituées d'eau et de l'acétonitrile contenant de l'acide formique et la séparation est réalisée avec une phase stationnaire de type C₁₈. Le choix de l'ACN s'explique notamment par la faible pression qu'il génère dans la colonne lors de la séparation chromatographique. D'autres solvants tels que le méthanol (MeOH) peuvent remplacer l'ACN et pourtant leur utilisation reste quasi inexistante pour la séparation de peptides. De plus, dans un contexte de « crise de l'ACN », comme cela a été le cas en 2009 avec une multiplication des tarifs de l'ACN par un facteur quinze, trouver des alternatives à l'utilisation de l'ACN est devenu crucial. Dans ces conditions, l'évaluation du MeOH pour la séparation de peptides s'avérerait intéressante d'autant plus que les chaînes chromatographiques actuelles permettent de travailler à des pressions élevées (supérieures à 1 000 bar).

Dans ce contexte, l'un des objectifs de l'étude suivante est de vérifier si l'ACN peut être remplacé par du MeOH en phase inverse en terme de sensibilité du dosage par LC-MS/MS en mode SRM. Dans une seconde partie, un autre mode de séparation sera évalué : la chromatographie liquide d'interactions hydrophiles (HILIC). En effet, ce mode de chromatographie est reconnu pour augmenter la sensibilité du dosage (jusqu'à un facteur dix) lors de l'analyse de petites molécules. Nous évaluerons donc si des gains d'intensité similaires peuvent être atteints avec des peptides.

II) Matériel et méthodes

II.1) Réactifs

L'acétonitrile, le méthanol et l'eau (qualité LC-MS) proviennent de Fisher Scientific (Strasbourg, France). Le dithiothéitol (DTT), l'iodoacétamide (IAM), l'acide formique (qualité LC-MS), la trypsine (type IX-S de pancréas porcin), le bicarbonate d'ammonium, le formiate d'ammonium, l'acétate d'ammonium, l'urée, l'alcool méta-nitrobenzylique (m-NBA), l'albumine de sérum humain (HSA), le lysozyme C de poulet et la myoglobine de cheval viennent de Sigma-Aldrich (St Quentin-Fallavier, France). Le sérum provient de l'Etablissement Français du Sang. Les peptides de séquence EEFSPRLR, LGPLV*(¹³C₅, ¹⁵N₁)EQGR et ILIPGVGK viennent de Millegen (Labège, France). Le peptide de séquence LSEPAELTDAVK et les autres peptides marqués (¹³C₆, ¹⁵N₄ pour les arginines ou ¹³C₆, ¹⁵N₂ pour les lysines) utilisés ont été synthétisés par bioMérieux (Marcy l'Etoile, France). Enfin, les cartouches d'extraction sur phase solide de type Oasis HLB® 3 cc (60 mg) ou MCX 3 cc (60 mg) proviennent de Waters (Milford, MA, USA).

II.2) Préparation des échantillons

II.2.1) Digestion enzymatique

100 μ L d'échantillon (sérum ou urine) sont dénaturés par ajout de 400 μ L d'urée 8 M et 55 μ L de DTT à 150 mM pendant 40 min à 60°C. Les échantillons sont ensuite alkylés pendant 40 min à température ambiante et dans le noir par ajout de 170 μ L d'IAM à 150 mM. Les échantillons sont ensuite dilués par cinq dans du bicarbonate d'ammonium 50 mM à pH 8. 20 μ g de trypsine solubilisée dans le bicarbonate d'ammonium à 50 mM sont alors ajoutés et la digestion se déroule pendant 16 h à 37°C. La digestion est arrêtée par l'ajout d'acide formique afin d'obtenir une concentration finale de 0,5% (v / v).

II.2.2) Extraction des peptides supplémentés dans le sérum pour la comparaison entre le MeOH et l'ACN en phase inverse

100 μ L du mélange de peptides marqués sont ajoutés au sérum digéré ci-dessus. Les échantillons sont ensuite extraits sur des cartouches de type Oasis® HLB 3 cc (60 mg). Les cartouches sont d'abord conditionnées par 1 mL de méthanol puis 1 mL d'eau contenant 0,1% d'acide formique. L'ensemble des 100 μ L de sérum digéré est alors déposé (soit un volume total d'environ 4 mL). Puis la cartouche est lavée par 1 mL d'eau contenant 0,1 % d'acide formique et l'élution est réalisée par l'ajout de 1 mL de mélange H₂O / MeOH (20 / 80, v / v) contenant 0,1 % d'acide formique. L'éluat est ensuite dilué dans 2 mL de tampon acétate 200 mM à pH 3 pour être fractionné par MCX : les cartouches MCX sont conditionnées par 1 mL de méthanol puis 1 mL de tampon acétate à pH 3. L'éluat dilué de la cartouche HLB est ensuite déposé. Le lavage s'effectue par 1 mL de tampon acétate à pH 3 puis par 1 mL de mélange tampon acétate pH 3 / méthanol (20 / 80, v / v). Ensuite, trois éluations sont réalisées par : (i) 1 mL de mélange tampon acétate pH 5,5 / méthanol (50 / 50, v / v), (ii) 1 mL de mélange tampon bicarbonate d'ammonium 200 mM pH 8 / méthanol (50 / 50, v / v) et (iii) 1 mL de mélange hydroxyde de sodium 1 M / méthanol (10 / 90, v / v). Chaque éluat est évaporé à sec et repris dans 250 μ L d'eau contenant 0,5 % d'acide formique.

II.2.3) Extraction des peptides pour la comparaison entre la phase inverse et l'HILIC

Les digests ont été dessalés sur des cartouches de type Oasis® HLB 3 cc (60 mg) selon le protocole décrit au paragraphe précédent à l'exception de l'élution qui est réalisée par l'ajout de 1 mL de MeOH contenant 0,5 % d'acide formique. L'éluat est ensuite évaporé et repris dans 100 μ L d'eau contenant 0,1% d'acide formique pour les échantillons analysés en phase inverse ou dans 100 μ L d'un mélange eau / acétonitrile (17 / 83, v / v) contenant également 0,1% d'acide formique pour les échantillons analysés en HILIC.

II.2.4) Préparation des gammes

II.2.4.1) *En solvant(eau)*

Une gamme contenant les peptides LGPLV*EQGR, ILIPGVGK et EEFSPLR a été préparée dans de l'eau contenant 0,5% d'acide formique de façon à obtenir des concentrations de 0 ; 1 ; 5 ; 10 ; 50 ; 100 ; 500 ; 1 000 ; 2 000 ; 5 000 et 10 000 ng d'équivalent protéine par mL de solution pour le peptide LGPLV*EGQR. Pour le peptide ILIPGVGK, la gamme est obtenue avec des concentrations de 0 ; 0,0333 ; 0,167 ; 0,333 ; 1,67 ; 3,33 ; 16,7 ; 33,3 ; 66,7 ; 166,7 et 333 ng / mL de peptide. Pour le peptide EEFSPLR, les concentrations sont de 0 ; 0,1 ; 0,5 ; 1 ; 5 ; 10 ; 50 ; 100, 200 ; 500 et 1000 ng / mL de peptide.

II.2.4.2) *En matrice (sérum ou urine)*

100 µL de chacun des onze points de gamme préparés en solvant (*cf.* paragraphe précédent) ont été prélevés et ajoutés dans un volume de 4 mL de sérum (ou d'urine) digéré (obtenu après digestion de 100 µL de sérum (ou d'urine) initial selon le protocole décrit précédemment). Les digests ont ensuite été dessalés sur des cartouches de type Oasis® HLB 3 cc (60 mg) et repris dans 100 µL selon le protocole décrit au paragraphe II.2.3).

II.2.5) Préparation des échantillons pour l'évaluation du volume de matrice injectable en HILIC

Pour étudier l'impact de la quantité de matrice injectée sur le signal mesuré, différents échantillons ont été préparés de la façon suivante :

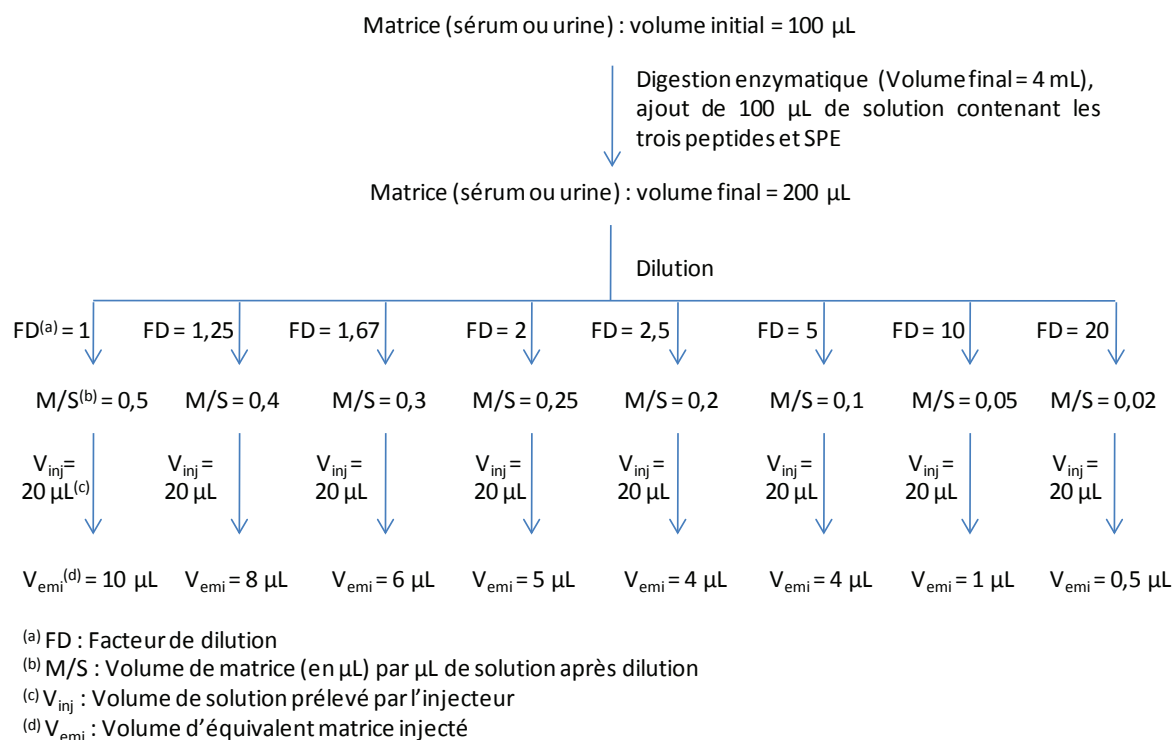


Figure 76 : Schéma de préparation des échantillons pour l'étude du volume de matrice injectable en HILIC.

Le même protocole a été appliqué en l'absence de matrice : 100 μL d'une solution contenant les trois peptides précédents ont été ajoutés à 4 mL d'eau acidifiée (ce qui correspond au volume de solution obtenu après digestion de 100 μL de matrice). L'ensemble a subi le protocole SPE décrit ci-dessus mais a été concentré dans un volume final de 200 μL . Pour les études en phase inverse, le solvant de reprise est de l'eau acidifiée (par 0,5% d'acide formique) alors que pour les études en HILIC, il s'agit d'un mélange eau / acétonitrile (17 / 83, v / v) contenant également 0,5% d'acide formique. Chacune de ces deux solutions a été diluée comme précédemment.

II.3) Analyse LC-MS/MS

L'analyse a été réalisée sur un système chromatographique HP 1290 series (Agilent Technologies, Waldbronn, Germany) constitué d'un passeur d'échantillons et d'une pompe binaire. 20 μL d'échantillon sont injectés et séparés sur une colonne Symmetry C₁₈ de dimensions 2,1 x 100 mm, avec des tailles de particules de 3,5 μm provenant de Waters (Milford, MA, USA). Pour étudier l'influence de la phase mobile en phase inverse, l'élution a été réalisée à un débit de 300 μL / min selon les gradients suivants : (i) un plateau de 3 min avec 5% de B (acétonitrile contenant 0,1% d'acide formique), suivi d'un gradient linéaire de 5 à 28% de B en 35 min puis d'un lavage de colonne de 10 min avec 90% de B et d'un reconditionnement avec 5% de B pendant 10 min et (ii) un plateau de 3 min avec 12% de B (méthanol contenant 0,1% d'acide formique), suivi d'un gradient linéaire de 12 à 70% de B en 41 min puis d'un lavage de colonne de 10 min avec 90% de B et d'un

reconditionnement avec 12% de B pendant 10 min. Dans les deux cas, le solvant A est de l'eau contenant 0,1% d'acide formique et la pente du gradient d'élution est de 1,4 % par minute.

Pour les comparaisons entre la phase inverse et l'HILIC, les analytes (volume injecté de 1 ou 5 μL) ont été séparés sur la même colonne Symmetry C₁₈ de dimensions 2,1 x 100 mm avec des tailles de particules de 3,5 μm provenant de Waters (Milford, MA, USA). L'élution a été réalisée à 300 μL / min avec de l'eau (solvant A) et de l'acétonitrile (solvant B) contenant tous les deux 0,1% d'acide formique en appliquant un plateau de 3 minutes à 5% de solvant B puis en utilisant un gradient linéaire de 5 à 26% de solvant B en 15 minutes. Le lavage de la colonne s'est ensuite déroulé pendant 3 minutes avec 100 % de B et la colonne a été rééquilibrée pendant 4 minutes. Le temps de cycle total est de 26 minutes. En HILIC, le volume injecté (également de 1 ou 5 μL) a été séparé sur une colonne XBridge amide ayant les mêmes dimensions que la colonne précédente (2,1 x 100 mm avec des particules de 3,5 μm) et provenant également de Waters (Milford, MA, USA). L'élution a été réalisée à 300 μL / min par un plateau de 3 minutes avec 83% de solvant B suivi d'un gradient linéaire de 83 à 71% de B en 22,5 minutes. La colonne a été lavée par 50% de B pendant 3 minutes puis rééquilibrée pendant 6 minutes. Le temps de cycle total est alors de 36 minutes.

L'éluat est détecté par un spectromètre de masse hybride (triple quadripôle / piège à ions linéaire) : le 5500 QTRAP® (AB Sciex, Foster City, CA, USA) équipé d'une source Turbo VTM. L'ensemble (le contrôle de la LC-MS/MS, l'acquisition des données ainsi que leur retraitement) est réalisé via le logiciel Analyst 1.5.1. Le spectromètre de masse a été calibré par du polypropylène glycol, de la réserpine et de l'« Agilent Tuning Mix » (provenant tous les trois d'AB Sciex, Foster City, CA, USA) selon les instructions du constructeur. La résolution en Q1 et en Q3, mesurée par la largeur des pics à mi-hauteur a été ajustée à $0,7 \pm 0,1$ a.m.u (unité de masse atomique). Cette valeur est considérée comme étant la résolution unitaire. Le mode positif a été retenu pour l'ionisation sous une tension de spray d'ions de 5500V. Les pressions de gaz rideau et de nébulisation sont de 50 psi. Dans les deux cas, le gaz utilisé est de l'azote. La source est chauffée à 500°C, la pression du gaz auxiliaire (azote également) est également de 40 psi et celle du gaz de collision est fixée à 12 psi.

III) Résultats et discussion

Afin d'évaluer l'influence du MeOH en substitution de l'ACN, nous nous sommes placés dans un premier temps dans des conditions réelles de dosage pour démarrer notre étude. Nous avons donc cherché à analyser des peptides contenus dans du sérum digéré. Ces analyses ont été réalisées en premier lieu en remplaçant uniquement l'ACN par du MeOH sans changer le gradient de séparation.

III.1) Séparation avec la même pente de gradient de solvant éluant

Du sérum a été digéré puis 32 peptides marqués (par du carbone 13 et de l'azote 15) ont donc été ajoutés. Ces peptides sont des peptides tryptiques protéotypiques de 32 protéines plasmatiques. Afin de reconcentrer l'échantillon, une extraction sur phase solide a été réalisée et le mélange obtenu a été injecté plusieurs fois en utilisant soit de l'acétonitrile, soit du méthanol dans la phase mobile. Les aires moyennes mesurées dans les deux conditions ainsi que les temps de rétention de chaque peptide sont présentés dans le Tableau 20 :

Tableau 20 : Liste des aires mesurées pour les 32 peptides en utilisant l'acétonitrile ou le méthanol comme phase mobile.

Peptide	Moyenne MeOH	Tr (min)	Moyenne ACN	Tr (min)	Gain (%)
VVNSILAFR	4,17E+06	19,9	3,02E+06	12,9	38,1
VGVNGFGR	8,11E+05	13,1	4,53E+05	10	79,0
SQIHDIVLVGGSTR	1,49E+06	18,5	8,69E+05	12	71,5
FIIPQIVK	1,43E+07	28,4	8,27E+06	16,5	72,9
GLTSVINQK	8,51E+05	15,3	5,63E+05	10,7	51,2
IVVVTAGVR	1,76E+05	15,5	8,77E+04	10,8	100,7
TYNFLPEFLVSTQK	3,90E+06	34,6	2,00E+06	20,3	95,0
YGVSGYPTLK	3,71E+06	20,7	4,65E+06	12,6	-20,2
GSTAPVGGGAFPTIVER	3,70E+05	24,3	1,31E+05	14,7	182,4
THLPGFVEQAEALK	7,98E+05	24,8	6,26E+05	14,6	27,5
VNLAELFK	6,95E+05	29,8	3,75E+05	17,5	85,3
LSILYPATTGR	1,17E+06	22,4	9,98E+05	14,2	17,2
DHINLPGFSGQNPLR	2,07E+06	27,2	1,21E+06	15,7	71,1
EGVHGGLINK	1,47E+05	7,8	1,02E+05	7,5	44,1
AINQGGLTSVAVR	4,41E+05	18,4	2,51E+05	11,8	75,7
LLDSSTVTHLFK	1,57E+06	27,8	7,34E+05	15,7	113,9
SFWELIGEAAK	3,53E+06	30,3	2,54E+06	18	39,0
GADVWFK	1,42E+06	18,5	3,82E+05	13,2	271,7
IAVAAQNCYK	1,41E+05	11,9	1,71E+05	9,1	-17,5
EQQIVIQSSGGLSK	3,34E+04	17,5	3,28E+04	11,6	1,8
ENLLDFIK	2,35E+06	37,6	1,36E+06	22,5	72,8
TGEAIVDAALSALR	3,04E+05	37,1	2,33E+05	21,1	30,5
LLADPTGAFGK	2,03E+05	22,6	1,25E+05	14	62,4
DCVGPEVEK	3,91E+05	23,5	1,98E+05	13,8	97,5
DCAVIVTQK	9,45E+06	23,5	4,78E+06	13,8	97,7
SNVSDAVAQSTR	4,58E+04	12,8	1,86E+04	9,5	146,2
TAFQEALDAAGDK	3,56E+04	34,1	2,09E+04	18,9	70,3
EEAENTLQSFRR	1,59E+05	26,2	7,64E+04	15	108,1
FADLSEANR	4,74E+05	22,9	3,63E+05	14,4	30,6
HYGGLTGLNK	2,14E+05	10,6	1,62E+05	9,2	32,1
HILANFK	5,36E+04	11,1	2,15E+04	9,5	149,3
FFVGGNWK	1,19E+05	21,8	7,48E+04	15	59,1
				Moyenne (%)	73,7

Pour chaque peptide, le gain de signal obtenu en utilisant le méthanol est calculé par la formule suivante :

$$\text{Gain} = \left(\frac{\text{Aire mesurée avec le méthanol}}{\text{Aire mesurée avec l'acétonitrile}} - 1 \right) \times 100$$

Le gain d'aire moyen obtenu pour l'ensemble de ces 32 peptides est de 74 %. Ces données (ainsi que les hauteurs des pics chromatographiques) sont également représentées sur les diagrammes de Pareto suivants :

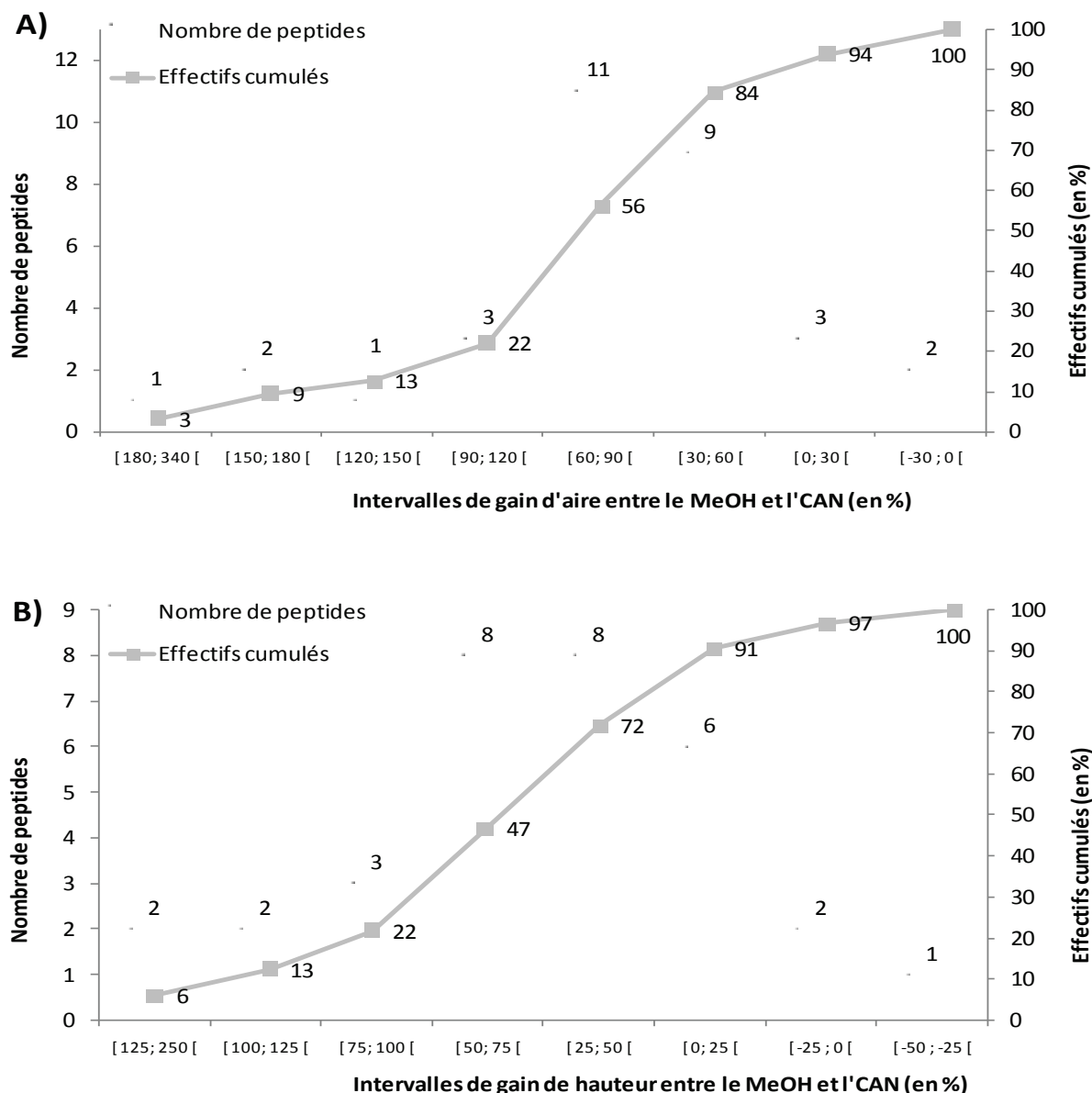


Figure 77 : Diagrammes de Pareto sur les gains d'aire (A) et de hauteur (B) entre le méthanol et l'acétonitrile.

Dans ces diagrammes, les valeurs en abscisse correspondent à différents intervalles de gain d'aire (partie A) ou de hauteur (partie B) entre le méthanol et l'acétonitrile, sachant qu'un gain d'aire de 100% équivaut à une aire doublée. Les histogrammes représentent le nombre de peptides par intervalle de gain d'aire. Par exemple, le gain d'aire est compris entre 90 et 120% pour trois peptides. Enfin, la courbe correspond aux effectifs cumulés. Par exemple, 22% des peptides ont un gain d'aire

supérieur à 90%, ou encore, 94% des peptides présentent un gain d'aire supérieur à 0%. En d'autres termes, l'aire de 94% des peptides étudiés est supérieure en utilisant le méthanol plutôt que l'acétonitrile comme phase mobile.

Concernant les hauteurs des pics chromatographiques, des gains moins importants sont rencontrés comme le montre la Figure 77 B et le gain moyen n'est plus que de 52%. Ceci s'explique par un élargissement des pics chromatographiques (de 13% en moyenne). Cet élargissement peut être expliqué par l'équation de Van Deemter que nous avons vue lors du chapitre précédent (*cf.* paragraphe III.4.1) page 163 :

$H = A + \frac{B}{u} + C \cdot u$; avec H la hauteur équivalente à un plateau théorique, u la vitesse linéaire de la phase mobile, A l'anisotropie d'écoulement, B la diffusion longitudinale et C la résistance au transfert de masse. Si H est en m et u en m.s^{-1} , alors le terme A est en m, B en $\text{m}^2.\text{s}^{-1}$ et C en s^{-1} .

La hauteur équivalente à un plateau théorique va donc augmenter avec la résistance au transfert de masse (terme C). Or, cette résistance est inversement proportionnelle au coefficient de diffusion du soluté dans la phase mobile. Ainsi, si la viscosité de la phase mobile augmente (ce qui est le cas puisque la viscosité du MeOH est de 0,56 cP à 25°C et que celle de l'ACN est de 0,35 cP²⁸⁰), le coefficient de diffusion du soluté dans cette phase mobile va diminuer et donc, la résistance au transfert de masse va augmenter. Si ce terme C augmente, le terme H augmente ce qui va se traduire par un pic chromatographique plus large (car l'efficacité de la colonne est inversement proportionnelle à H). Ce phénomène explique pourquoi les pics obtenus en utilisant le méthanol à la place de l'acétonitrile sont plus larges. Or, puisque le signal en électrospray augmente avec la concentration au sommet du pic chromatographique, si le pic est plus large, la concentration de l'analyte au sommet du pic diminue et le signal mesuré sera plus faible. Ce phénomène sera d'ailleurs bien illustré ultérieurement (*cf.* Figure 80 page 206).

Bien que les pics chromatographiques soient plus larges avec le méthanol, nous obtenons tout de même un gain de signal. Ce gain diffère cependant d'un peptide à l'autre. Afin d'expliquer ces différences, nous avons essayé de trouver une corrélation entre le gain et quelques propriétés physico-chimiques des peptides. Pour simplifier, nous en reportons uniquement trois : le point isoélectrique des peptides, leur hydrophobicité et leur basicité en phase gaz. Les valeurs de point isoélectrique et d'hydrophobicité ont été obtenues à partir du logiciel GPMW 6.00. Ce logiciel calcule le point isoélectrique d'après l'algorithme de Skoog et Wichman²⁸¹ et l'hydrophobicité selon l'indice de Bull et Breese²⁸². Les basicités en phase gaz ont quant à elles été obtenues par le module ESP Predictor développé par le groupe de Carr afin de prédire les peptides donnant la meilleure réponse en masse à partir de leur séquence¹²⁶.

Tableau 21 : Point isoélectrique, hydrophobicité et gain d'aire des 32 peptides étudiés.

Peptide	pI	Hydrophobicité	Basicité en phase gaz (kJ/mol)	Gain d'aire (%)
YGVSGYPTLK	5.39	-2640	878,1	-25.4
IAVAAQNCYK	8.91	880	875,0	-13.1
EQQIVIQSSGGLSK	6.99	1460	875,5	1.1
LSILYPATTGR	9.9	-3240	879,9	17.0
THLPGFVEQAEALK	5.32	-280	877,2	29.9
TGEAIVDAALSALR	4.11	270	875,6	31.6
EGVHGGLINK	7.82	1130	874,1	33.0
HYGGTLGLNK	9.54	30	877,9	35.7
VVNSILAFR	11.1	-3510	876,6	38.4
SFWELIGEAAK	4.31	-1890	874,6	38.5
FADLSEAAANR	4.11	1780	875,5	40.8
GLTSVINQK	10.15	-10	873,3	50.5
TAFQEALDAAGDK	3.74	3530	875,7	58.3
LLADPTGAFGK	6.98	-790	879,8	60.1
FFVGGNWK	9.85	-2020	873,6	60.1
AINQGGLTSVAVR	11.2	1500	876,1	64.4
DHINLPGFSGQNPLR	7.9	170	876,0	72.6
SQIHDIVLVGGSTR	7.6	-340	875,7	74.0
ENLLDFIK	4.11	-3800	877,3	74.9
VGVNGFGR	11.1	990	876,6	75.2
FIIPQIVK	9.85	-5360	878,2	77.2
DCVGPEVEK	3.87	1590	876,0	82.1
VNLAELFK	6.99	-3100	877,7	82.8
TYNFLPEFLVSTQK	6.67	-4860	877,9	85.2
EEAENTLQSFR	4.01	2230	877,1	86.8
DCAVIVTQK	6.1	350	877,8	90.1
IVVVTAGVR	11.15	-2050	878,2	94.3
LLDSSTVTHLFK	7.82	-4040	878,3	110.8
SNVSDAVAQSTR	7.02	4430	875,7	140.6
HILANFK	9.85	-1970	874,4	170.6
GSTAPVGGGAFPTIVER	7.04	1850	876,0	174.1
GADVWFK	6.99	-980	876,9	335.2

Dans ce tableau, les peptides ont été listés de façon croissante selon le gain d'aire obtenu. Ce gain d'aire a été représenté en fonction des trois paramètres listés ci-dessus sur la Figure 78 :

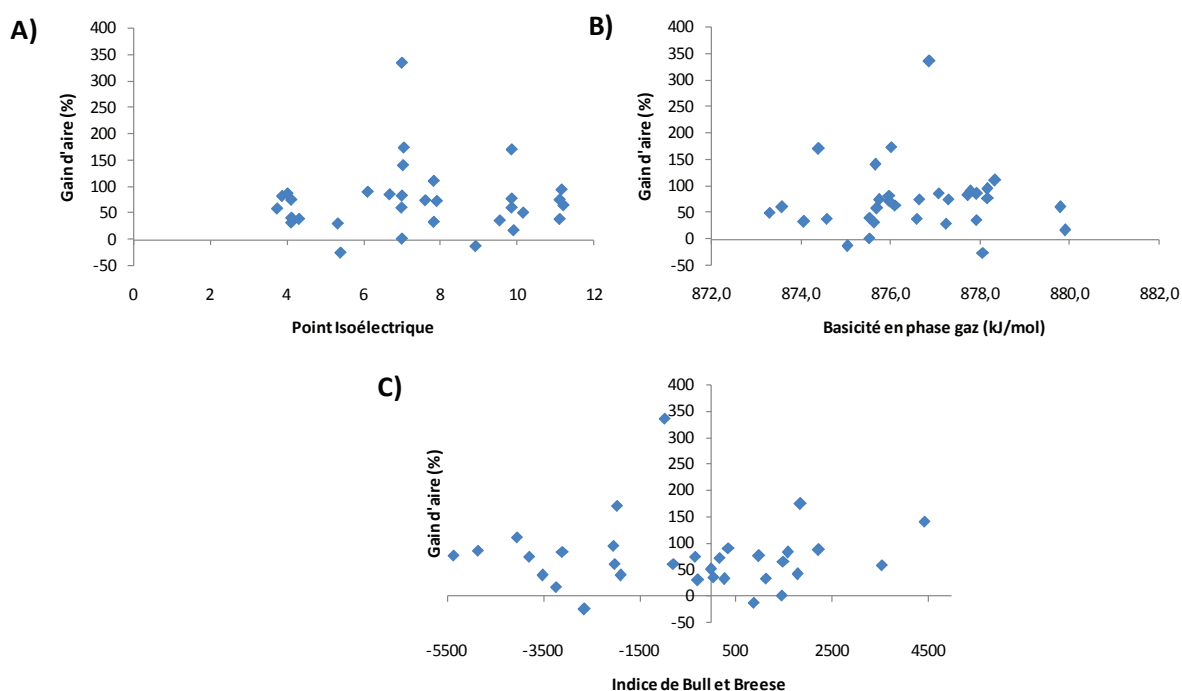


Figure 78 : Corrélation entre le gain d'aire et le point isoélectrique (A), la basicité en phase gaz (B) ou l'indice de Bull et Breese (C).

Ces trois graphiques montrent qu'il n'y a aucune corrélation entre le gain d'aire obtenu et les trois propriétés listées. La même recherche a été effectuée sur le gain de hauteur ou sur l'élargissement des pics et les mêmes conclusions peuvent être tirées.

Pour expliquer les différences de gain, il faut s'intéresser de plus près à la séparation chromatographique. Puisque le temps de rétention du peptide élué en premier est presque le même avec les deux solvants (7,5 min avec l'ACN et 7,8 min avec le MeOH) mais que le dernier peptide est élué avec plus de 15 min d'écart (22,5 min avec l'ACN et 37,6 min avec le MeOH), cela signifie que les sélectivités sont différentes entre les deux systèmes chromatographiques. En effet, selon le Tableau 20 page 199, les temps de rétention des peptides changent en fonction du solvant utilisé. Ce que nous voyons en SRM pour les peptides suivis peut être généralisé à tous les composés interférents présents sur la phase stationnaire mais non visibles du fait de la spécificité du mode de balayage. L'un des moyens d'évaluer la qualité de la séparation chromatographique sans forcément suivre toutes les molécules est de calculer la capacité de pics. La capacité de pics représente le nombre de composés qui peuvent être séparés avec une résolution égale à un²⁸³. Cette résolution est la résolution minimale permettant une mesure correcte de l'aire sous chacun des deux pics. Les capacités de pics des deux systèmes chromatographiques ont alors été calculées selon la formule suivante²⁸⁴ :

$$\text{Capacité de pics} = \frac{\Delta Tr}{\text{Largeur à la base du pic}}$$

avec : ΔTr l'écart de temps de rétention entre le premier (Tr_1) et le dernier (Tr_{32}) composé élué.

La largeur à la base du pic utilisée est la valeur moyenne des largeurs à la base des 32 peptides. Chacune de ces largeurs a été calculée par :

$$\text{Largeur à la base du pic} = \frac{4 \times \text{Largeur à mi-hauteur}}{\sqrt{5,54}}$$

Les capacités de pics obtenues après séparation avec l'ACN et le MeOH sont reportées dans le tableau suivant :

Tableau 22 : Largeurs moyennes des pics chromatographiques des 32 peptides étudiés et capacités de pics correspondant aux deux séparations.

	Tr ₃₂ (min)	Tr ₁ (min)	Δ Tr (min)	Largeur ^(a) (min)	Capacité de pics
MeOH	37,6	7,8	29,8	0,31	56,6
ACN	22,5	7,5	15,0	0,28	31,8

^(a) à mi-hauteur du pic

Dans ce tableau, les largeurs à mi-hauteurs correspondent à la largeur moyenne des 32 peptides. En gardant la même pente de gradient de solvant éluant, la capacité de pics de la séparation obtenue avec le méthanol est quasiment le double de celle obtenue avec l'acétonitrile. Par conséquent, on sépare plus de composés avec le MeOH et il y a donc statistiquement moins d'interférents élués au même temps de rétention que nos peptides. De ce fait, l'effet matrice obtenu dans ces conditions est diminué en utilisant le méthanol comme solvant d'élution. Cette baisse d'effet matrice peut donc expliquer le gain de signal observé et également l'impossibilité de trouver une corrélation entre le gain de signal observé et les propriétés des peptides. En effet, dans ce cas, l'effet matrice diffère d'un peptide à l'autre en fonction des conditions chromatographiques.

Afin de pouvoir comparer uniquement l'impact des deux solvants sur l'intensité du signal détecté, un nouveau gradient a été développé en méthanol de façon à obtenir des temps de rétention et des capacités de pics similaires entre les deux séparations. Ceci va permettre d'avoir un effet matrice du même ordre de grandeur entre les deux séparations.

III.2) Séparation avec la même capacité de pics

Afin de simplifier l'étude et de s'affranchir de l'effet matrice, le nouveau gradient a été développé à partir d'un mélange de quatre peptides : LGPLV*EQGR (peptide spécifique de l'apolipoprotéine E (notée Apo E) et marqué sur la valine (¹³C₅, ¹⁵N₁)), EEFSPLR (peptide protéotypique de la Vitellogénine (notée Vtg 2) de l'espèce *Eurytemora affinis*), LSEPAELTDAVK (peptide protéotypique de l'antigène spécifique de la prostate (noté PSA)) et ILIPGVGK (peptide protéotypique de la Vitellogénine (notée Vtg) de l'espèce *Gammarus fossarum*). Dans les conditions décrites au paragraphe II.3) page 197, les temps de rétention respectifs de ces peptides sont de 8,0 ; 9,1 ; 10,8 et 11,0 minutes. La Figure 79

compare les gradients utilisés en acétonitrile et en méthanol dans les anciennes et les nouvelles conditions :

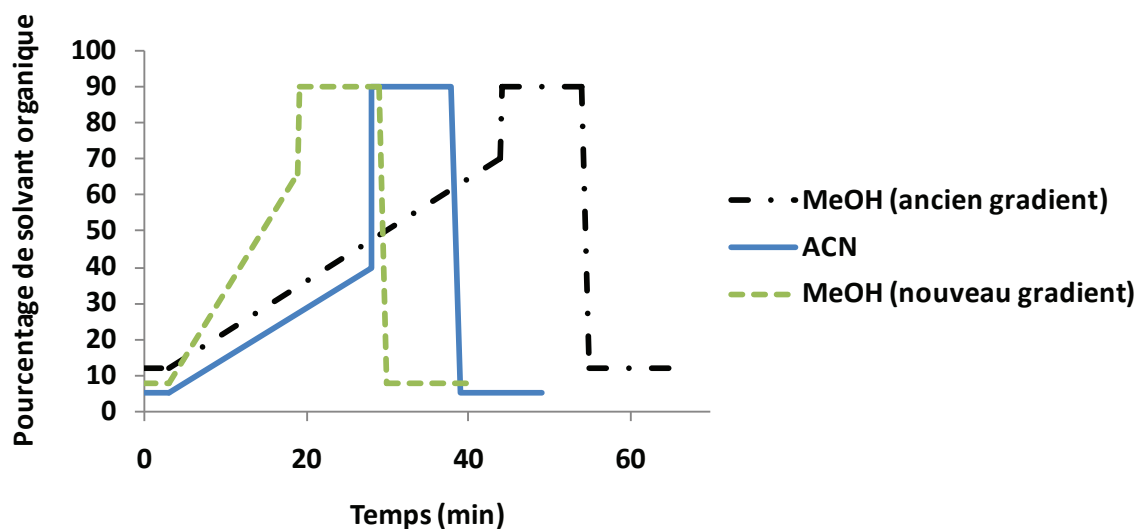


Figure 79 : Comparaison des gradients utilisés en acétonitrile (en bleu) et en méthanol afin de garder la même pente de solvant éluant (en noir) ou d'obtenir des temps de rétention similaires (en vert).

Le nouveau gradient commence par un plateau de 3 min avec 8% de solvant B (méthanol contenant 0,1% d'acide formique). Ce plateau est suivi d'un gradient linéaire de 8 à 66% de B en 16 min puis d'un lavage de la colonne à 90% de B pendant 10 min et d'un reconditionnement à 8% de B pendant 10 min également. La nouvelle pente de gradient est alors de 3,6 % par minute (contre 1,4% par minute précédemment). Les chromatogrammes obtenus avec l'ancien et le nouveau gradient sont présentés sur la Figure 80 :

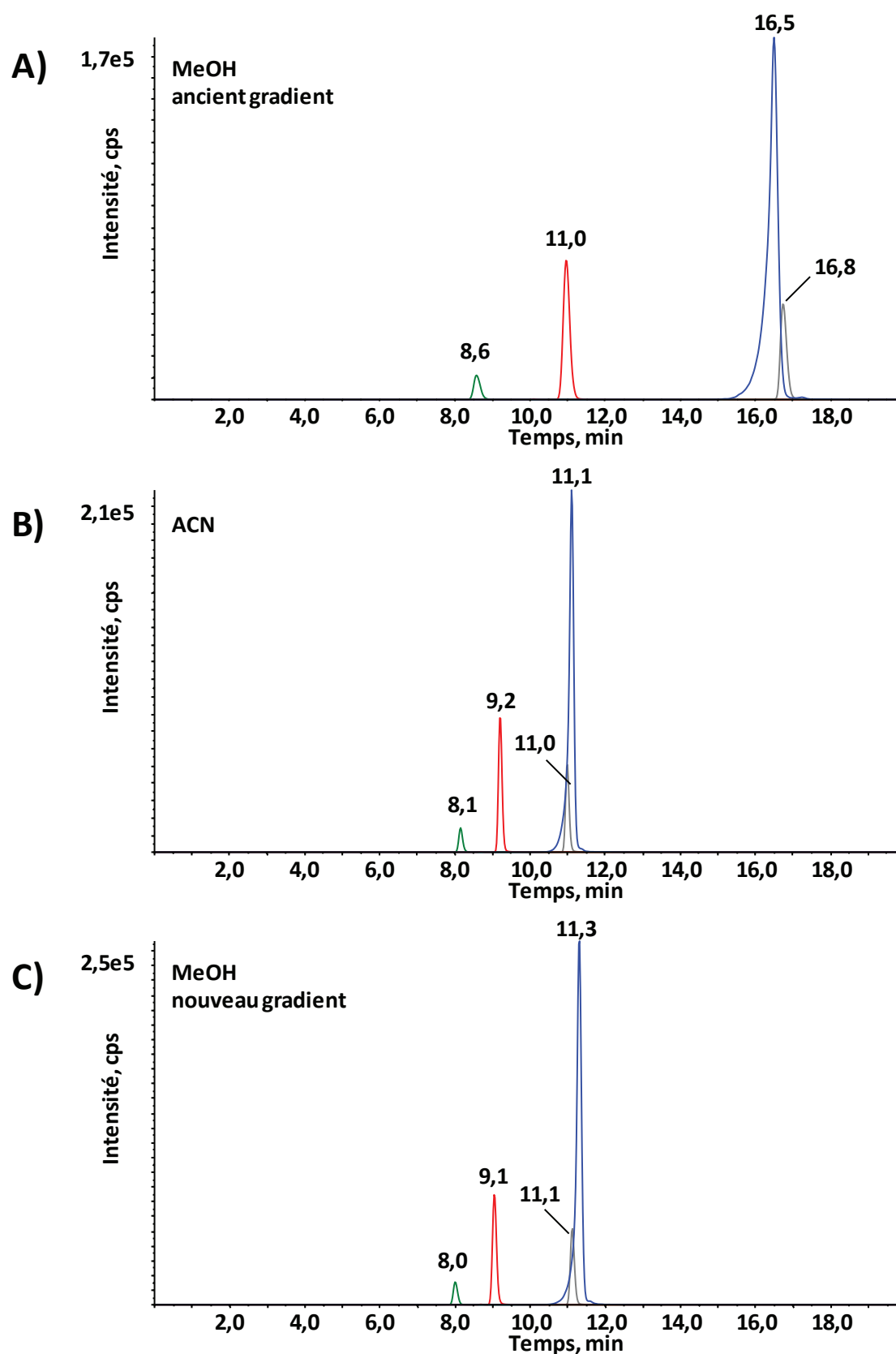


Figure 80 : Chromatogrammes reconstitués de quatre peptides séparés avec une pente de 1,4 % de MeOH (A) ou d'ACN (B) par minute ou une pente de 3,6 % de MeOH par minute (C).

La partie A illustre qu'avec le gradient utilisé précédemment en méthanol, les pics sont élargis mais la capacité de pics est également augmentée par rapport à la séparation obtenue en acétonitrile (partie B). En revanche, avec les nouvelles conditions chromatographiques (partie C), les quatre peptides présentent des différences de temps de rétention inférieures à 0,2 min. Cependant, les largeurs de pics sont les mêmes dans les deux séparations et ces nouvelles conditions seront donc conservées pour la suite. En effet, puisque la différence de temps de rétention entre le premier et le dernier pic élué est quasiment la même et que les largeurs de pics sont identiques, les capacités de pics de ces deux séparations seront les mêmes.

Ensuite, les aires de ces quatre peptides ont été comparées après séparation en ACN ou en MeOH avec le nouveau gradient :

Tableau 23 : Aires mesurées et gain associés pour quatre peptides dans l'eau entre l'ACN et le MeOH (nouveau gradient).

Solvant	EEFSPLR	LGPLV*EQGR	LSEPAELTDAVK	ILIPGVGK
MeOH	5,94E+05	1,28E+05	4,05E+05	2,63E+06
ACN	5,44E+05	1,06E+05	3,55E+05	2,11E+06
Gain (en %)	9,3	20,6	14,1	24,8

Avec les nouvelles conditions chromatographiques, le signal obtenu pour ce mélange de quatre peptides dans l'eau reste légèrement supérieur en utilisant le méthanol à la place de l'acétonitrile.

Dans le but d'essayer de trouver quel(s) phénomène(s) permet(tent) d'obtenir ces différences, quelques propriétés de l'eau, du méthanol et de l'acétonitrile impliquées dans le processus électrospray ont été résumées dans le tableau suivant :

Tableau 24 : Propriétés physico-chimiques du méthanol, de l'acétonitrile et de l'eau.

	MeOH	ACN	Eau
Viscosité à 25 °C (cP) ²⁸⁰	0,56	0,35	0,89
Constante diélectrique ²⁸⁵	33,0	36,6	80,1
Affinité protonique (kJ/mol) ²⁸⁶	754,3	779,2	691
Tension de surface (N/m ²) ³⁰	0,0226	0,03	0,073
Température d'ébullition (°C) ²⁸⁷	64,7	81,6	100
Force éluante sur C18 [ϵ^0] ²⁸⁷	1	3,1	

En électrospray, le signal est régi par le nombre d'ions produits et émis en phase gazeuse. Comme nous l'avons vu au premier chapitre de ce manuscrit, l'éluat de la chromatographie est nébulisé puis le solvant des gouttes ainsi formées est évaporé progressivement jusqu'à l'explosion de la goutte pour former des gouttes plus petites. Ce phénomène est répété jusqu'à l'évaporation totale du solvant (modèle de résidu de charge²⁷) ou jusqu'à l'éjection d'un ion de la gouttelette (modèle

d'évaporation d'ion²⁸⁸). Une goutte va exploser dès que la répulsion des forces coulombiennes est supérieure à la tension de surface de la goutte. Ainsi, si la tension de surface est plus faible, cette explosion coulombienne (et donc la production d'ions en phase gaz) est favorisée. Ensuite, une autre propriété intervient dans la formation d'ions en phase gaz : il s'agit de l'affinité protonique du solvant et de l'analyte. En effet, plus l'affinité protonique du solvant est importante, plus ce dernier va capter de charges positives et donc moins d'ions seront formés (en mode positif). Le Tableau 24 montre que les trois propriétés majeures des solvants pour la formation d'analyte chargé en phase gaz (la tension de surface, la température d'ébullition et l'affinité protonique) sont plus faibles pour le méthanol que pour l'acétonitrile. A quantité de solvant organique équivalent, il devrait donc en résulter un signal plus important en méthanol. Afin de vérifier ceci, la solution précédente contenant les quatre peptides a été injectée sans colonne et en faisant varier le pourcentage d'acétonitrile ou de méthanol dans la phase mobile. Afin de minimiser l'impact du solvant dans lequel sont dilués les peptides (à savoir de l'eau acidifiée), seulement 1 μL de solution a été prélevé pour chaque condition et les résultats sont présentés sur la figure suivante :

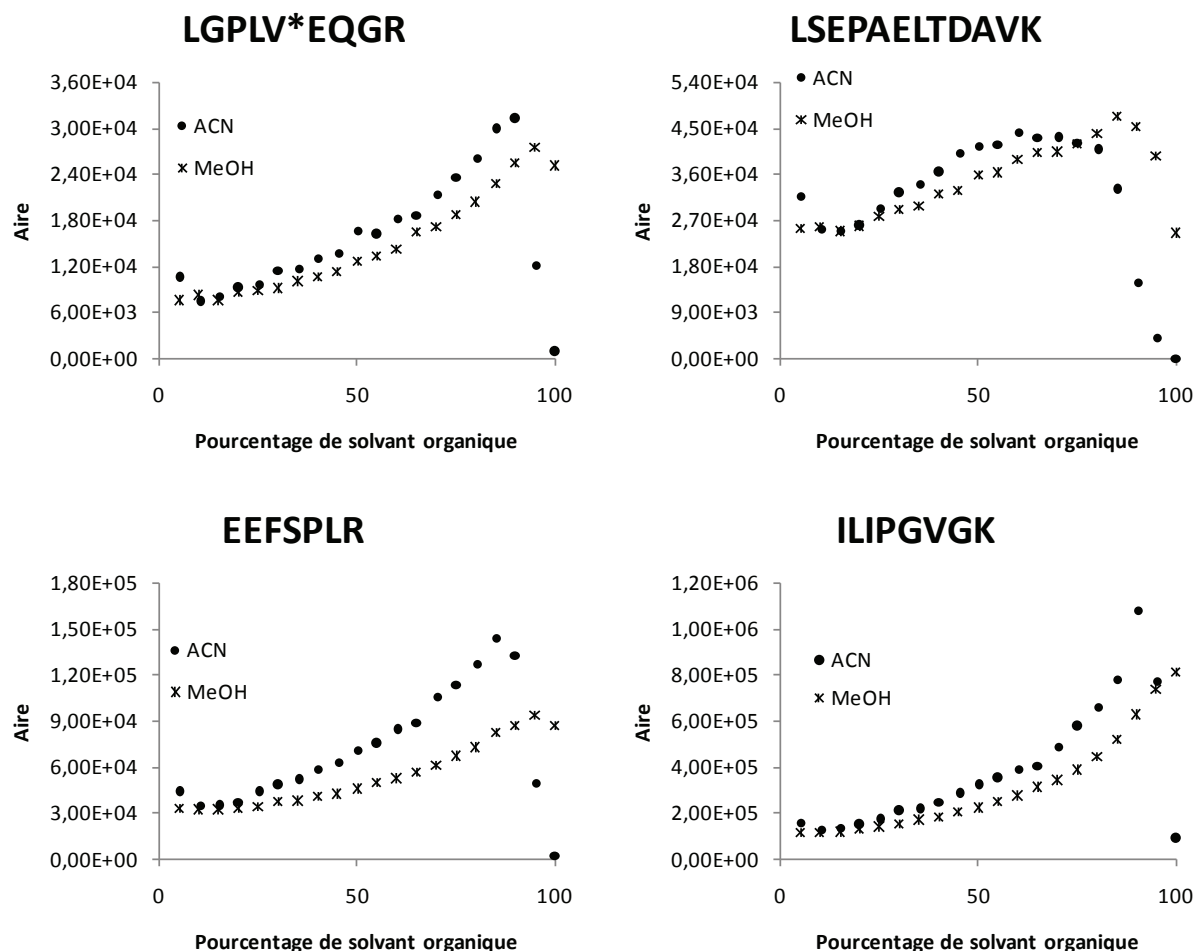


Figure 81 : Evolution de l'aire de quatre peptides en fonction du pourcentage de solvant organique (ACN ou MeOH) dans la phase mobile.

Pour les quatre peptides, le signal mesuré augmente avec la teneur en solvant organique ce qui semble logique avec les explications précédentes. En effet, les propriétés physico-chimiques de l'eau sont très différentes de celles des solvants organiques comme le MeOH et l'ACN. En moyenne, un gain de signal d'un facteur quatre environ est obtenu entre le signal minimal obtenu vers 10 % de solvant organique et le signal maximal obtenu vers 90 % de ce même solvant. Au-delà de 90 %, le signal chute probablement à cause d'une plus faible solubilité des peptides dans ces conditions. Tout moyen d'augmenter la teneur de solvant organique au maximum est donc intéressant. Cela sera d'ailleurs réalisé par la suite lors des essais en chromatographie HILIC. En tout cas, quelle que soit la fraction de solvant organique, le signal obtenu est plus important en utilisant l'acétonitrile que le méthanol (à l'exception de quelques points à forte teneur en acétonitrile pour lesquels les peptides sont probablement moins solubles en ACN qu'en MeOH). Ce résultat est surprenant puisqu'il est contraire à celui attendu si l'on raisonne uniquement avec la tension de surface, la température d'ébullition et l'affinité protonique de l'acétonitrile, du méthanol et de l'eau. L'effet du solvant sur le signal mesuré doit donc se situer avant la formation des gouttes dans la source. Puisqu'une tension de l'ordre de 5000V est appliquée au niveau de la sonde électrospray, une séparation

électrophorétique se produit au niveau de cette dernière. En électrophorèse, la mobilité des analytes est proportionnelle au champ appliqué, à la charge de l'analyte, à la constante diélectrique du milieu et est inversement proportionnelle à la viscosité du milieu et à la taille de l'analyte. Dans les expériences de la Figure 81, tous ces paramètres sont fixés à l'exception de la viscosité et de la constante diélectrique du milieu. Cette constante est supérieure pour l'ACN par rapport au MeOH donc l'utilisation du MeOH à la place de l'ACN défavorise légèrement la séparation de charge. La viscosité des mélanges hydro-organiques dépend quant à elle de la teneur en solvant organique comme le montre le tableau suivant :

Tableau 25 : Evolution de la viscosité d'un mélange hydro-organique dans le cas de l'ACN et du MeOH à 25°C (d'après Colin *et al.*²⁸⁹).

Pourcentage de solvant organique	0	10	20	30	40	50	60	70	80	90	100
Viscosité (cP) si ACN	0,89	1,01	0,98	0,98	0,89	0,82	0,72	0,59	0,52	0,46	0,35
Viscosité (cP) si MeOH	0,89	1,18	1,40	1,56	1,62	1,62	1,54	1,36	1,12	0,84	0,56

La viscosité maximale d'un mélange eau-acétonitrile est obtenue avec 10% d'ACN alors qu'il faut 40 à 50% de MeOH pour atteindre la viscosité la plus élevée dans un mélange eau / méthanol. Dans tous les cas, la viscosité est toujours plus importante avec le méthanol. Il en résulte une mobilité électrophorétique réduite avec le méthanol par rapport à l'acétonitrile. De ce fait, la séparation de charge est moins efficace lorsque le méthanol est utilisé comme phase mobile. Ce phénomène pourrait expliquer pourquoi le signal obtenu dans la Figure 81 est moins intense en MeOH qu'en ACN à teneur de solvant organique identique.

Cependant, la force éluante sur C₁₈ [ϵ°] est plus faible pour le méthanol que pour l'acétonitrile, il faut donc plus de MeOH que d'ACN pour éluer un composé. Les signaux obtenus ont donc été comparés au pourcentage de solvant organique lors de l'élution de chaque peptide :

Tableau 26 : Aires mesurées sans colonne en ACN et en MeOH avec les gains associés.

Peptide	ACN				MeOH				
	Tr sur colonne	% ACN avec colonne ^(a)	% ACN utilisé sans colonne	Aire mesurée sans colonne	Tr sur colonne	% MeOH avec colonne ^(a)	% MeOH utilisé sans colonne	Aire mesurée sans colonne	Gain obtenu sans colonne (en %) ^(b)
LGPLV*EQGR	8,0	12,0	10	7,38E+03	8,0	26,1	25	8,71E+03	18,0
EEFSPLR	9,1	13,5	15	3,51E+04	9,1	30,1	30	3,75E+04	7,0
LSEPAELTDAVK	10,8	15,9	15	2,50E+04	11,1	37,4	35	2,95E+04	18,2
ILIPGVGK	11,1	16,3	15	1,39E+05	11,3	38,1	35	1,71E+05	22,3

^(a)calculé par : $\% = x_1 + (t_r - x_2) * p$ Avec x_1 , le pourcentage de solvant organique en début de gradient ($x_1 = 5$ pour l'ACN et $x_1 = 8$ pour le MeOH) ; x_2 , la durée du plateau de début de gradient ($x_2 = 3$ pour l'ACN et le MeOH) et p , la pente de solvant organique lors du gradient ($p = 1,4$ pour l'ACN et $p = 3,625$ pour le MeOH)

^(b)calculé par : $Gain = \left(\frac{Aire\ mesurée\ avec\ le\ méthanol}{Aire\ mesurée\ avec\ l'acétonitrile} - 1 \right) \times 100$

Dans ce tableau, les temps de rétention obtenus avec les gradients de la Figure 79 B sont reportés pour les quatre peptides de l'étude. Pour chacun de ces temps de rétention, la fraction de solvant organique lors de l'élution du peptide a été calculée (cf. colonne « % ACN avec colonne »). Afin de calculer un gain de signal en fonction du solvant utilisé à partir des données de la Figure 81, cette fraction de solvant organique a été arrondie (cf. colonne « % ACN utilisé sans colonne »). Les aires reportées sont donc celles issues de la Figure 81 et correspondant à cette fraction de solvant organique arrondie (cf. colonne « aire mesurée sans colonne »). Ceci a donc permis de calculer le gain de signal apporté par l'utilisation du MeOH mais sans colonne chromatographique. Ainsi, le signal du peptide protéotypique de l'Apo E qui est élué avec environ 12% d'ACN lors du gradient décrit au paragraphe II.3) page 197 a été mesuré sans colonne avec 10% d'ACN dans la phase mobile. Ce peptide, est élué avec environ 26% de MeOH avec le nouveau gradient développé (cf. Figure 79, page 205). Sans colonne, l'aire de ce peptide a été mesurée avec 25% de MeOH dans la phase mobile. La comparaison de ces deux aires sans colonne indique un gain de signal de 18% avec le MeOH. Ce gain est du même ordre de grandeur que celui mesuré avec la colonne : en effet, il était de 20,6% (cf. Tableau 23, page 207). Le même constat peut être fait pour les trois autres peptides : les peptides spécifiques de la Vtg 2, du PSA et de la Vtg ont des gains respectifs de 9,3 ; 14,1 et 24,8 % avec colonne et de 7,0 ; 18,2 et 22,3 % sans colonne.

Plusieurs phénomènes entrent donc en jeu pour la production d'ions. D'abord, la plus forte viscosité des mélanges eau / méthanol par rapport aux mélanges eau / acétonitrile défavorise la séparation de charges au niveau de l'aiguille électrospray et donc la quantité de charges présentes dans les gouttes nébulisées sera plus faible avec le méthanol. Ceci explique le plus faible signal mesuré en MeOH qu'en ACN à teneur identique de solvant organique. En revanche, il faut 15 à 20% de MeOH

supplémentaire pour éluer un peptide. Puisque le MeOH est plus volatil que l'ACN et que sa tension de surface est également plus faible, les ions vont être plus facilement émis de la goutte car le MeOH sera évaporé plus vite et la limite de Rayleigh sera atteinte plus rapidement qu'avec l'ACN. Enfin, une fois l'analyte émis en phase gaz, sa protonation sera plus importante avec le MeOH qui a une affinité protonique plus faible que l'ACN. Le fait qu'une plus grande quantité de MeOH soit nécessaire pour éluer un analyte permet donc de compenser le handicap initial lié d'une part à la viscosité du MeOH, et d'autre part à sa plus faible constante diélectrique, et explique le faible gain de signal observé en remplaçant l'ACN par le MeOH lors d'une séparation chromatographique. Bien que ce gain reste néanmoins faible, le coût de l'analyse est réduit du fait du plus faible prix du méthanol par rapport à celui de l'acétonitrile.

La plus forte viscosité du méthanol par rapport à l'acétonitrile est généralement un frein quant à l'utilisation du MeOH comme modificateur organique. En effet, cette viscosité s'accompagne d'une pression plus importante dans le système chromatographique. Les tracés de pression obtenus lors des séparations de la Figure 80 (B et C), page 206 sont présentés sur la Figure 82 :

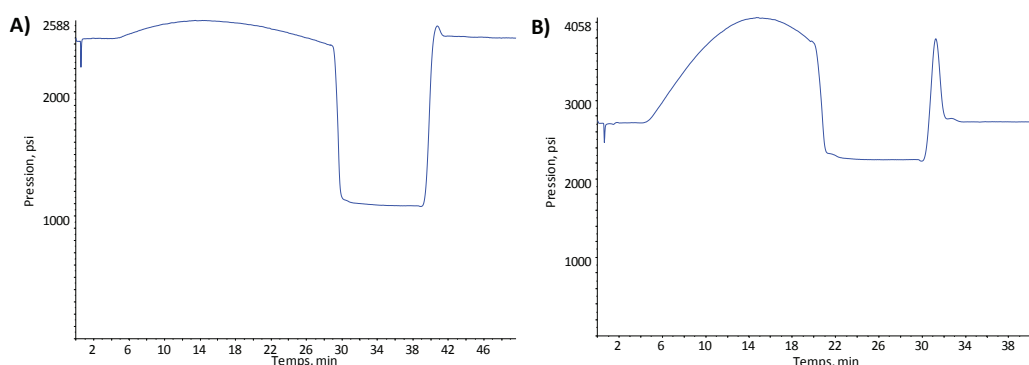


Figure 82 : Profils de pressions obtenus avec les conditions chromatographiques décrites au paragraphe II.3), page 197 pour l'acétonitrile (A) ou avec celles décrites au paragraphe III.2) page 204 pour le méthanol (B) comme modificateur organique.

Cette figure illustre la pression plus importante obtenue en utilisant du méthanol. Cependant, dans les conditions utilisées (colonne de 2,1 x 100 mm, taille de particules de 3,5 μm et débit de 300 $\mu\text{L} / \text{min}$) qui sont assez courantes, la pression maximale obtenue est de 4058 psi (soit environ 280 bar) ce qui ne représente pas une limite pour les chaînes chromatographiques actuelles.

Pour conclure ces travaux, ces quatre peptides ont également été étudiés dans une matrice complexe afin de vérifier si le MeOH permettait de réellement améliorer la sensibilité d'un dosage par LC-MS/MS en tenant compte d'un effet matrice potentiel.

III.3) Etude de la réponse dans le sérum

Les quatre peptides étudiés précédemment ont donc été ajoutés à différentes concentrations dans du sérum digéré. Ces solutions ont ensuite été injectées en utilisant les deux gradients permettant d'obtenir des temps de rétention similaires. Les chromatogrammes reconstruits d'une transition SRM de chacun de ces peptides sont représentés sur la figure suivante à deux niveaux de concentration : en matrice blanche et à une concentration proche de la limite de quantification :

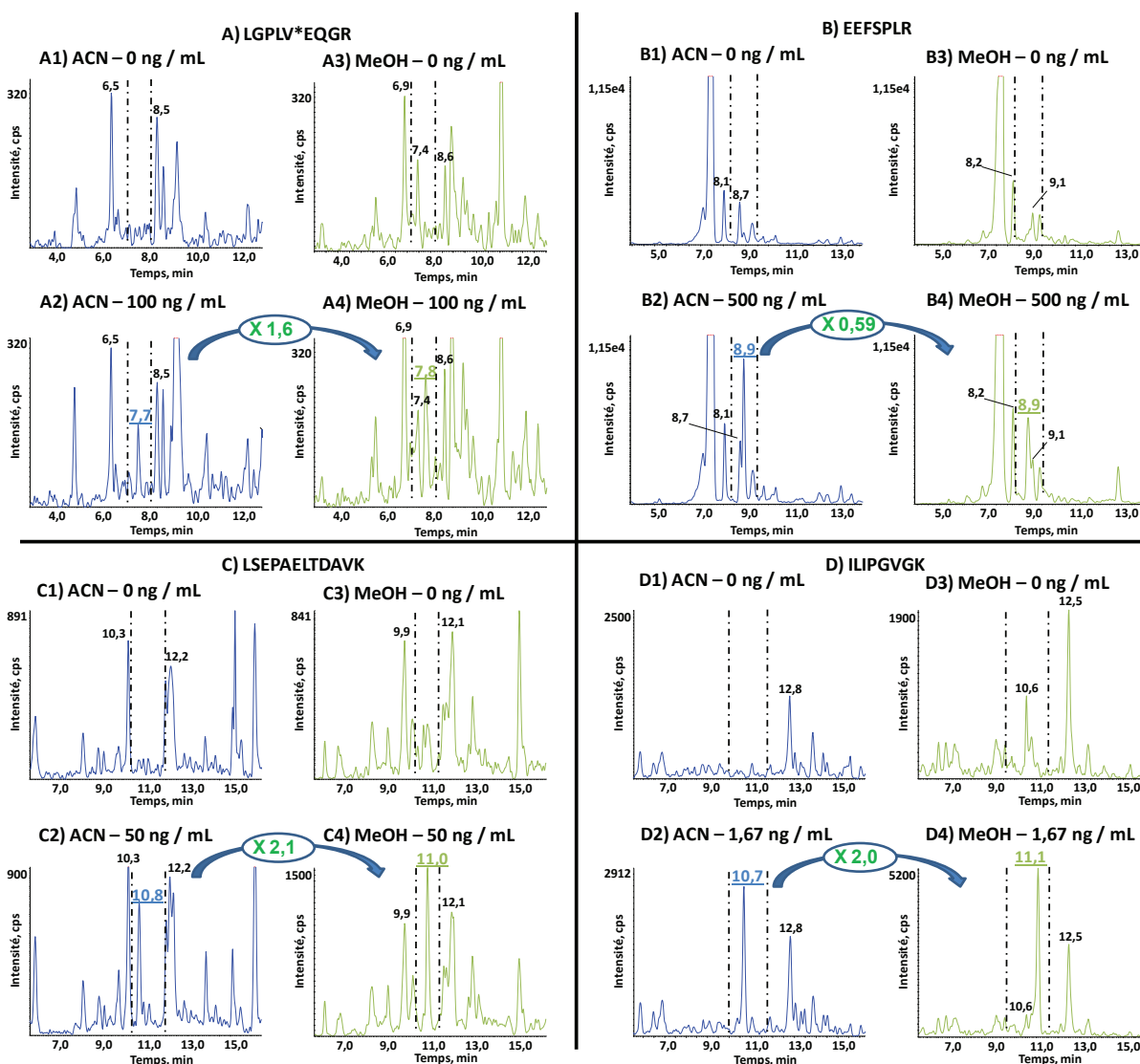


Figure 83 : Chromatogrammes reconstitués des peptides LGPLV*EQGR (transition SRM 487,8 / 707,4) (A), EEFSPLR (transition SRM 439,2 / 472,3) (B), LSEPAELTDAVK (transition SRM 636,8 / 943,5) (C) et ILIPGVGK (transition SRM 398,8 / 457,2) (D) ajouté dans du sérum digéré à 0 ng / mL (1-3) ou proche de la limite de quantification (2-4) après séparation en utilisant l'ACN (en bleu) ou le MeOH (en vert).

Bien que l'analyse par SRM permette une détection très spécifique des peptides recherchés, ces chromatogrammes illustrent qu'en matrice très complexe comme le sérum, de nombreux

interférents apparaissent. Déterminer le temps de rétention de l'analyte d'intérêt peut devenir délicat dans ces conditions. C'est l'une des raisons pour lesquelles il est également recommandé de suivre plusieurs transitions SRM pour chaque composé. En effet, il sera moins probable que plusieurs transitions SRM soient détectées à des temps identiques et avec des rapports d'aires identiques à ceux du peptide étudié. Ces chromatogrammes montrent également l'intérêt des méthodes de préparation d'échantillon présentées au premier chapitre de ce manuscrit afin d'éliminer un maximum d'interférents de la matrice. Ils illustrent également tout l'intérêt de la MRM³ dont le principe a également été décrit dans le premier chapitre.

Dans ces conditions chromatographiques, le temps de rétention respectif des peptides LGPLV*EQGR, EEFSPLR, LSEPAELTDAVK et ILIPGVGK est de 7,8 min, 8,9 min, 11,0 min et 11,1 min lorsque le MeOH est le solvant éluant. Pour les quatre transitions SRM présentées ici, le bruit est similaire en ACN et en MeOH. En revanche, le signal est légèrement supérieur en MeOH pour ces peptides à l'exception du peptide EEFSPLR (cf. Figure 83 B). Pour trois peptides parmi ces quatre, le rapport signal sur bruit est donc légèrement augmenté avec le MeOH. Cette augmentation reste très faible et ne va donc pas permettre d'observer un gain significativement important. En revanche, l'utilisation du MeOH n'engendre pas une perte de sensibilité de la méthode de dosage sauf pour le peptide EEFSPLR. Pour ce peptide, un gain de 9,3 % avait été obtenu sans matrice avec le méthanol (cf. Tableau 23). La perte de signal observée dans le sérum s'explique par un effet matrice différent sur ce peptide avec l'ACN ou le MeOH. En effet, ces deux solvants engendrent des sélectivités différentes et donc deux séparations identiques à 100 % ne peuvent pas être obtenues. Ceci est illustré avec l'interférent élué à 8,7 min en ACN (cf. Figure 83-B1) et à 9,1 min en MeOH (cf. Figure 83-B3) alors que l'analyte est élué à 8,9 min dans les deux cas (cf. Figure 83-B2 et B4).

III.4) Conclusion et perspectives sur l'utilisation du MeOH

L'étude présentée ici permet de confirmer indirectement les travaux de Giorgianni *et al.*²⁹⁰ qui ont mis en évidence que l'utilisation de méthanol dans la phase mobile à la place de l'acétonitrile permettait d'augmenter le recouvrement de séquence de protéines par LC-MS/MS probablement grâce à une meilleure sensibilité. Dans leur étude, des matrices peu complexes ont été étudiées puisque les analyses ont été effectuées soit sur un mélange simple de peptides (solution de quatre peptides ou digest de deux protéines), soit sur un digest de protéines de glande pituitaire extraites d'une séparation sur gel 2D. La présente étude a donc augmenté le niveau de complexité de l'échantillon puisqu'elle a été réalisée sur du sérum digéré non déplété des protéines majoritaires. De plus, des expériences supplémentaires ont été réalisées afin de comprendre quel(s) phénomène(s) engendrerai(en)t un gain de signal lors de l'utilisation du méthanol à la place de l'ACN.

En effet, les propriétés du méthanol semblent favoriser l'émission d'ions en phase gazeuse par rapport à celles de l'acétonitrile lors du processus électrospray : tension de surface, température d'ébullition et affinité protonique plus faibles pour le méthanol. Cependant, de façon surprenante, l'ACN donne un meilleur signal que le MeOH (de 10 à 20% environ) à pourcentage de solvant organique identique. Ceci suggère donc que d'autres propriétés de ces solvants entrent en jeu et que ces propriétés ont une influence plus forte que ces trois paramètres. Ces propriétés pourraient être

la viscosité de la phase mobile et la constante diélectrique du milieu. En effet, les mélanges hydro-organiques sont plus visqueux lors de l'utilisation de MeOH que d'ACN. De même, la constante diélectrique du MeOH est plus faible que celle de l'ACN. Par conséquent, la séparation de charges au niveau de l'aiguille électrospray est moins efficace avec le MeOH. La quantité de charges disponibles pour protoner les ions est donc moins importante quand le MeOH est utilisé dans la phase mobile. Ainsi, à quantité de solvant organique identique, le signal obtenu avec le MeOH est moins important.

Cependant, le MeOH étant moins éluant que l'ACN en phase inverse, une plus grande quantité de MeOH est nécessaire pour éluer un analyte. Cette différence de quantité de solvant organique à l'élution semble permettre de contre balancer l'effet néfaste de la moins bonne séparation de charges en présence de MeOH par une désolvatation plus rapide liée à la température d'ébullition et à la tension de surface plus faible du MeOH par rapport à celles de l'ACN. Au final, après séparation sur colonne chromatographique, le signal obtenu avec le MeOH est plus intense sans matrice. Dans le sérum, les écarts peuvent être modifiés du fait de la sélectivité différente de ces deux solvants et donc d'un effet matrice qui peut varier d'un solvant à l'autre. Cependant, en conservant la même pente de solvant organique, des gains de signal beaucoup plus importants peuvent être obtenus (ces gains sont en moyenne de 74%) grâce à une capacité de pics accrue et donc à un effet matrice amoindri après séparation avec le MeOH. La capacité de pics pourrait également être augmentée avec l'ACN en diminuant la pente du gradient. Dans ce cas, les analytes seront élués avec un plus fort pourcentage d'eau ce qui va diminuer le signal du fait d'une plus mauvaise désolvatation. Le changement de pente de gradient en ACN nécessite également de passer plus de temps pour redévelopper la séparation chromatographique alors que le simple fait de conserver le même gradient et de remplacer l'ACN par le MeOH est un moyen simple et rapide d'améliorer la sensibilité des méthodes de dosage existantes et cela à moindre coût.

Pour valider le fait que la séparation de charges moins efficace avec le MeOH soit à l'origine du signal mesuré plus faible, de nouvelles expériences pourraient être réalisées avec d'autres solvants. Pour être une meilleure alternative à l'ACN que le MeOH, ce solvant doit donc avoir une force éluante en phase inverse, une viscosité, une tension de surface, une température d'ébullition et une affinité protonique plus faible que le MeOH. Par exemple, une recherche effectuée dans une base de données interne du laboratoire et répertoriant 295 solvants a permis d'identifier que le solvant qui est à la fois plus hydrophile (et qui serait donc moins éluant en phase inverse) et plus volatil que le MeOH est l'acrylonitrile. En effet, puisqu'il est plus polaire que le MeOH, il faudrait encore plus d'acrylonitrile que de MeOH pour éluer un peptide. De plus, sa température d'ébullition est inférieure à celle de l'eau (77°C), sa viscosité vaut 0,34 cP (contre 0,56 cP pour le MeOH) et sa tension de surface vaut 0,0267 N / m (ce qui est un peu supérieur à celle du MeOH (0,0226 N / m) mais inférieur à celle de l'ACN (0,03 N / m)). Cependant, l'acrylonitrile est très peu soluble dans l'eau (environ 70 g / L). De plus, il est très réactif et va se polymériser. Il ne pourra donc pas être utilisé comme phase mobile en chromatographie liquide en phase inverse.

Il faut donc se tourner vers un solvant qui soit plus éluant que le MeOH mais dont les autres propriétés physico-chimiques permettent de contre balancer le fait que moins de solvant organique sera nécessaire pour éluer un peptide. Par exemple, l'acétone est un solvant plus éluant que l'ACN mais a une température d'ébullition (56°C), une tension de surface (0,0228 N / m) et une viscosité (0,33 cP) plus faibles que l'ACN. Ce solvant a déjà été évalué pour remplacer l'ACN dans deux études.

Dans la première, les auteurs ont comparé le nombre de peptides identifiés après digestion de quelques protéines et ont conservé le même gradient de séparation. D'une manière générale, l'utilisation de l'acétone a conduit à une augmentation du nombre de peptides identifiés²⁸⁷. Il est intéressant de remarquer que dans cette étude, le MeOH a également été évalué et a conduit à un nombre de peptides identifiés inférieur à l'ACN. L'une des explications avancées par les auteurs est que certains peptides ne seraient pas élués de la colonne dans les conditions chromatographiques utilisées. La seconde étude s'est consacrée à la séparation et à l'infusion de quelques peptides sans matrice en remplaçant l'ACN par l'acétone. L'utilisation de l'acétone s'accompagne d'un élargissement des pics chromatographiques de 15 à 50 % mais également de l'augmentation du signal de certains peptides lors de leur infusion avec 25% de solvant organique²⁹¹. Cette augmentation de signal était attendue puisque la température d'ébullition, la tension de surface et la viscosité de l'acétone sont plus faibles que celles de l'ACN. Cependant, cette augmentation de signal reste à évaluer en couplage chromatographique puisque l'acétone est beaucoup plus éluant que l'ACN ($\epsilon^{\circ}_{\text{acétone}} = 8,8$; $\epsilon^{\circ}_{\text{ACN}} = 3,1$). En effet, il faudra donc moins de solvant organique pour éluer un peptide. Par conséquent, la sensibilité risque d'être diminuée en utilisant l'acétone d'autant plus que les pics chromatographiques sont élargis. De plus, l'influence de l'utilisation à long terme d'acétone sur les colonnes de phase inverse n'a pas été déterminée. Il faut également être vigilant sur la compatibilité des joints des pistons de la chaîne chromatographique avec l'utilisation d'acétone comme phase mobile.

Si un autre solvant ne peut pas être trouvé, il faut alors chercher un moyen d'augmenter la rétention des peptides afin d'avoir besoin d'une quantité de solvant organique plus importante pour les éluer. Cette rétention peut être augmentée en rendant la phase stationnaire plus hydrophobe. L'un des moyens de réaliser ceci est d'augmenter le taux de carbone de la phase stationnaire. Ceci peut être réalisé soit en augmentant la longueur du greffon soit en augmentant le taux de greffage. Il pourrait également être intéressant d'évaluer l'impact de la température dans la colonne. En effet, il a déjà été reporté que l'augmentation de la température de la phase mobile permettait de diminuer la rétention des analytes²⁸⁰. Ainsi, il faut moins de solvant organique pour éluer un peptide : on estime qu'une augmentation de 4°C de la phase mobile a environ le même effet qu'augmenter le pourcentage de solvant organique de 1%²⁹². Puisque notre objectif est d'augmenter la teneur de solvant organique pour éluer un peptide et non de la diminuer, il pourrait être intéressant d'évaluer l'impact de la baisse de température de la phase mobile sur la rétention. Cependant, outre le fait que la température ne va pas pouvoir être fortement diminuée, ceci engendrerait une augmentation de la viscosité de la phase mobile et donc une séparation de charges moins efficace au niveau de l'aiguille électrospray. De plus, cette baisse de température s'accompagnerait d'une très faible augmentation du taux de MeOH nécessaire pour éluer un peptide. Dans ce cas, effectuer la séparation en augmentant la température est un moyen efficace de diminuer la viscosité de la phase mobile mais ceci va s'accompagner d'une diminution de la rétention. Pour rassembler les avantages des séparations à basse et à haute température (*i.e.* phase mobile moins éluante et moins visqueuse), il faudrait donc réaliser un montage dans lequel la colonne chromatographique soit placée dans un milieu réfrigéré et le capillaire reliant la sortie de la colonne à la source du spectromètre de masse soit situé dans un four chauffé afin de diminuer la viscosité du solvant avant la source électrospray.

Enfin, concernant l'augmentation de viscosité générée par l'utilisation du MeOH, elle n'est pas suffisamment importante pour constituer un frein à l'utilisation du MeOH grâce aux contre pressions supportées par les chaînes chromatographiques actuelles. Bien qu'utilisé presque systématiquement comme modificateur organique dans la phase mobile, l'acétonitrile n'est pas forcément le meilleur choix à faire dans un but de quantification de protéines par le biais d'un peptide protéotypique. Pour conclure, l'utilisation du MeOH à la place de l'ACN est un moyen rapide et simple permettant dans la majorité des cas d'améliorer la sensibilité de la méthode de dosage par LC-MS/MS. Le MeOH devrait même être le solvant utilisé comme premier choix. L'ACN quant à lui ne devrait être évalué qu'ensuite lors d'une optimisation plus fine de la méthode. Cette étude optionnelle doit permettre de voir si un gain peut être apporté dans le cas où le peptide étudié représente l'une des exceptions pour lesquelles le signal serait plus important en utilisant l'ACN.

Puisque l'augmentation de la teneur de solvant organique pour éluer un peptide semble difficile à obtenir en phase inverse, il peut être envisagé d'ajouter un té en sortie de colonne chromatographique afin de diluer l'éluat dans un solvant organique. Ceci va donc permettre d'augmenter la teneur de solvant organique à l'entrée de la source électrospray. Un tel montage va s'accompagner d'une augmentation du débit qui va être délétère pour la désolvatation. Il faudra donc trouver le bon compromis entre gain de signal apporté par l'augmentation de la quantité de solvant organique et perte de signal engendrée par l'augmentation du débit de la phase mobile et la dilution des analytes ainsi générée.

Une autre alternative permettant de fortement augmenter la teneur de solvant organique pour éluer un peptide est de changer de mode de séparation pour faire de la chromatographie liquide d'interactions hydrophiles (HILIC). Ce mode de séparation pour la quantification absolue de peptides par LC-MS/MS va donc être évalué dans les prochains paragraphes.

III.5) Evaluation de la chromatographie liquide d'interactions hydrophiles (HILIC)

Les paragraphes précédents ont permis de mettre en évidence que le fait d'augmenter le pourcentage de solvant organique permettait d'augmenter le signal car la désolvatation était alors favorisée. Cependant, les peptides étudiés (qui sont des peptides issus d'une digestion par de la trypsine et dont la masse est généralement inférieure à 2 000 Da) sont élués en phase inverse avec au maximum 25% d'acétonitrile alors que l'idéal serait d'avoir une élution avec environ 80% de solvant organique comme nous l'avons vu sur la Figure 81 page 209. Pour réaliser ceci, il faut changer de mode de séparation et faire de la chromatographie liquide d'interactions hydrophiles (HILIC) dont nous allons rappeler le principe.

III.5.1) Principe de l'HILIC

Le terme HILIC a été introduit pour la première fois en 1990 par Alpert²⁹³ comme une alternative à la chromatographie en phase normale. Il a utilisé cette technique pour la séparation d'acides aminés,

de peptides, de sucres, d'oligonucléotides, de bases et d'acides organiques. En HILIC, la phase stationnaire est polaire et la phase mobile est un mélange hydro-organique. L'élution est réalisée en augmentant le pourcentage aqueux de la phase mobile. La rétention en HILIC est principalement due à deux mécanismes comme le montre la Figure 84 :

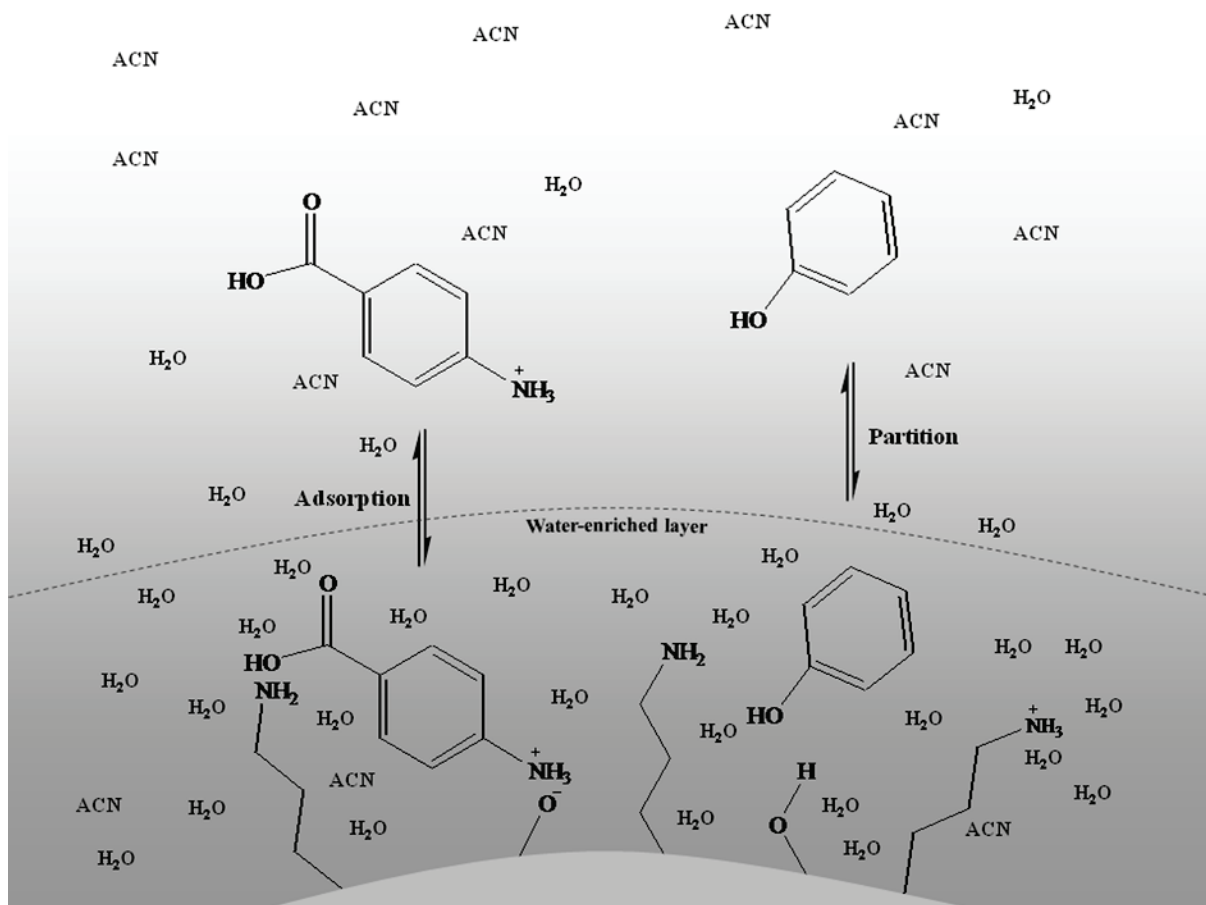


Figure 84 : Mécanismes de rétention en HILIC (d'après Nguyen *et al.*, 2008³⁰).

Dans cet exemple, la phase stationnaire est de la silice greffée par des groupements de type propylamine et la phase mobile est un mélange eau / acétonitrile. Il y a d'abord la formation d'une couche enrichie en eau à la surface de la phase stationnaire. Cette couche d'eau est primordiale pour la rétention en HILIC c'est pourquoi il faut toujours un minimum de 3% d'eau dans la phase mobile. La rétention est due en partie à un partage de l'analyte entre la phase mobile et la couche d'eau. Cette technique est donc adaptée à la séparation de composés polaires solubles dans l'eau. Les analytes sont également retenus par un mécanisme d'adsorption sur la phase stationnaire. Cette adsorption peut être due à des liaisons hydrogènes, à des interactions dipôle-dipôle ou à des interactions électrostatiques. Le choix du greffon de la phase stationnaire est donc primordial pour changer la sélectivité des séparations en HILIC.

Comme tout changement de phase stationnaire en phase inverse, le fait de réaliser une séparation en HILIC permet d'obtenir une sélectivité différente ce qui peut permettre la séparation de deux composés inséparables (ou très peu retenus) en phase inverse. Dans ce contexte, L'HILIC a beaucoup

été appliquée pour la séparation de composés basiques faiblement retenus en phase inverse (cf. Dejaegher et Heyden²⁹⁴ qui ont publié une revue sur ce sujet).

Un autre avantage de l'HILIC est lié à la viscosité des solvants. En effet, les phases mobiles en HILIC sont moins visqueuses qu'en phase inverse puisque la viscosité de l'acétonitrile vaut 0,35 centipoise à 25°C et celle de l'eau vaut 0,89 centipoise à la même température²⁸⁰. Il en résulte une contre-pression beaucoup plus faible en HILIC qu'en phase inverse sous les mêmes conditions à savoir mêmes longueur de colonne, taille de particules et débit de phase mobile. Ainsi, en HILIC, des séparations peuvent être réalisées avec des débits plus importants. Par exemple, la séparation de trois composés sur une colonne de 50 mm de long pour un diamètre de 3 mm avec des tailles de particules de 5 µm a été obtenue en trente secondes sous un débit de 4 mL / min avec une pression de seulement 120 bar²⁹⁵.

Les deux dernières caractéristiques font des colonnes HILIC un choix très avantageux lors de séparations en chromatographie bidimensionnelle (LC-2D). Le principe de la LC-2D est d'effectuer une séparation chromatographique classique (par exemple en phase inverse), de récupérer l'éluat de la colonne en x fractions et d'analyser ces x fractions dans une seconde dimension (par exemple en HILIC). Lorsque l'analyse de toutes les fractions se fait en ligne, on parle de « comprehensive LC ». Cette approche nécessite donc une séparation ultra rapide (quelques dizaines de secondes en incluant le temps de rééquilibration de la colonne) dans la seconde dimension ce qui est permis avec les colonnes HILIC.

En phase inverse, le solvant majoritaire lors de l'élution est l'eau. En revanche, en HILIC, la phase mobile est constituée principalement de solvant organique. Typiquement, des mélanges eau / acétonitrile sont utilisés. La désolvatation va donc être favorisée en HILIC et les limites de quantification seront abaissées. Ce phénomène a été largement exploité pour la séparation de petites molécules. Par exemple, un gain d'intensité d'un facteur neuf entre l'HILIC et la phase inverse a été reporté²⁹⁶ pour l'analyse de la choline et de l'acétylcholine. En revanche, à notre connaissance, le gain de sensibilité apporté par l'HILIC pour la quantification de peptides n'a jamais été décrit.

L'objectif de cette étude est donc de comparer les limites de quantifications qui peuvent être obtenues en HILIC et en phase inverse pour la quantification absolue d'une protéine en matrice complexe *via* un peptide protéotypique après digestion enzymatique.

III.5.2) Choix des phases stationnaire et mobile

Il existe de nombreuses phases stationnaires utilisables en HILIC : silice pure, diol, amine, amide, cyano, zwitterionique. Van Dorpe *et al.* ont comparé les comportements chromatographiques de cinq types de phase stationnaire sur un mélange de dix peptides contenant de 2 à 51 acides aminés. Après analyse des résultats en composantes principales, ils ont ainsi différencié trois groupes de phase stationnaire : silice, zwitterionique ou polyaspartamide²⁹⁷. Ces types de phases stationnaires ont par ailleurs déjà été utilisés pour la séparation de peptides²⁹⁷⁻²⁹⁹.

Trois types de phases stationnaires ont donc été évalués dans notre étude. La colonne de silice pure est une Kinetex HILIC provenant de Phenomex (Torrance, CA, USA) avec des tailles de particules de 2,6 μm . La colonne zwitterionique est une Nucleodur® HILIC de Macherey Nagel (Düren, Allemagne). Cette colonne a pour phase stationnaire des particules de 1,8 μm de diamètre constituées de silice modifiée par une amine quaternaire et un acide sulfonique. Quel que soit le pH de la phase mobile, ces deux groupements portent une charge (positive pour le premier et négative pour le second). La troisième colonne est une XBridge amide de Waters (Milford, MA, USA) ayant des particules de silice greffée par un groupe dont l'extrémité libre est une fonction amide et de 3,5 μm de diamètre. Ces trois colonnes ont un diamètre de 2,1 mm et une longueur de 100 mm. Afin de minimiser les sources de variations entre chaque condition, les mêmes gradients d'élution ainsi que les mêmes débits ont été conservés pour les trois colonnes. Le débit choisi est de 300 $\mu\text{L} / \text{min}$ ce qui est légèrement inférieur au débit optimal des deux autres colonnes (qui se situe entre 500 et 600 $\mu\text{L} / \text{min}$). L'utilisation d'un débit inférieur au débit optimal s'accompagne d'une perte d'efficacité et donc les pics chromatographiques seront un peu plus larges. Cependant, une augmentation du débit de la phase mobile va engendrer une forte baisse de la sensibilité en ESI-MS puisque la désolvatation des ions va diminuer. Cette baisse de sensibilité n'est pas compensée par l'affinement des pics chromatographiques, c'est pourquoi le débit de 300 $\mu\text{L} / \text{min}$ a été conservé pour les trois colonnes.

Concernant le choix de la phase mobile, des mélanges eau / acétonitrile sont utilisés. Des tests ont été réalisés avec le méthanol à la place de l'ACN mais il est tellement éluant en HILIC que tous les peptides ont été élués au volume mort. Des conditions supplémentaires avec le MeOH n'ont donc pas été évaluées. Concernant la composition de la phase mobile, l'utilisation de tampon est fortement recommandée. En effet, les tampons vont réduire les interactions entre les analytes chargés et les silanols déprotonés à la surface de la phase stationnaire. Puisque la détection se fait par spectrométrie de masse, le tampon choisi doit être volatile, c'est pourquoi les sels d'acétate ou de formiate d'ammonium sont fréquemment employés³⁰⁰⁻³⁰¹. D'une manière générale, une phase mobile contenant 10 mM de formiate d'ammonium a pH 3 est utilisée^{296, 302-303}.

Dans un premier temps, la séparation a donc été évaluée sur un mélange de trois protéines digérées peu onéreuses (la HSA, la myoglobine et le lysozyme C) à une concentration de 20 $\mu\text{g} / \text{mL}$ dans 83 % d'ACN afin de réaliser un mélange peptidique assez simple. Seulement les six peptides donnant la meilleure réponse ont été suivis car dans certaines conditions, la majorité des peptides n'était plus détectée. Ces six peptides ont pour séquence ALELFR (P1), LVTDLTK (P2), LC[CAM]TVATLR (P3), LVNEVTEFAK (P4), GTDVQAWIR (P5), HGLDNYR (P6). La séparation a été réalisée en utilisant une phase mobile contenant 10 mM de formiate d'ammonium avec 0,1% d'acide formique de façon à obtenir un pH aqueux de 3 en utilisant le gradient décrit au paragraphe II.3) page 197 :

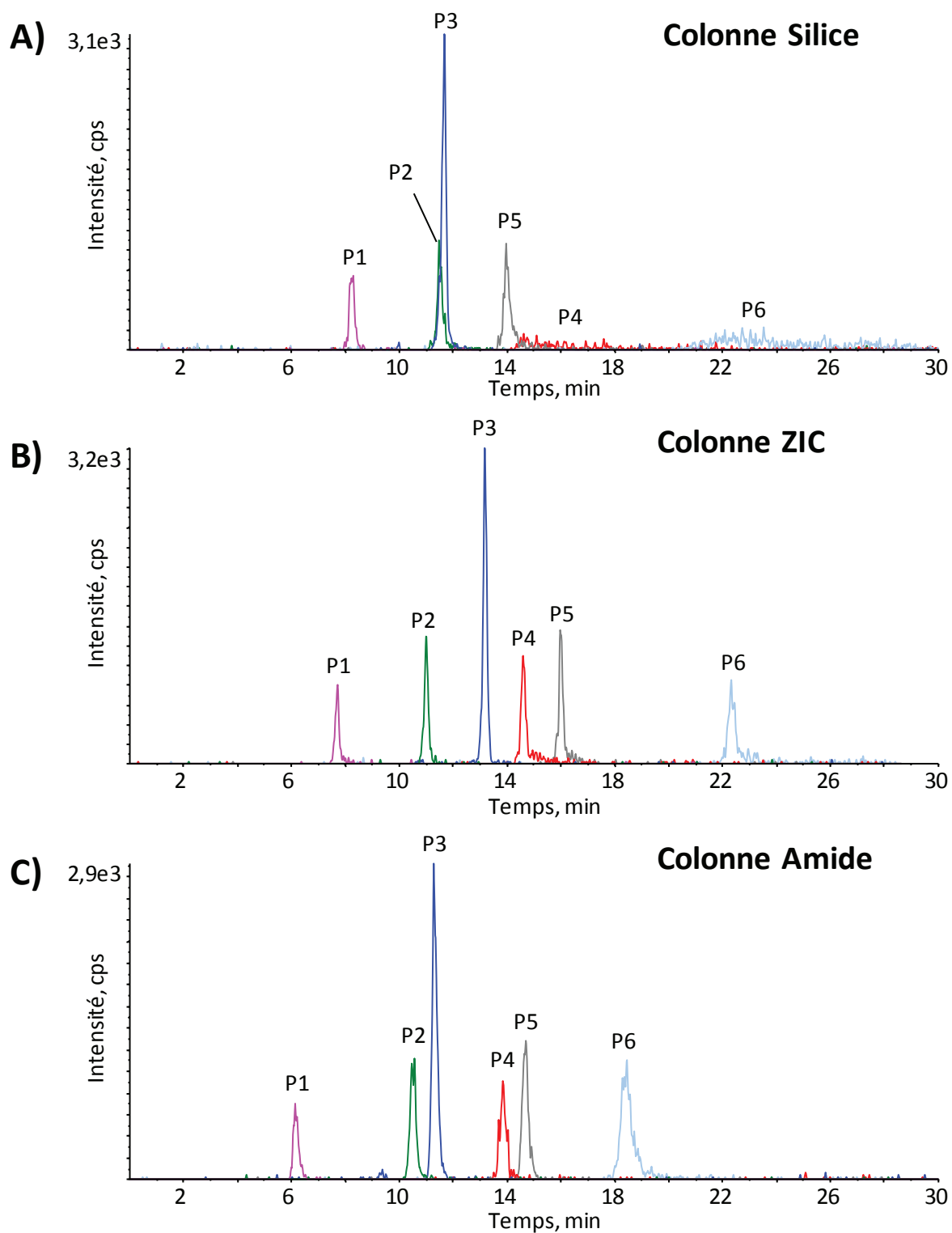


Figure 85 : Chromatogrammes reconstitués de 6 peptides après séparation en présence de 10 mM de formiate d'ammonium et 0,1% d'acide formique dans la phase mobile sur une colonne de silice pure (A), zwitterionique (B) ou greffée par un groupement amide (C).

La transition SRM la plus intense de ces six peptides a été suivie afin de définir les meilleures conditions de phases mobile et stationnaire. Pour chaque condition expérimentale, la capacité de pics a été calculée selon la formule utilisée précédemment (cf. page 203). Les largeurs à mi-hauteur de chaque pic ainsi que la capacité de pics correspondant à la séparation obtenue et les résolutions entre les pics sont présentées dans le Tableau 27 :

Tableau 27 : Comparaison des trois phases stationnaires en utilisant 10 mM de formiate d'ammonium dans la phase mobile.

Peptide n°	Colonne silice			Colonne ZIC			Colonne amide		
	Capacité de pics	Largeur à 50% ^(a)	Rs ^(b)	Capacité de pics	Largeur à 50% ^(a)	Rs ^(b)	Capacité de pics	Largeur à 50% ^(a)	Rs ^(b)
1	13,6	0,24	7,9	36,9	0,24	9,1	23,5	0,29	9,5
2		0,23	0,4		0,19	6,9		0,24	1,9
3		0,2	2,8		0,18	4,2		0,27	5,4
4		N/D	N/D		0,22	3,5		0,26	1,8
5		0,32	N/D		0,25	13,0		0,29	5,8
6		N/D			0,32			0,46	

^(a) Largeur à mi-hauteur en minutes

^(b) Résolution entre le pic n et le pic n+1

Pour les six peptides, la largeur à mi-hauteur du pic chromatographique est la plus faible pour la colonne zwitterionique. Ceci peut s'expliquer par la taille des particules de cette colonne qui est plus faible. En effet, une diminution de la taille des particules s'accompagne d'une diminution de l'anisotropie d'écoulement et il en résulte donc des pics chromatographiques plus fins. Cependant, la taille des particules à elle seule ne suffit pas à définir la largeur d'un pic chromatographique. D'autres facteurs comme les interactions entre l'analyte et la phase stationnaire sont prépondérants. Ces interactions incluent des interactions électrostatiques entre les charges positives des peptides et les silanols déprotonés à la surface de la phase stationnaire. C'est pourquoi les largeurs à mi-hauteur des pics chromatographiques des peptides 4 à 6 sont largement supérieures avec la colonne de silice pure (ayant des particules de 2,6 µm) à celles obtenues avec la colonne amide (de taille de particules de 3,5 µm). Les peptides 4 et 6 sont tellement élargis qu'ils ne sont quasiment plus détectés avec la colonne de silice. Ces deux pics n'ont d'ailleurs pas été pris en compte pour le calcul de la capacité de pics de la séparation obtenue avec la colonne de silice. La meilleure capacité de pics a été obtenue avec la colonne zwitterionique grâce aux pics plus fins obtenus avec cette colonne.

D'un point de vue chromatographique, la colonne zwitterionique donne les meilleurs résultats en utilisant du formiate d'ammonium dans la phase mobile puisque la capacité de pics est la plus élevée avec cette colonne.

Afin de voir si un autre tampon dans la phase mobile pouvait donner de meilleurs résultats, de l'acétate d'ammonium a été testé. Ce tampon a été choisi puisqu'il est également régulièrement utilisé en HILIC. Comme précédemment, une concentration de 10 mM dans la phase mobile a été utilisée :

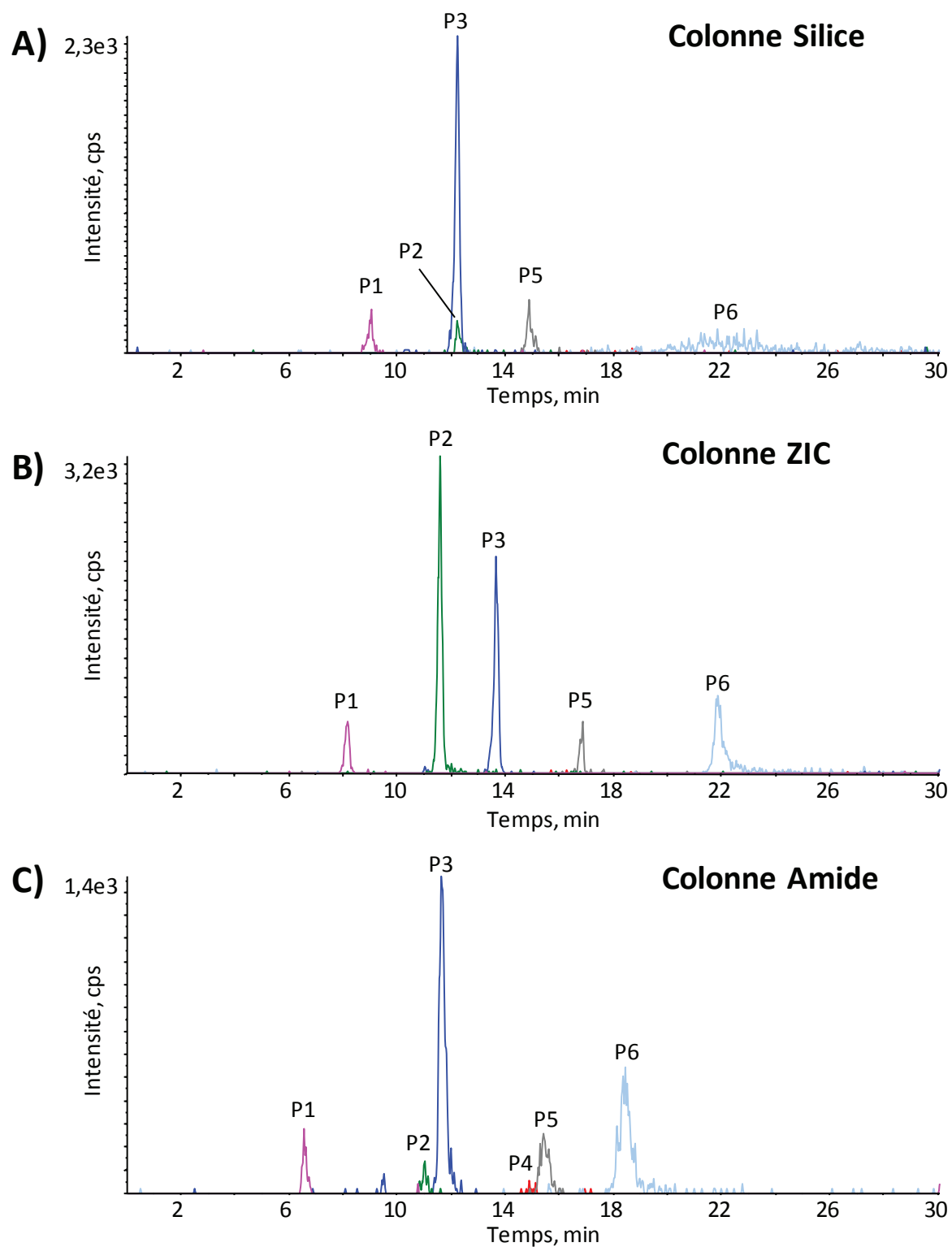


Figure 86 : Chromatogrammes reconstitués de six peptides après séparation en présence de 10 mM d'acétate d'ammonium et 0,1% d'acide formique dans la phase mobile sur une colonne de silice pure (A), zwitterionique (B) ou greffée par un groupement amide (C).

Les largeurs à mi-hauteur et les capacités de pics obtenues dans ces nouvelles conditions ont également été calculées :

Tableau 28 : Comparaison des trois phases stationnaires en utilisant 10 mM d'acétate d'ammonium dans la phase mobile.

Peptide n°	Colonne silice			Colonne ZIC			Colonne amide		
	Capacité de pics	Largeur à 50% ^(a)	Rs ^(b)	Capacité de pics	Largeur à 50% ^(a)	Rs ^(b)	Capacité de pics	Largeur à 50% ^(a)	Rs ^(b)
1	15,0	0,28	8,7	35,9	0,22	9,8	23,9	0,25	12,3
2		0,21	0,2		0,19	6,4		0,19	1,7
3		0,2	N/D		0,19	N/D		0,27	7,9
4		N/D	N/D		N/D	N/D		0,35	0,7
5		0,26	N/D		0,25	10,7		0,36	4,4
6		N/D			0,35			0,46	

^(a) Largeur à mi-hauteur en minutes

^(b) Résolution entre le pic n et le pic n+1

Comme il a déjà été décrit par l'équipe de Claire Elfakir lors de la séparation de neurotransmetteurs sur des phases stationnaires de type amide ou ZIC, le remplacement du formiate d'ammonium par de l'acétate d'ammonium ne change globalement pas la séparation³⁰¹. Une exception est toutefois à noter ici : il s'agit du peptide 4. Ce peptide est très faiblement détecté avec la colonne amide et absent avec la colonne zwitterionique alors qu'il était détecté sans problème avec du formiate d'ammonium dans la phase mobile. L'utilisation d'acétate à la place du formiate d'ammonium engendre une augmentation du pH de la phase mobile. Le peptide 4, de séquence LVNEVTEFAK est le plus acide des six peptides étudiés (son point isoélectrique vaut 4,3 alors que celui des autres est supérieur à 7). En présence de 10 mM d'acétate d'ammonium, ce peptide est probablement chargé négativement puisque le pH aqueux de la phase mobile est compris entre 5 et 6. Il se peut donc que ce peptide ne possède plus deux charges positives lors de l'ionisation ce qui expliquerait la forte baisse de signal observée.

Bien qu'il soit recommandé d'ajouter un tampon dans la phase mobile en HILIC, l'utilisation de tampons en spectrométrie de masse (même des tampons volatils) doit être évitée car les sels suppriment la réponse en masse. Pour les colonnes de silice et amide, la même séparation que précédemment a été réalisée mais avec seulement 0,1 % d'acide formique dans la phase mobile et sans sels. En revanche, pour la colonne zwitterionique, le gradient a été modifié afin d'obtenir une séparation. Dans ce cas, un palier de 10 minutes est réalisé avec 87% d'ACN puis un gradient de 87 à 80% en 15,5 minutes est accompli. Les résultats obtenus sont présentés sur la Figure 87 :

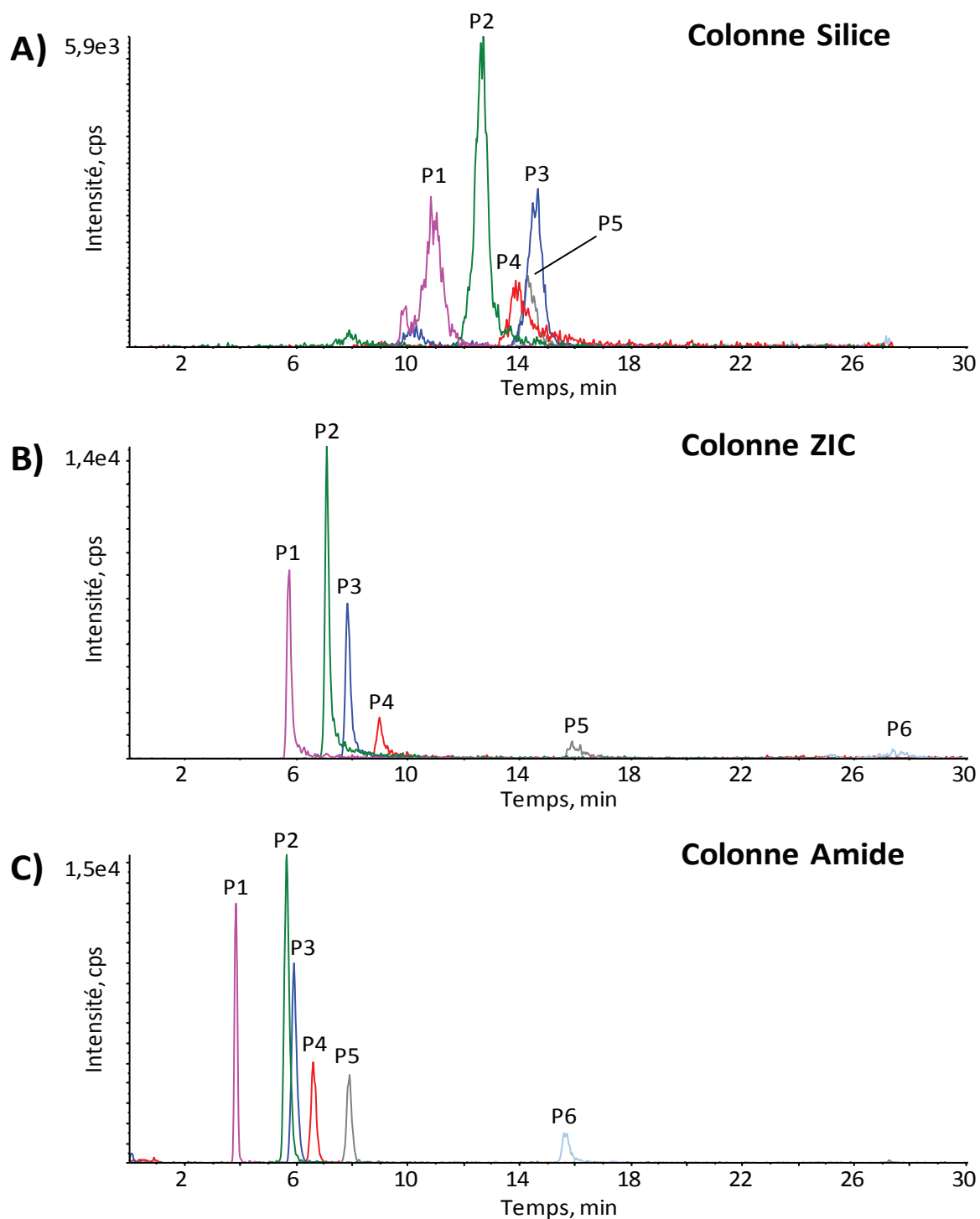


Figure 87 : Chromatogrammes reconstitués de six peptides après séparation en présence de 0,1 % d'acide formique dans la phase mobile sur une colonne de silice pure (A), zwitterionique (B) ou greffée par un groupement amide (C).

Les largeurs à mi-hauteur et les capacités de pics de ces séparations sont présentées dans le Tableau 29 :

Tableau 29 : Comparaison des trois phases stationnaires en utilisant 0,1% d'acide formique dans la phase mobile.

Peptide n°	Colonne silice			Colonne ZIC			Colonne amide		
	Capacité de pics	Largeur à 50% ^(a)	Rs ^(b)	Capacité de pics	Largeur à 50% ^(a)	Rs ^(b)	Capacité de pics	Largeur à 50% ^(a)	Rs ^(b)
1	3,1	0,74	1,6	24,6	0,30	2,9	28,2	0,20	5,0
2		0,45	2,2		0,29	1,6		0,23	0,7
3		0,57	0,5		0,39	1,7		0,23	1,8
4		0,86	0,3		0,45	7,1		0,23	3,0
5		0,66	N/D		0,46	8,9		0,27	15,5
6		N/D			1,16			0,32	

^(a) Largeur à mi-hauteur en minutes

^(b) Résolution entre le pic n et le pic n+1

En l'absence de tampon, la rétention des peptides est globalement diminuée. Du fait de leur plus faible solubilité en milieu organique, les sels vont se trouver préférentiellement dans la couche enrichie en eau à la surface de la phase stationnaire. Ainsi, le volume de cette couche d'eau devrait augmenter. Par conséquent, la rétention des peptides doit également être accrue³⁰⁴. De plus, sans tampon, les pics sont très fortement élargis sur la colonne de silice et sur la zwitterionique mais pas sur la colonne amide avec laquelle les pics les plus fins sont obtenus. De ce fait, la capacité de pics devient la meilleure avec cette colonne. Des tampons sont généralement ajoutés dans la phase mobile en HILIC afin d'améliorer la forme des pics chromatographiques en diminuant les interactions secondaires entre les analytes chargés et les silanols déprotonés. Puisque l'addition de tampons n'améliore pas la séparation sur la colonne amide, ceci suggère que les interactions entre les peptides et les silanols résiduels sont négligeables. Ce phénomène est lié au fait que la colonne amide utilisée possède des ponts éthylène entre les silanols résiduels. Ce traitement de la silice est censé diminuer de 30% le nombre de silanols résiduels ce qui semble suffire pour obtenir une forme de pics semblable à celle obtenue sur les autres colonnes lorsqu'un tampon est ajouté dans la phase mobile mais en l'absence de tampons.

Si l'on ne considère que la capacité de pics comme critère de sélection du couple phase stationnaire / phase mobile, la colonne zwitterionique en présence de 10 mM de formiate d'ammonium à pH 3 dans la phase mobile donne les meilleurs résultats. Cependant, l'objectif de l'étude n'est pas de séparer un maximum de peptides (deux peptides coélus peuvent être distingués en mode SRM s'ils ne sont pas isobares) mais d'être le plus sensible possible. Les hauteurs des signaux mesurés ont donc été comparées pour les trois colonnes et dans les trois conditions de phase mobile. Dans chaque cas, les hauteurs ont été normalisées par la hauteur du peptide obtenue avec la colonne amide et en l'absence de tampons dans la phase mobile :

Tableau 30 : Intensités relatives des 6 peptides étudiés en fonction des phases mobiles et stationnaires.

Peptide n°	Colonne silice			Colonne ZIC			Colonne amide		
	Tampon 1 ^(a)	Tampon 2 ^(b)	0,1% FA	Tampon 1 ^(a)	Tampon 2 ^(b)	0,1% FA	Tampon 1 ^(a)	Tampon 2 ^(b)	0,1% FA
1	8	2	26	7	5	64	6	2	100
2	6	1	46	8	19	60	7	1	100
3	29	22	32	30	21	41	24	14	100
4	N/D	N/D	20	22	1	23	19	1	100
5	23	10	27	32	11	27	28	6	100
6	N/D	N/D	N/D	53	39	23	63	33	100

^(a) 10 mM de formiate d'ammonium dans la phase mobile

^(b) 10 mM d'acétate d'ammonium dans la phase mobile

En ce qui concerne le signal mesuré, le résultat est univoque : la colonne amide en l'absence de tampons donne le meilleur signal pour tous les peptides. Les conditions sans tampon donnent d'ailleurs des hauteurs plus importantes pour quasiment tous les peptides quelle que soit la phase stationnaire. Bien que l'acétate et le formiate d'ammonium soient des tampons volatils, leur utilisation doit donc tout de même être évitée tant qu'elle n'est pas indispensable d'un point de vue chromatographique. L'influence de la concentration d'acétate d'ammonium sur la réponse de peptides a déjà été étudiée en infusant les peptides en présence de 30 à 50 % d'ACN dans l'eau. Les résultats ont également montré une forte suppression de signal sur la réponse des peptides dès 0,1 mM de tampon³⁰⁵.

Avec les phases stationnaires de type amide, l'utilisation de tampons n'améliore pas la séparation de peptides. Bien que la colonne ZIC en présence de tampon donne la meilleure capacité de pics, cette capacité n'est abaissée que de 20 à 25% avec la colonne amide sans tampon (capacité de pics de 37 avec la colonne ZIC et de 29 avec la colonne amide). Cependant, le signal peut être diminué d'un facteur supérieur à quatre avec la colonne ZIC. Puisque l'objectif de l'étude est d'évaluer l'intérêt de la HILIC pour la quantification absolue de peptides, les conditions donnant le meilleur signal seront conservées. Bien que l'augmentation de la capacité de pics permette de diminuer l'effet matrice, nous avons vu dans le Tableau 21 page 202 que le fait de doubler la capacité de pics permettait d'obtenir un gain de signal de seulement 73%. Ce gain devrait donc être plus faible avec la colonne ZIC puisque la capacité de pics n'est améliorée que de 25% et ne permettra donc pas de compenser le facteur quatre perdu pour les peptides n° 4, 5 et 6. Le gain de signal pouvant être apporté par l'HILIC a alors été déterminé sur un mélange plus important de peptides avec la colonne amide sans tampon dans la phase mobile.

III.5.3) Comparaison entre l'HILIC et la C₁₈ pour un mélange complexe de peptides sans matrice

L'étude a donc été poursuivie en SRM sur un mélange un peu plus complexe. En effet, jusqu'à présent, seuls quelques peptides avaient été suivis. Afin d'avoir une étude plus approfondie du gain de signal pouvant être obtenu en HILIC, un mélange de 81 peptides synthétiques a été réalisé. Ces 81 peptides sont des peptides rapporteurs d'une cinquantaine de protéines après digestion par de la trypsine. Ces protéines sont des biomarqueurs potentiels du cancer colo-rectal. Il s'agit donc de peptides d'un fort intérêt pour la quantification. L'étude a été réalisée sans matrice afin de s'affranchir d'un effet matrice qui sera variable entre la phase inverse et l'HILIC. Le signal obtenu pour ces 81 peptides en condition de phase inverse classique a donc été comparé avec celui obtenu en HILIC sur la colonne amide et sans tampon dans la phase mobile :

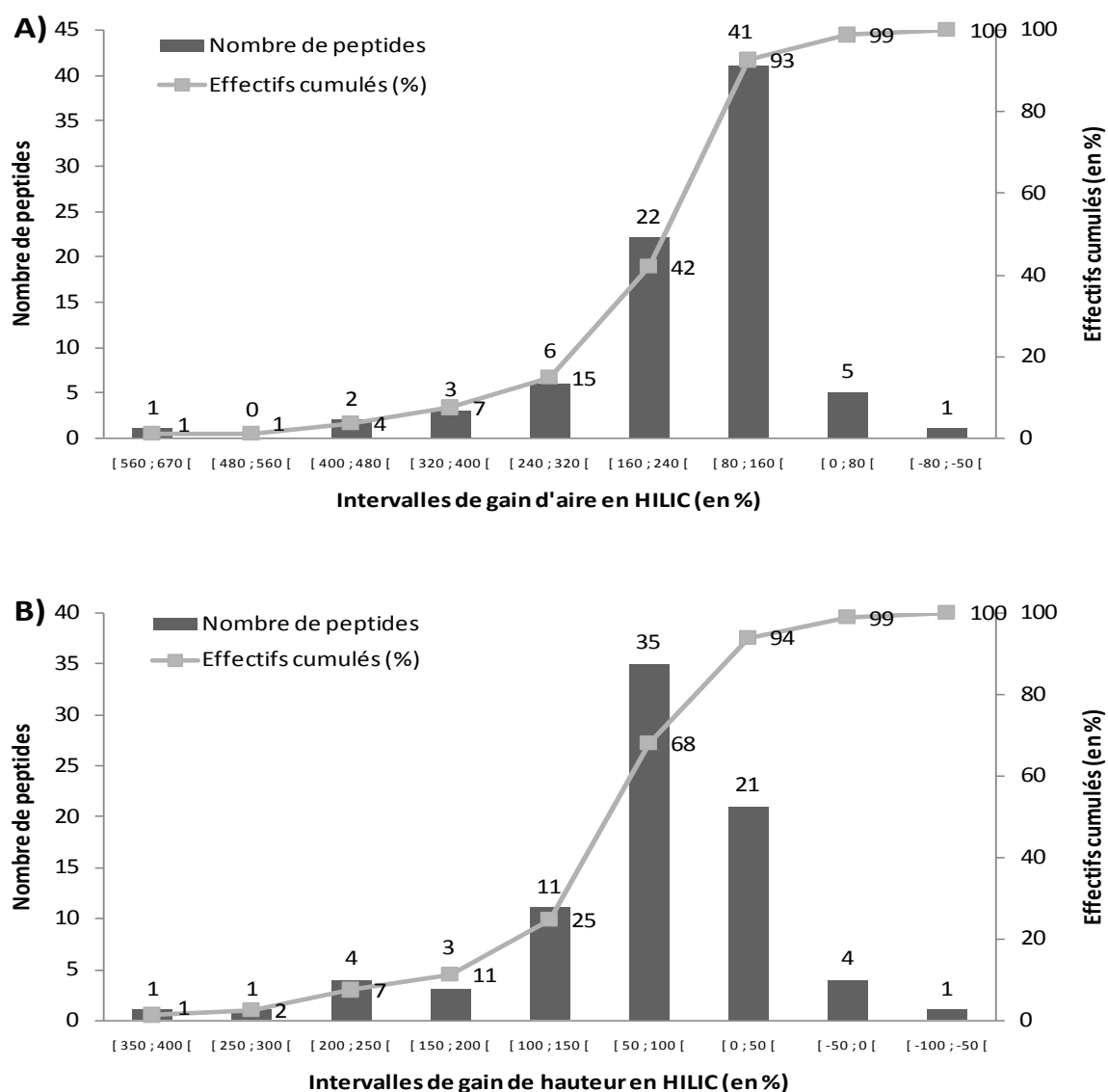


Figure 88 : Diagrammes de Pareto sur les gains d'aire (A) et de hauteur (B) entre l'HILIC et la phase inverse.

Dans ce diagramme, les histogrammes représentent le nombre de peptides par intervalle de gain d'aire. Par exemple, 22 peptides présentent un gain d'aire compris entre 160 et 240% en passant de la phase inverse à l'HILIC. La courbe quant à elle représente les effectifs cumulés. Elle permet de voir que près d'un peptide sur deux (42%) voit son aire augmenter de plus de 160% en HILIC, soit un signal multiplié par un facteur 2,6. Un gain d'aire en HILIC était attendu mais ce gain est relativement faible par rapport aux gains observés lors de l'analyse de petites molécules. En effet, il est compris entre 80 et 240% pour la plupart des peptides alors que des gains d'un facteur neuf peuvent être atteints sur des petites molécules²⁹⁶.

La partie B de la Figure 88 montre que les gains obtenus sur les hauteurs sont plus faibles que ceux obtenus sur les aires. En effet, ils sont compris majoritairement entre 0 et 150 %. Ce phénomène est lié à un élargissement des pics en HILIC. Les chaînes latérales des acides aminés les plus basiques comme les lysines et arginines (qui sont présentes sur chaque peptide puisque l'étude se fait sur des peptides tryptiques) sont chargées positivement. La présence de ces charges va augmenter le caractère hydrophile du peptide et donc son affinité pour la couche d'eau située à la surface de la phase stationnaire³⁰⁶. De plus, bien que les greffons de la colonne amide soient neutres, des charges négatives liées aux silanols résiduels peuvent subsister. Des interactions secondaires entre les charges positives des chaînes latérales des peptides et les silanols résiduels ne peuvent donc pas être exclues. Ces interactions secondaires sont également responsables de l'élargissement de pics observé en HILIC comme cela a déjà été mentionné³⁰⁷.

Ces gains d'un facteur deux en moyenne sont donc non négligeables mais sont plutôt faibles par rapport à ceux qui peuvent être rencontrés pour les petites molécules en HILIC. Contrairement aux petites molécules, les peptides sont ionisés sous différents états de charge et présentent donc une distribution d'états de charge. En effet, les acides aminés possèdent des fonctions amines et acides sur leur chaîne latérale. Ces fonctions qui sont des acides et des bases faibles sont donc en équilibre entre les formes protonées et déprotonées. Par conséquent, un peptide existe sous différents états de charge. Les peptides tryptiques étudiés ne contiennent qu'une seule lysine ou arginine et ont une masse d'environ 1000 Da. Ils sont donc généralement mono et doublement chargés. Ces deux états de charge ont été suivis en C₁₈ et en HILIC. L'étude s'est faite sur un mélange simple ne contenant que de la HSA digérée par de la trypsine. Puisque nous avons vu dans le paragraphe V.2) page 81 du premier chapitre que la fragmentation des espèces mono chargées était beaucoup moins favorisée que celle des doublement chargées, l'étude ne s'est pas faite en mode SRM mais en SIM (Single Ion Monitoring). Ceci a permis de suivre aisément les réponses des deux états de charge sans tenir compte de l'efficacité de fragmentation qui est donc variable entre les différents états de charge des peptides. Dans ce mode, un ion parent est filtré en masse (dans le Q1 ou le Q3) et atteint le détecteur sans être fragmenté. La Figure 89 montre les signaux obtenus pour le peptide 3 étudié dans le paragraphe III.5.2) :

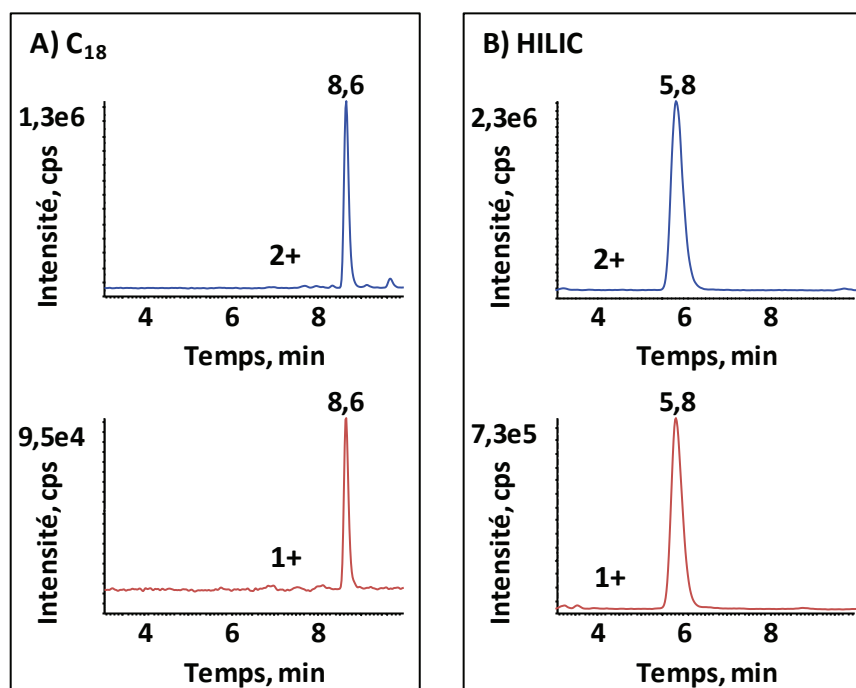


Figure 89 : Chromatogrammes reconstruits du peptide n°3 mono (rouge) et doublement (bleu) chargé en phase inverse (A) et en HILIC (B).

En phase inverse (partie A), ce peptide est élué à 8,6 min. La forme dichargée (en bleu) est majoritaire par rapport à la monochargée (en rouge). En HILIC (partie B), la forme dichargée est plus intense qu'en phase inverse et reste majoritaire par rapport à l'espèce monochargée. Cependant, l'aire de l'ion monochargé a beaucoup plus augmenté que celle du doublement chargé. Les aires des deux formes en phase inverse et en HILIC sont reportées dans le tableau suivant :

Tableau 31 : Evolution des aires des ions mono et doublement chargés du peptide n°3 en phase inverse et en HILIC.

	Aire		
	monochargé	dichargé	dichargé / monochargé
C ₁₈	6,55E+05	1,02E+07	15,6
HILIC	1,31E+07	4,38E+07	3,34

Ce tableau confirme que le signal de l'ion mono chargé augmente plus que celui du doublement chargé en HILIC puisque le rapport entre les aires des dichargés sur les monochargés passe de 15,6 à 3,34. On a donc un déplacement de l'état de charge vers des valeurs plus faibles. En HILIC, l'élution est réalisée avec une phase mobile riche en ACN (plus de 70%) alors qu'en phase inverse, les peptides sont élués avec moins de 30% d'ACN. Une diminution de l'état de charge moyen de peptides ou de protéines en présence d'une forte teneur en ACN (90%) a déjà été reportée sur un peptide modèle de 3466 Da (la bêta endorphine)³⁰⁸. Cette baisse a été attribuée à une diminution de la tension de surface et de la constante diélectrique du solvant et à une affinité protonique plus forte

de l'ACN par rapport à celle de l'eau. Ces trois paramètres sont très importants dans le processus d'ionisation par électrospray. En effet, la tension de surface est la force permettant de maintenir la cohésion de la goutte et de lutter contre les répulsions coulombiennes au sein de la goutte. Plus le solvant est évaporé, et plus les charges sont concentrées dans la goutte et donc plus les forces de répulsion coulombienne augmentent. Lorsque ces forces deviennent supérieures aux forces de tension de surface de la goutte (*i.e.* à la limite de Rayleigh), la goutte éclate. Ce processus est répété jusqu'à l'évaporation d'un ion ou jusqu'à ce qu'il ne reste plus qu'un ion dans la goutte. En d'autres termes, plus la tension de surface est élevée, plus le nombre de charges devant être accumulées au sein de la goutte avant son explosion est important. Plus ce nombre de charges disponibles est grand, plus l'état de charge observé de l'analyte sera important. La tension de surface de l'eau est de 0,073 N / m contre 0,030 N / m pour l'ACN ce qui est en accord avec la théorie ci-dessus.

L'influence de la constante diélectrique se situe avant la formation des gouttes. Lors du processus d'électrospray, la première étape consiste en une séparation électrophorétique au niveau de la sonde électrospray lorsque la tension de spray est appliquée. Puisque les forces électrostatiques sont liées à la constante diélectrique en solution, un solvant avec une constante diélectrique plus faible va diminuer l'efficacité de la séparation de charges. Ceci est également vrai si la viscosité du milieu augmente. Puisque la séparation de charges est moins efficace, l'excès de charge présent dans la goutte est plus faible et donc le nombre de charges disponibles pour l'analyte est plus faible. L'état de charge observé sera alors diminué. Par conséquent, en présence d'ACN à la place d'eau, le nombre de charges transférées sur la protéine ou le peptide sera plus faible.

Le groupe d'E.R. Williams a également étudié l'influence de la composition du solvant sur la distribution des états de charge de protéines³⁰⁹. Ainsi, pour des solvants moins volatils que l'eau, ils ont conclu que l'augmentation de la charge était liée à une dénaturation de la protéine. En revanche, pour des solvants plus volatils tels que l'ACN, la basicité en phase gazeuse plus importante de l'ACN serait responsable de la baisse d'état de charge observée. Effectivement, l'affinité protonique de l'ACN est supérieure à celle de l'eau (779,2 kJ/mol pour l'ACN contre 691 kJ/mol pour l'eau²⁸⁶). Lorsque les ions sont émis en phase gazeuse, l'ACN va capter plus de protons que l'eau. Le nombre de protons disponibles pour la protéine est alors plus faible. Par conséquent, l'état de charge observé est plus faible.

Tous ces phénomènes ont bien été étudiés sur les protéines et il semble donc qu'ils se produisent également sur les peptides. L'étude s'est donc poursuivie en cherchant un moyen pour redéplacer l'état de charge du peptide vers l'espèce doublement chargée.

III.5.4) Déplacement de l'état de charge

L'objectif ici est de trouver une façon de redéplacer l'état de charge des peptides vers des valeurs plus élevées afin de pouvoir augmenter le signal de l'espèce doublement chargée. En effet, même si un signal plus important est obtenu en HILIC par rapport à la phase inverse, une partie du signal est dissipée à cause de ce problème de déplacement de l'état de charge puisque une partie de l'espèce dichargée est devenue monochargée. De plus, les espèces monochargées sont moins intéressantes

en SRM puisque la charge est séquestrée sur l'acide aminé C-terminal des peptides tryptiques. En effet, cet acide aminé est une lysine ou une arginine et est donc très basique. Il est alors plus difficile de délocaliser le proton séquestré en C-terminal pour induire la fragmentation du peptide.

Le groupe d'E.R. Williams a beaucoup travaillé sur la recherche de composés permettant d'augmenter l'état de charge des protéines notamment pour l'étude de complexes non covalents³¹⁰⁻³¹¹. Un autre intérêt dans l'augmentation de l'état de charge des protéines est trouvé lors de la fragmentation des protéines par ECD (capture d'électron dissociative). Dans ce cas, l'ion précurseur va capter un électron thermique (énergie inférieure à 0,2 eV) afin de former un cation radicalaire puis se fragmenter³¹². Puisque la section efficace de capture de l'électron augmente avec la charge du précurseur, le spectre de fragmentation résultant sera plus riche en informations³¹³.

Ainsi, en 2001, ils ont évalué l'effet du glycérol et de l'alcool méta-nitrobenzylique (m-NBA) sur la distribution des états de charge de la myoglobine et du cytochrome c mais également sur celle d'un petit peptide (de séquence KKKK)³¹⁴. Bien que l'état de charge maximal du cytochrome c passe de +20 à +23 en présence de 0 et 50% de glycérol respectivement, des résultats similaires sont obtenus avec des quantités plus faibles de m-NBA : l'état de charge maximal observé est de +24 avec 0,7% de m-NBA. L'augmentation de l'état de charge ne semble pas due à une dénaturation des protéines mais serait alors plutôt liée à la tension de surface au niveau des gouttes électrospray. En effet, ils ont réalisé leur étude dans des solutions contenant 3% d'acide acétique. Or, il a déjà été montré que la tension de surface passait de 0,071 N / m dans l'eau pure à 0,034 N / m dans 70% d'acide acétique à 30°C³¹⁴. L'acide acétique qui est moins volatil que l'eau va alors être concentré au sein de la goutte lors de l'évaporation de l'eau et la tension de surface de cette goutte va diminuer. Dans l'étude de Williams³¹⁴, les molécules testées sont également moins volatiles que l'eau ($T_{\text{éb}}(\text{m-NBA à } 3 \text{ Torr}) = 177,5^\circ\text{C}$ et $T_{\text{éb}}(\text{glycérol à } 20 \text{ Torr}) = 182^\circ\text{C}$). Lors de l'évaporation du solvant, ces deux composés vont donc être concentrés dans la goutte³¹⁵. Ainsi, la présence de m-NBA (dont la tension de surface vaut 0,05 N / m)³⁴ va augmenter la tension de surface de la goutte contenant un mélange eau / ACN / acide acétique lorsque la majorité de l'eau sera évaporée. Comme nous l'avons vu au paragraphe précédent, l'augmentation de la tension de surface s'accompagne d'une augmentation de la densité de charges. Par conséquent, l'état de charge des analytes augmente.

D'autres groupes ont également évalué l'influence de la concentration de m-NBA sur le déplacement de l'état de charge des protéines. Par exemple, la charge maximale de l'anhydrase carbonique II passe de +11 à +16 avec 0,5% de m-NBA et à +19 avec 1% de m-NBA³¹⁶. De même, la charge maximale de la myoglobine passe de +9 à +19 par ajout de 0,4% de m-NBA³¹¹. L'influence du m-NBA sur des peptides tryptiques et des phosphopeptides a aussi été étudiée par Kjeldsen *et al.* en 2007. Ils ont montré que la charge moyenne passait de +2,2 à +2,9 en présence de 0,1% de m-NBA³¹⁷.

Le m-NBA apparaît donc intéressant pour déplacer l'état de charge de nos peptides. La concentration de 1% de m-NBA semble donner les meilleurs résultats mais compte-tenu du prix du réactif (quasiment cent euros pour cinq grammes), la concentration de 0,5% a été retenue. Le peptide n°3 a donc été analysé dans les mêmes conditions que précédemment (colonne amide avec 0,1% d'acide formique dans la phase mobile) sauf que 0,5% de m-NBA ont été ajoutés dans la phase mobile :

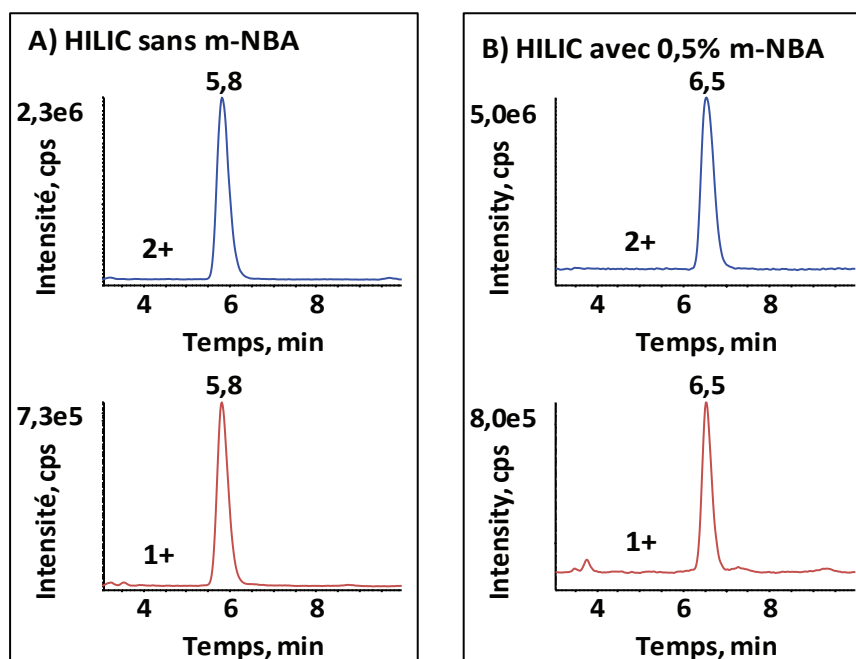


Figure 90 : Chromatogrammes reconstruits du peptide n°3 mono (rouge) et doublement (bleu) en HILIC avec 0 (A) ou 0,5% (B) de m-NBA dans la phase mobile.

Les aires des espèces mono et doublement chargées sont reportées dans le tableau suivant :

Tableau 32 : Evolution des aires des ions mono et doublement chargés du peptide n°3 en HILIC avec 0 ou 0,5% de m-NBA.

	Aire		
	monochargé	Dichargé	dichargé / monochargé
HILIC	1,31E+07	4,38E+07	3,34
HILIC avec m-NBA	1,18E+07	9,64E+07	8,17

Le rapport des aires de l'espèce dichargée sur l'espèce monochargée a augmenté après ajout de 0,5% de m-NBA dans la phase mobile. Ce résultat est en accord avec les travaux précédemment évoqués. En effet, la tension de surface de l'ACN qui est le solvant majoritaire en HILIC est de 0,030 N / m. Cette valeur est inférieure à celle du m-NBA (0,05 N / m)³⁰. Puisque la tension de surface est augmentée en présence de m-NBA, le nombre de charges disponibles pour l'analyte est lui aussi augmenté et donc un déplacement de l'état de charge des peptides vers des valeurs plus élevées est observé. Il faut cependant noter que la phase mobile n'est pas de l'acétonitrile pur mais un mélange eau / acétonitrile. Lors de l'élution, la fraction d'ACN est d'environ 80%. Bien que l'acétonitrile soit plus volatil que l'eau (Téb = 81,6°C)²⁸⁷, cette différence de volatilité ne semble pas compenser le fait que l'ACN soit le solvant majoritaire au départ. En effet, puisque l'état de charge du peptide augmente, la présence de m-NBA augmente la tension de surface de la goutte. Lors de l'évaporation du solvant, il reste donc suffisamment d'ACN par rapport à l'eau pour que le m-NBA permette d'augmenter la tension de surface de la goutte et donc l'état de charge du peptide.

On peut également remarquer que le temps de rétention de ce peptide a augmenté en présence de m-NBA. Puisque le m-NBA est hydrophobe, sa présence dans la phase mobile augmente donc l'hydrophobicité de cette dernière. Or, en HILIC, l'élution est réalisée en augmentant l'hydrophilie de la phase mobile, il est donc logique qu'un peptide soit élué plus tard lorsque la phase mobile est moins hydrophile. Le phénomène inverse a été observé sur une colonne de type C₁₈ : dans ce cas, la présence de m-NBA dans la phase mobile a engendré une diminution du temps de rétention des peptides³¹⁷.

L'étude s'est alors poursuivie en comparant le signal obtenu en phase inverse avec celui obtenu en HILIC en présence de 0,5% de m-NBA dans la phase mobile sur le mélange de 81 peptides étudiés précédemment.

III.5.5) Comparaison du signal obtenu pour un mélange complexe de peptides en phase inverse et en HILIC en présence de m-NBA

Puisque le gain en sensibilité obtenu en comparant l'HILIC et la phase inverse est plus faible que celui escompté par rapport aux petites molécules du fait de l'état de charge des peptides déplacé vers des valeurs plus faibles en HILIC, le signal des 81 peptides a alors été comparé entre l'HILIC et la phase inverse après avoir redéplacé l'état de charge en HILIC en ajoutant 0,5% de m-NBA dans la phase mobile. Les résultats sont présentés sur les diagrammes de Pareto suivants :

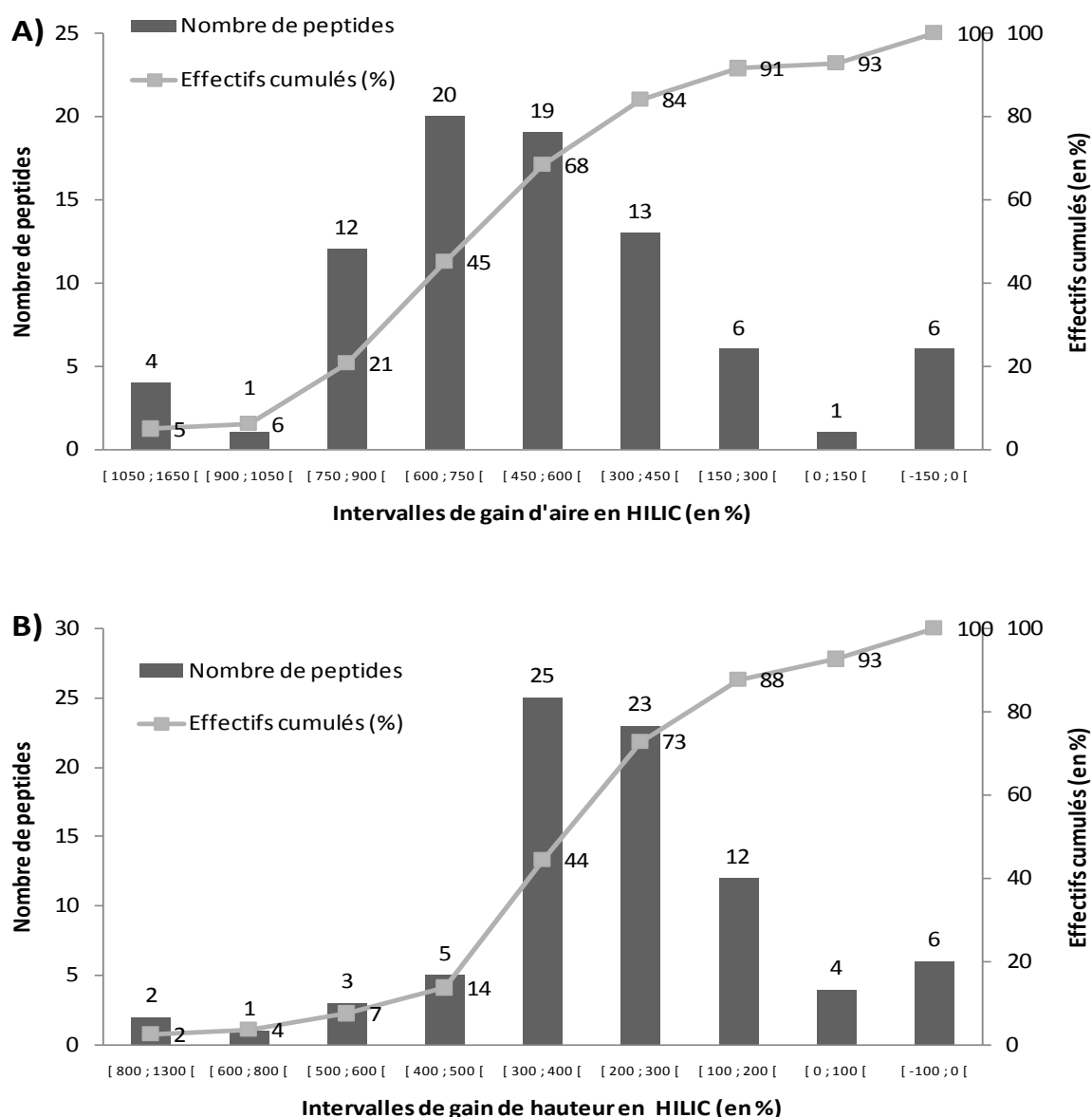


Figure 91 : Diagrammes de Pareto sur les gains d'aire (A) et de hauteur (B) entre l'HILIC (en présence de 0,5% de m-NBA) et la phase inverse.

Les gains d'aire observés par rapport à la phase inverse sont drastiquement augmentés en présence de m-NBA. En effet, le gain d'aire est compris entre 300 et 900% pour la majorité des peptides alors qu'il n'était qu'entre 80 et 240% sans m-NBA. Ce gain amélioré est donc lié au déplacement de l'état de charge engendré par le m-NBA. En effet, puisque la quantité de peptide doublement chargé est augmentée par rapport à celle du monochargé, le gain obtenu sur l'espèce doublement chargée est accru par l'ajout de m-NBA.

Les gains obtenus sur les hauteurs sont à nouveau plus faibles que ceux obtenus sur les aires. La présence de m-NBA ne permet pas d'affiner les pics en HILIC. En effet, l'élargissement moyen obtenu par l'ajout du m-NBA est de 5%.

La séparation obtenue en HILIC et en C_{18} pour quelques peptides parmi les 81 étudiés est présentée sur la figure suivante :

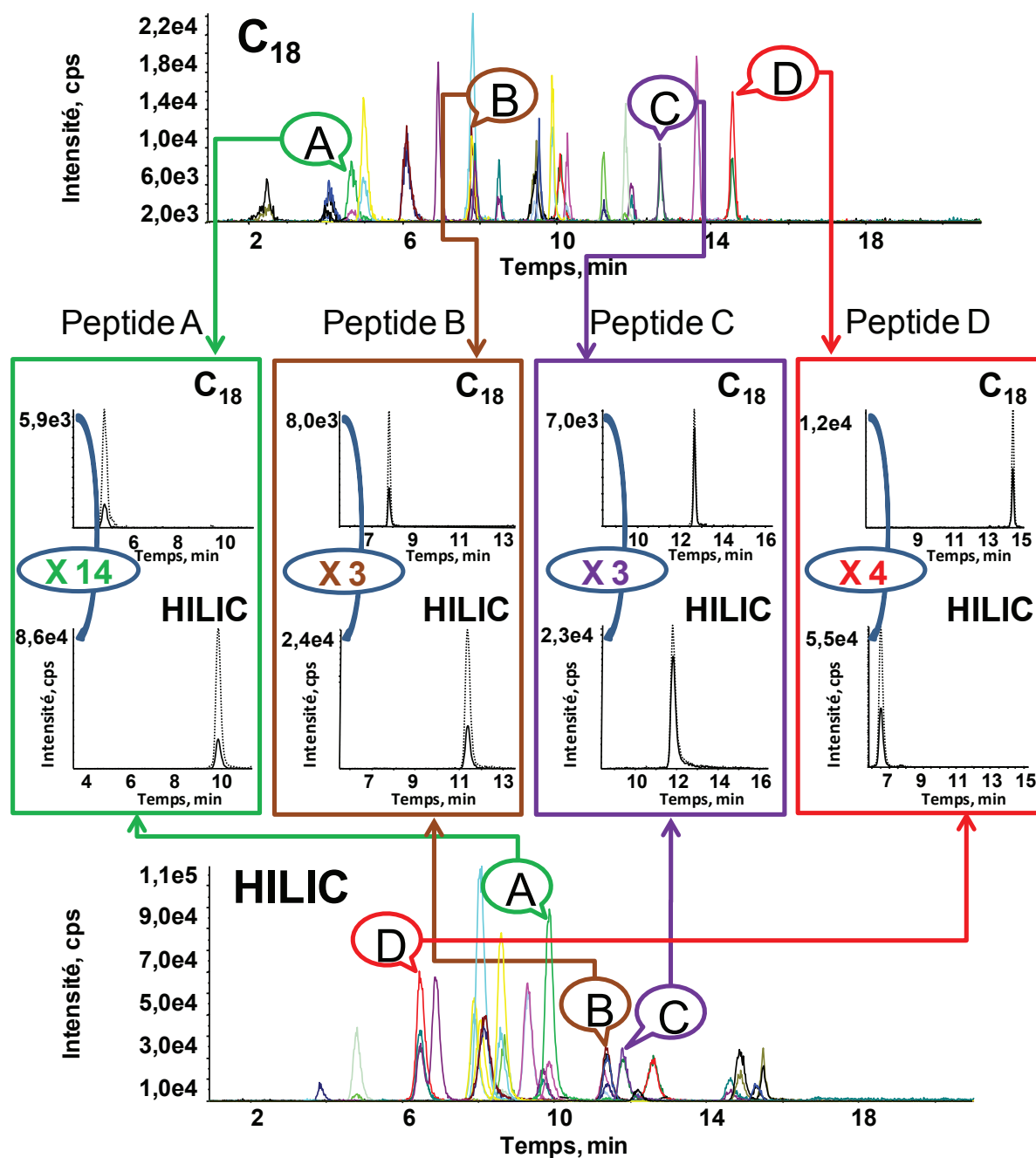


Figure 92 : Chromatogrammes reconstitués de quelques peptides étudiés après séparation en phase inverse (en haut) ou en HILIC avec 0,5% de m-NBA dans la phase mobile (en bas). Pour quatre peptides, deux transitions SRM sont représentées avec les gains d'intensité associés.

Ces chromatogrammes permettent de voir que la fenêtre d'élution (temps de rétention maximal et minimal) entre les deux séparations est du même ordre de grandeur mais que les pics sont élargis en HILIC. Pour deux transitions SRM de quatre peptides, les chromatogrammes obtenus en HILIC et en

phase inverse ont été reconstitués. Le peptide A représente un cas extrême avec une intensité multipliée par un facteur 14 alors que les autres représentent plutôt la tendance générale avec des gains allant d'un facteur 3 à un facteur 5.

Puisque les pics sont plus larges en HILIC, il faut revenir sur la capacité de pics de ces deux séparations. Le calcul réalisé dans le Tableau 29 page 227 a été réalisé à partir de la séparation de seulement 6 peptides ce qui est un mélange beaucoup plus simple que celui-ci. Avec les 81 peptides précédents, la capacité de pics vaut 28,8 en HILIC contre 63,4 en phase inverse Cette différence de capacité de pics n'est pas choquante puisque les colonnes de phase inverse sont connues pour avoir de plus grandes capacités de pics^{283, 318-319}.

Afin de vérifier si cette augmentation de signal n'était pas liée à une meilleure désolvatation des peptides en présence de m-NBA, 21 peptides parmi les 81 étudiés ont été analysés en phase inverse avec ou sans m-NBA dans la phase mobile. Le mélange peptidique initial devait contenir 105 peptides. Afin de tous les suivre (sachant que deux transitions SRM par peptides ont été enregistrées), ils ont été analysés en cinq méthodes contenant chacune 21 peptides. Sur les 105 peptides, seuls les 81 peptides pour lesquels les gains observés entre les deux transitions SRM étaient du même ordre de grandeur ont été conservés. Pour étudier l'influence du m-NBA en phase inverse, une seule des cinq méthodes d'acquisition a été utilisée afin de limiter la consommation de réactif. Les résultats obtenus sont présentés sur la Figure 93 :

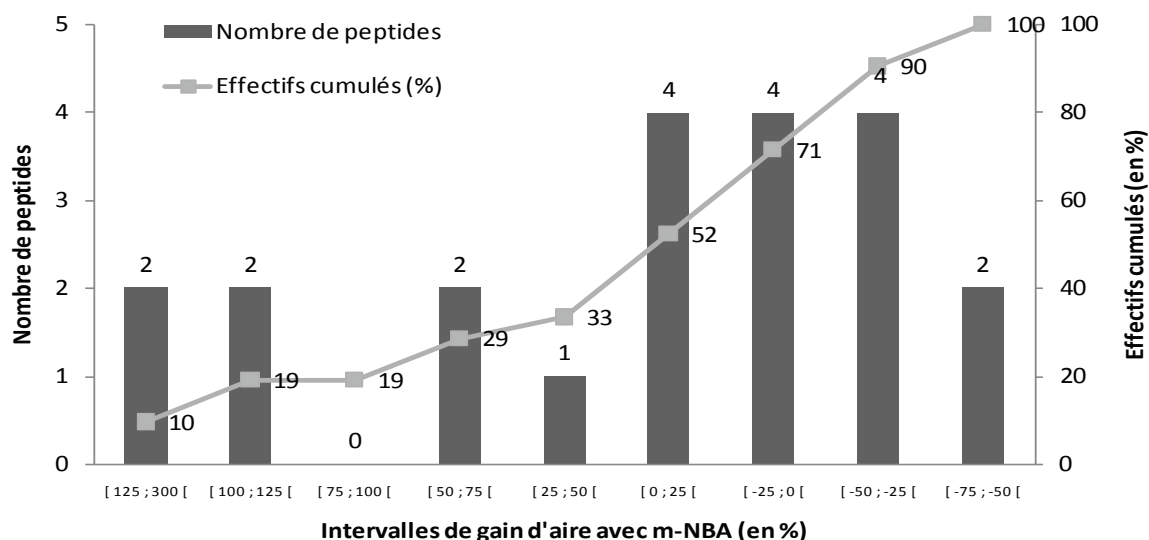


Figure 93 : Diagramme de Pareto sur les gains d'aire (en %) en phase inverse avec 0 ou 0,5% de m-NBA dans la phase mobile.

En présence de m-NBA dans la phase mobile lors d'une séparation en phase inverse, l'aire est augmentée pour seulement un peptide sur deux et cette augmentation reste faible. La présence à elle-seule de m-NBA dans la phase mobile ne permet donc pas d'augmenter le signal obtenu. En phase inverse, la présence de m-NBA doit plutôt tendre à diminuer la tension de surface des gouttes. Ainsi, une augmentation de l'état de charge n'est pas attendue. Elle n'a d'ailleurs pas été observée lors de l'analyse d'un dendrimère d'environ 1700 Da, le DAB-16 (polymère de poly-propylèneimine).

En effet, en présence 1% de m-NBA dans l'eau, l'état de charge moyen du DAB-16 diminue de 19% par rapport à la même solution analysée sans m-NBA³⁴.

L'augmentation de signal obtenue en HILIC semble donc pouvoir être généralisée à la majorité des peptides. En effet, la présence majoritaire d'ACN dans la phase mobile facilite l'évaporation du solvant au niveau de la source électrospray. Ainsi, plus d'ions sont désolvatés que lorsque la phase mobile est principalement aqueuse. Cependant, le fait d'avoir une majorité d'ACN dans la phase mobile diminue la tension de surface des gouttes dans la source. Cette baisse de tension de surface fragilise les gouttes puisque les forces de cohésion sont plus faibles ce qui favorise à nouveau l'émission d'ions. Cependant, cette baisse de tension de surface s'accompagne également d'une diminution du nombre de charges disponibles pour ioniser les peptides. De ce fait, la distribution des états de charge des peptides est déplacée vers des valeurs plus faibles. Le m-NBA, molécule faiblement volatile et de tension de surface plus élevée que celle de l'ACN permet d'augmenter la tension de surface de la goutte lorsque l'ACN est le solvant majoritaire et donc de redéplacer la distribution d'états de charge des peptides. Le gain obtenu en HILIC est alors beaucoup plus important.

Pour la suite de l'étude, nous nous sommes intéressés plus spécifiquement à certains peptides rapporteurs que nous avons étudiés dans les chapitres précédents.

III.5.6) Linéarités sans matrice

Afin d'estimer le gain de sensibilité réellement apporté par l'HILIC, des gammes de trois peptides ont été réalisées dans l'eau. Ces trois peptides ont pour séquence LGPLV*(¹³C₅, ¹⁵N₁)EQGR (peptide ayant servi d'étalon interne lors du dosage de l'apolipoprotéine E), EEFSPLR (peptide protéotypique de la vitellogénine chez *Eurytemora affinis*), ILIPGVGK (peptide protéotypique de la vitellogénine chez *Gammarus fossarum*). Le peptide de séquence LSEPAELTDAVK n'a pas été retenu pour l'étude puisque nous avons montré sur la Figure 81 page 209 qu'il semble peu soluble lorsque la teneur en ACN dépasse 80%. Afin de s'affranchir de problèmes d'adsorption potentiellement différente entre une solution préparée dans l'eau pour l'étude en phase inverse et une solution préparée dans de l'ACN pour l'étude en HILIC, une seule gamme a été préparée dans l'eau. Puisque les gammes ont été préparées dans l'eau acidifiée, seulement 1 µL de solution a été injecté afin de minimiser l'impact du solvant d'injection sur la rétention des peptides en HILIC. Chaque gamme a été injectée deux fois et les résultats sont présentés dans la Figure 94 :

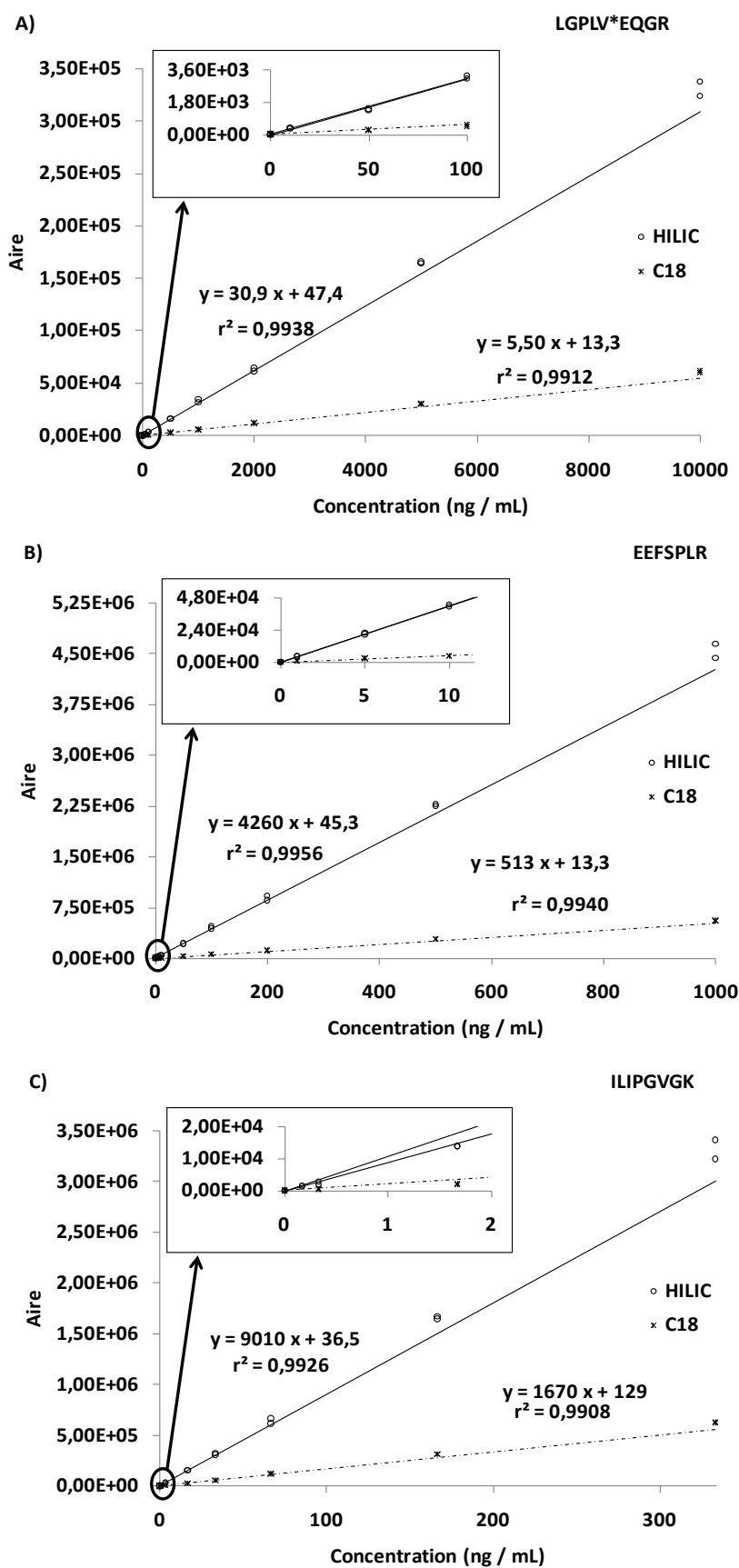


Figure 94 : Gammes des peptides LGPLV*EQGR (A), EEFSPLR (B) et ILIPGVGK (C) dans l'eau en phase inverse et en HILIC.

Pour l'étalon de l'Apo E, les concentrations affichées sont des équivalents en protéine (soit des concentrations en peptides environ 37 fois inférieures) alors que pour les deux autres peptides, ce sont les concentrations de peptide puisque la masse molaire des deux protéines est inconnue. Pour ces trois peptides, la pente de la droite d'étalonnage (qui est une définition de la sensibilité) est cinq à huit fois plus importante en HILIC. Cependant, en bioanalyse, la sensibilité est plutôt définie par la limite de quantification que le dosage permet d'atteindre. La limite de quantification se définit soit par un rapport signal sur bruit du pic chromatographique supérieur à 10 soit par une exactitude comprise entre 85 et 115% avec un coefficient de variation inférieur à 15%. Puisqu'une analyse en SRM dans l'eau ne génère quasiment aucun bruit de fond, la seconde définition sera retenue. Les exactitudes associées à chaque point des gammes précédentes sont donc reportées dans le tableau suivant :

Tableau 33 : Exactitudes (en %) associées aux gammes de la Figure 94.

LGPLV*EQGR			EEFSPLR			ILIPGVGK		
Concentration (ng / mL)	C18	HILIC	Concentration (ng / mL)	C18	HILIC	Concentration (ng / mL)	C18	HILIC
0	N/D ^(a)	N/D	0	N/D	N/D	0	N/D	N/D
0	N/D	N/D	0	N/D	N/D	0	N/D	N/D
1	N/D	N/D	0,1	N/D	86,7	0,0333	N/D	N/D
1	N/D	N/D	0,1	N/D	85,2	0,0333	N/D	N/D
5	N/D	N/D	0,5	130,0	101,6	0,167	59,6	73,9
5	N/D	N/D	0,5	129,2	101,2	0,167	78,2	102,5
10	N/D	85,5	1	102,4	88,3	0,333	41,1	81,7
10	N/D	106,2	1	89,8	90,2	0,333	93,8	95,1
50	84,0	100,9	5	104,9	99,2	1,67	61,6	84,1
50	93,3	84,1	5	104,5	97,1	1,67	69,9	92,5
100	77,1	81,6	10	84,0	91,9	3,33	91,5	88,9
100	95,5	105,0	10	89,0	96,8	3,33	94,5	92,4
500	108,4	91,5	50	94,6	96,1	16,7	95,9	90,9
500	86,9	102,7	50	98,5	99,5	16,7	100,4	103,0
1000	105,9	100,3	100	95,4	98,4	33,3	86,0	99,4
1000	95,1	101,2	100	107,6	102,4	33,3	99,4	102,1
2000	92,0	100,9	200	94,6	97,5	66,7	83,0	101,6
2000	104,7	99,2	200	102,4	99,8	66,7	99,9	102,4
5000	100,7	103,1	500	95,1	104,4	167	90,3	106,8
5000	112,5	107,2	500	108,8	106,7	167	111,9	109,5
10000	101,5	102,6	1000	96,8	103,6	333	94,8	104,9
10000	109,4	104,9	1000	106,8	104,0	333	111,7	107,2

^(a) N/D : Non Déterminée

Ce tableau permet de constater que la limite de quantification est obtenue pour un échantillon cinq à dix fois moins concentré en HILIC par rapport à la même analyse en phase inverse. En effet, les exactitudes déterminées restent comprises entre 85 et 115% pour des concentrations cinq à dix fois plus faibles en HILIC par rapport à la phase inverse. Ces résultats confirment que le gain de signal observé pour le mélange de peptide permet d'abaisser les limites de quantification en HILIC.

Pour terminer, il faut vérifier que les limites de quantification en HILIC soient également abaissées en matrice complexe comme le sérum ou l'urine.

III.5.7) Linéarités en matrice complexe

Les colonnes HILIC sont réputées pour leur faible capacité de charge par rapport aux colonnes de type C₁₈ car le mécanisme de rétention est partiellement basé sur de l'adsorption en surface de la phase stationnaire plutôt qu'un mécanisme de partition comme c'est le cas en phase inverse³⁰⁰. Or, si la capacité de charge est plus faible, il est probable que l'analyse soit moins sensible malgré le gain apporté par la désolvatation. En effet, la réponse en ESI est proportionnelle à la concentration de l'analyte au sommet du pic chromatographique qui dépend donc de la quantité d'analyte injectée sur la colonne pour une solution donnée. Nous venons de voir que le gain de signal apporté par l'HILIC pouvait aller jusqu'à un facteur dix par rapport à la phase inverse. Cependant, si la quantité maximale de matrice pouvant être injectée sur la colonne avant de saturer la phase stationnaire est cinquante fois plus faible en HILIC, le signal mesuré risque donc d'être cinq fois plus faible en HILIC qu'en phase inverse. L'étude s'est donc d'abord attachée à la recherche de la quantité de matière injectable sur la colonne HILIC.

III.5.7.1) *Evaluation du volume de matrice injectable*

Pour réaliser cette étude, différents échantillons ont été préparés selon le protocole décrit au paragraphe II.2.5) page 196. Puisque 20 µL de la solution finale sont injectés sur la colonne, la première étude a été réalisée sans matrice afin de vérifier que ce volume n'impacte pas le signal (notamment par des déformations de pics chromatographiques) :

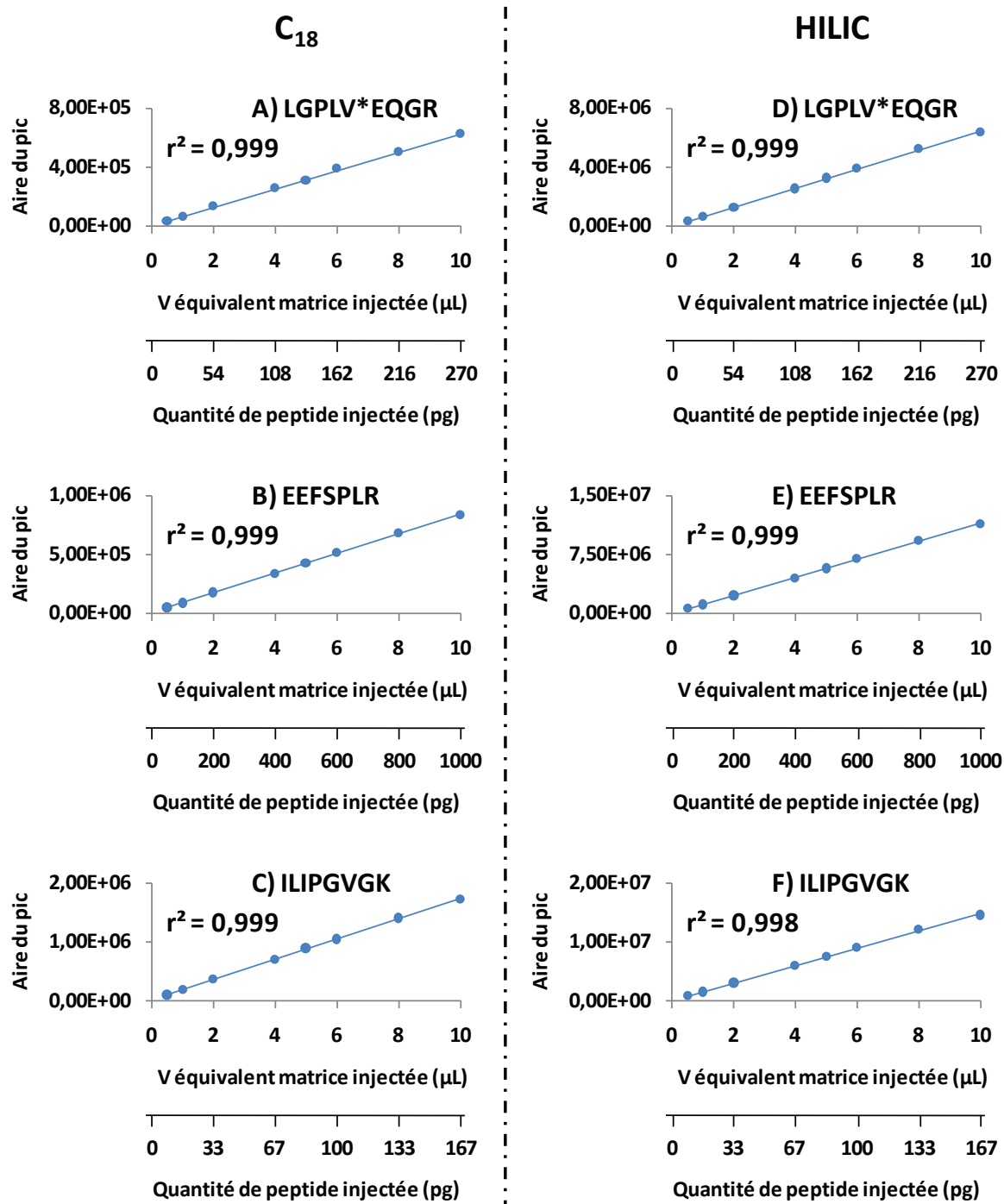


Figure 95 : Evolution de l'aire du pic chromatographique des peptides LGPLV*EQGR (A, D), EEFSPLR (B, E) et ILIPGVGK (C, F) en fonction du volume de solution injecté en phase inverse (A, B, C) ou en HILIC avec 0,5 % de m-NBA dans la phase mobile (D, E, F).

Afin de permettre une comparaison aisée entre ces résultats et les suivants, deux abscisses sont représentées sur chaque graphique : l'une est la quantité de peptide injectée sur la colonne et l'autre représente un volume équivalent à la quantité de matrice qui serait injectée si ces échantillons avaient été préparés en matrice de la même façon que ceux de la Figure 96 (cf. paragraphe II.2.5)

page 196 pour la préparation des échantillons). En effet, dans l'exemple présenté ci-dessus, chaque échantillon a été préparé de la même façon que dans la matrice : toutes les étapes sont les mêmes à l'exception des 4 mL de solution obtenus après digestion d'un volume initial de 100 µL de matrice qui sont remplacés par 4 mL d'eau.

Pour ces trois peptides, la réponse est parfaitement linéaire avec la quantité injectée ($r^2 > 0,99$) ce qui est normal car il n'y a aucun effet matrice puisque les peptides ont été ajoutés dans de l'eau avant SPE. Une nouvelle fois, le signal mesuré est environ dix fois plus intense en HILIC qu'en phase inverse.

La même étude a donc pu être réalisée dans le sérum :

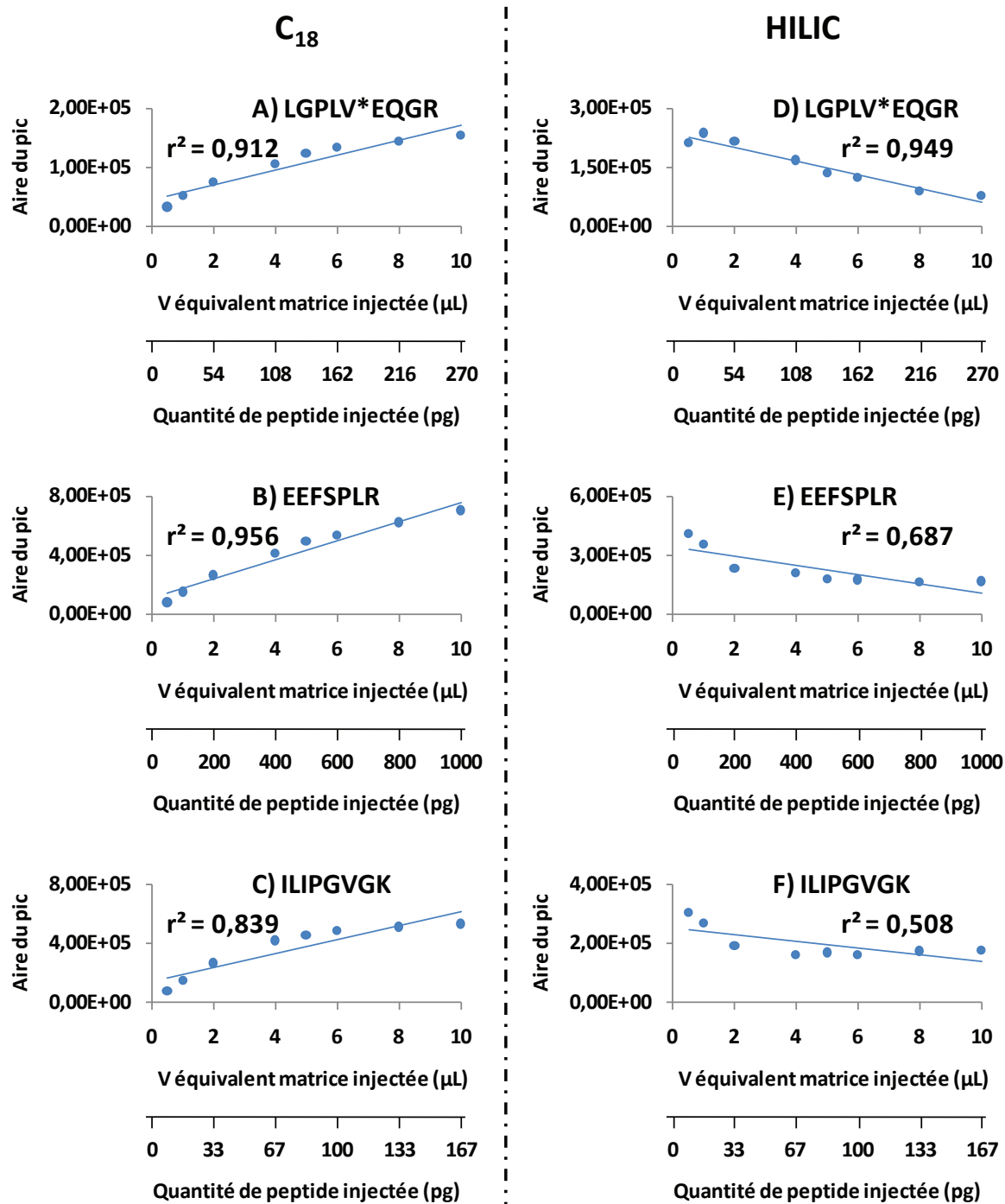


Figure 96 : Evolution de l'aire du pic chromatographique des peptides LGPLV*EQGR (A, D), EEFSPLR (B, E) et ILIPGVGK (C, F) en fonction du volume de sérum injecté en phase inverse (A, B, C) ou en HILIC avec 0,5 % de m-NBA dans la phase mobile (D, E, F).

En phase inverse, le signal continue de croître en fonction du volume de sérum injecté mais cette augmentation n'est pas linéaire ($r^2 < 0,99$). Ceci est lié à l'effet matrice qui varie lui aussi lorsque le volume de sérum injecté change. En revanche, en HILIC, le signal ne fait que décroître lorsque le volume injecté augmente, à l'exception des deux premiers points pour le peptide LGPLV*EQGR.

Ainsi, à l'exception de ce peptide, le signal mesuré en HILIC est le plus important lorsque seulement 0,5 μL de sérum sont injectés sur la colonne et ce signal est inférieur à celui qui est obtenu en phase inverse lorsque 10 μL de sérum sont injectés sur la colonne. On peut se demander si ce phénomène est lié à une capacité de pics plus petite en HILIC. En effet, nous avons vu précédemment que la capacité de pics valait 28,8 en HILIC et 63,4 en phase inverse (*cf.* page 238). Bien que ces deux types de séparation soient orthogonales, on peut tout de même supposer que l'effet matrice sera d'une manière générale plus important en HILIC qu'en phase inverse du fait de la capacité de pics réduite en HILIC. Cette différence de capacité de pics ne suffit cependant pas à expliquer le résultat précédent. En effet, pour les faibles volumes de sérum injectés, le signal obtenu en HILIC reste supérieur à celui obtenu en phase inverse. La chute du signal en HILIC lorsque le volume de sérum injecté augmente est causé par une augmentation soudaine de l'effet matrice probablement engendrée par une saturation de la phase stationnaire. Pour illustrer ce phénomène, les chromatogrammes reconstitués des trois peptides précédents sont représentés dans la figure suivante :

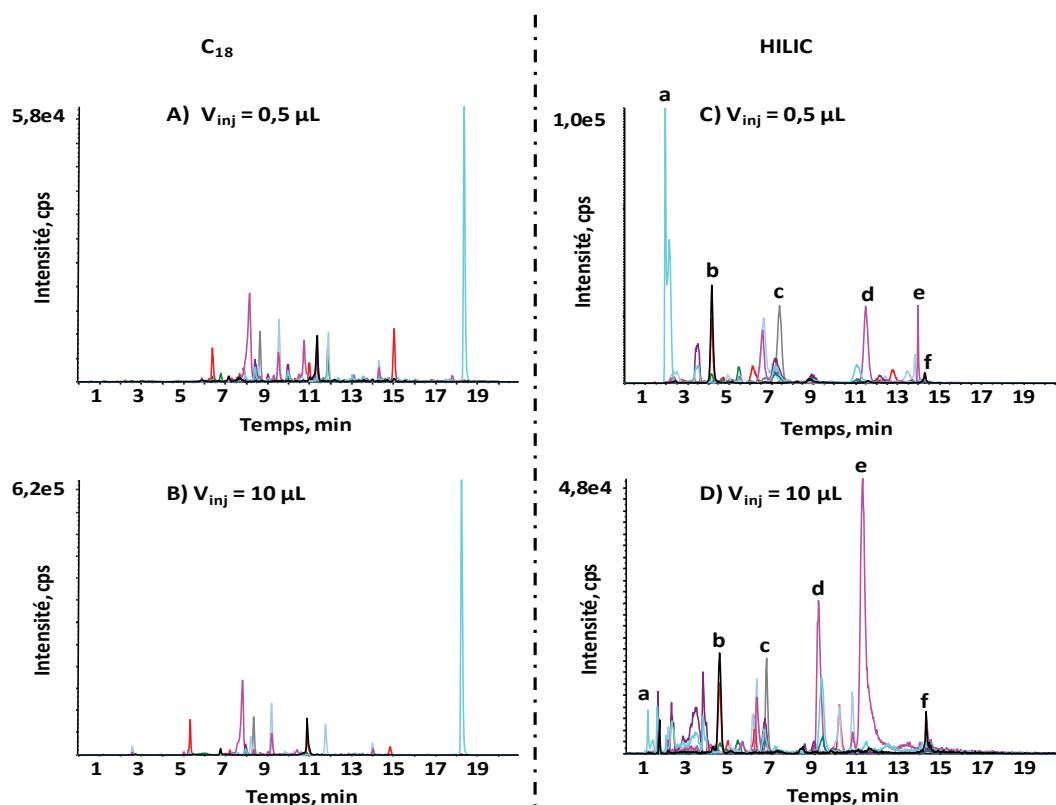


Figure 97 : Chromatogrammes reconstitués des neuf transitions SRM correspondant aux trois peptides LGPLV*EQGR, EEFSPLR et ILIPGVGK après injection de 0,5 μL (A, C) ou 10 μL (B, D) de sérum en phase inverse (A, B) ou en HILIC avec 0,5% de *m*-NBA dans la phase mobile (C, D). En HILIC, six interférents notés a, b, c, d, e et f sont représentés.

En phase inverse, les profils obtenus après injection de 0,5 ou 10 μL de sérum sont équivalents ce qui confirme le fait que la phase stationnaire n'est pas saturée. En revanche, en HILIC, les molécules sont éluées un peu plus tôt lorsque le volume de sérum injecté est plus important. Ce phénomène est d'autant plus marqué que le temps de rétention initial est grand. Par exemple, les molécules

interférentes notées (a), (b) et (c) ont quasiment le même temps de rétention après injection de 0,5 ou 10 μL de sérum. Cependant, les molécules (d) et (e) sont éluées avec plus de deux minutes d'écart. Le temps de rétention de la molécule (f) reste quant à lui inchangé car il correspond à la période de lavage de la colonne chromatographique. Cette saturation de la phase stationnaire engendre un décalage des temps de rétention des composés ce qui va modifier l'effet matrice. Ce phénomène explique la décroissance du signal mesuré lorsque la quantité de matrice injectée augmente.

Puisque l'analyse de sérum en HILIC semble compromise du fait de la plus faible capacité de charge de ces phases stationnaires, une matrice moins chargée doit donc être étudiée. C'est pourquoi, les mêmes analyses ont été réalisées dans de l'urine digérée. En effet, la quantité de protéines dans l'urine est plus faible que dans le sérum. Cependant, l'inconvénient de l'urine est que son volume est très variable et donc les concentrations urinaires sont également variables. L'étude a donc été réalisée sur la deuxième urine journalière qui est l'une des plus concentrées :

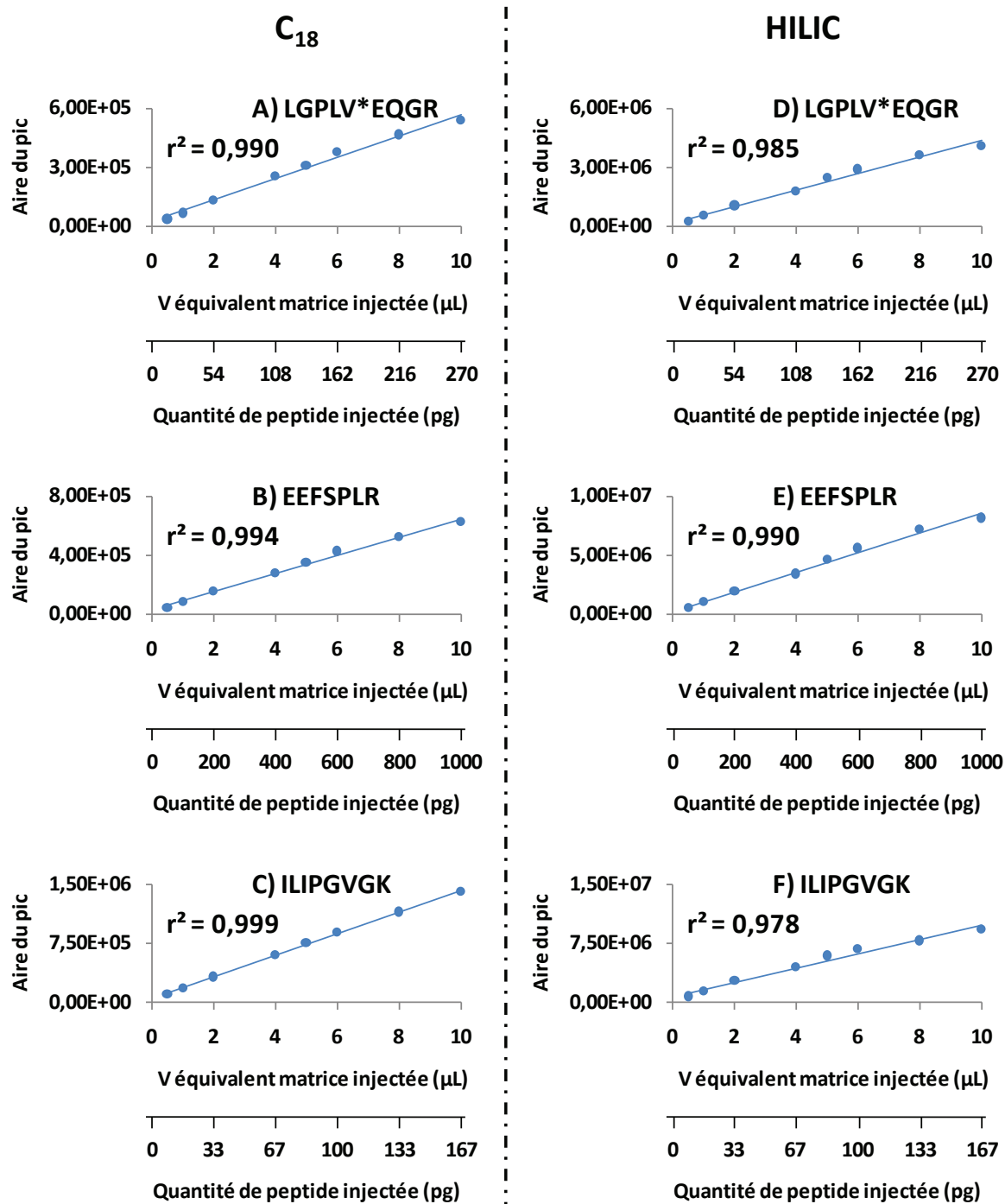


Figure 98 : Evolution de l'aire du pic chromatographique des peptides LGPLV*EQGR (A, D), EEFSPLR (B, E) et ILIPGVGK (C, F) en fonction du volume d'urine injectée en phase inverse (A, B, C) ou en HILIC avec 0,5 % de m-NBA dans la phase mobile (D, E, F).

Comme dans l'eau (*cf.* Figure 95 page 243), la réponse de ces trois peptides est linéaire lorsque le volume injecté en phase inverse augmente. L'effet matrice observé est assez faible et vaut environ 20 %. En HILIC, la réponse reste linéaire jusqu'à 6 μ L injectés. Au-delà, le signal continue tout de

même d'augmenter mais l'effet matrice devient également plus important : il est d'environ 15 % en dessous de 6 μL injectés et est doublé entre 6 et 10 μL injectés.

Nous pouvons donc essayer d'estimer la quantité de matériel injecté engendrant une saturation de la phase stationnaire. En effet, cette saturation semble se produire vers un volume de sérum injecté proche de 0,5 μL . En supposant que la concentration totale en protéine soit de 60 mg / mL, 6 mg de protéines ont été digérées dans les 100 μL de sérum prélevés. A cette quantité, il faut ajouter 200 μg de trypsine utilisés lors de la digestion enzymatique. Le total de protéine est donc de 6,2 mg dans 100 μL de sérum soit 56 μg de protéines dans les 0,5 μL de sérum injecté sur la colonne. Dans l'urine, le taux de protéines est d'environ 0,1 mg / mL soit 600 fois inférieur au taux rencontré dans le sérum. Sachant que les 100 μL d'urine ont été digérés selon le même protocole que le sérum, on trouve donc 10 μg de protéines endogènes et 200 μg de trypsine soit 210 μg de protéines. Ainsi, l'injection de 5 μL d'urine équivaut à charger 10,5 μg de protéines sur la colonne. Cette valeur est cinq fois plus faible que pour le sérum. On peut donc supposer que le volume d'urine injectée pourrait encore être augmenté avant de saturer la phase stationnaire en HILIC. Ces calculs reposent également sur le fait que les seules molécules présentes dans ces deux matrices sont des protéines. Cette approximation est valable dans le sérum puisque les protéines en sont les constituants majoritaires. En revanche l'urine recueille tous les métabolites excrétés par l'organisme. Ces métabolites comprennent les résidus de médicaments, les hormones, la caféine... Ils peuvent ainsi être plus concentrés dans l'urine que les protéines totales. Par exemple, pour un donneur ingurgitant trois grammes de paracétamol par jour, la concentration urinaire de paracétamol et de son métabolite principal peut alors atteindre 2,7 g / L sachant que 90% du paracétamol va être retrouvé dans les urines sous 24h (soit dans un volume d'urine d'environ 1L). Ainsi, une injection de 5 μL d'urine contiendrait 13,5 μg de paracétamol soit une quantité plus importante que l'ensemble de toutes les protéines. En additionnant ainsi les nombreuses petites molécules rejetées dans l'urine, on peut supposer que la saturation de la phase stationnaire en HILIC soit liée à la grande quantité de petites molécules par rapport aux protéines.

La quantité d'urine injectée pourrait être augmentée afin de trouver le seuil maximal mais l'étude de la différence de sensibilité entre l'HILIC et la phase inverse va s'effectuer en injectant un volume de 5 μL d'urine ce qui correspond à une zone où la réponse reste linéaire en fonction du volume injecté.

III.5.7.2) *Linéarités dans l'urine*

Des gammes de trois peptides (LGPLV*EQGR, EEFSPLR et ILIPGVGK) ont été réalisées après digestion d'urine. Comme lors des gammes dans l'eau, les concentrations indiquées sont en équivalent de protéine par mL d'urine pour le peptide LGPLV*EQGR et en masse de peptide par mL d'urine pour les deux autres peptides. Les résultats de ces gammes sont présentés dans la Figure 99 :

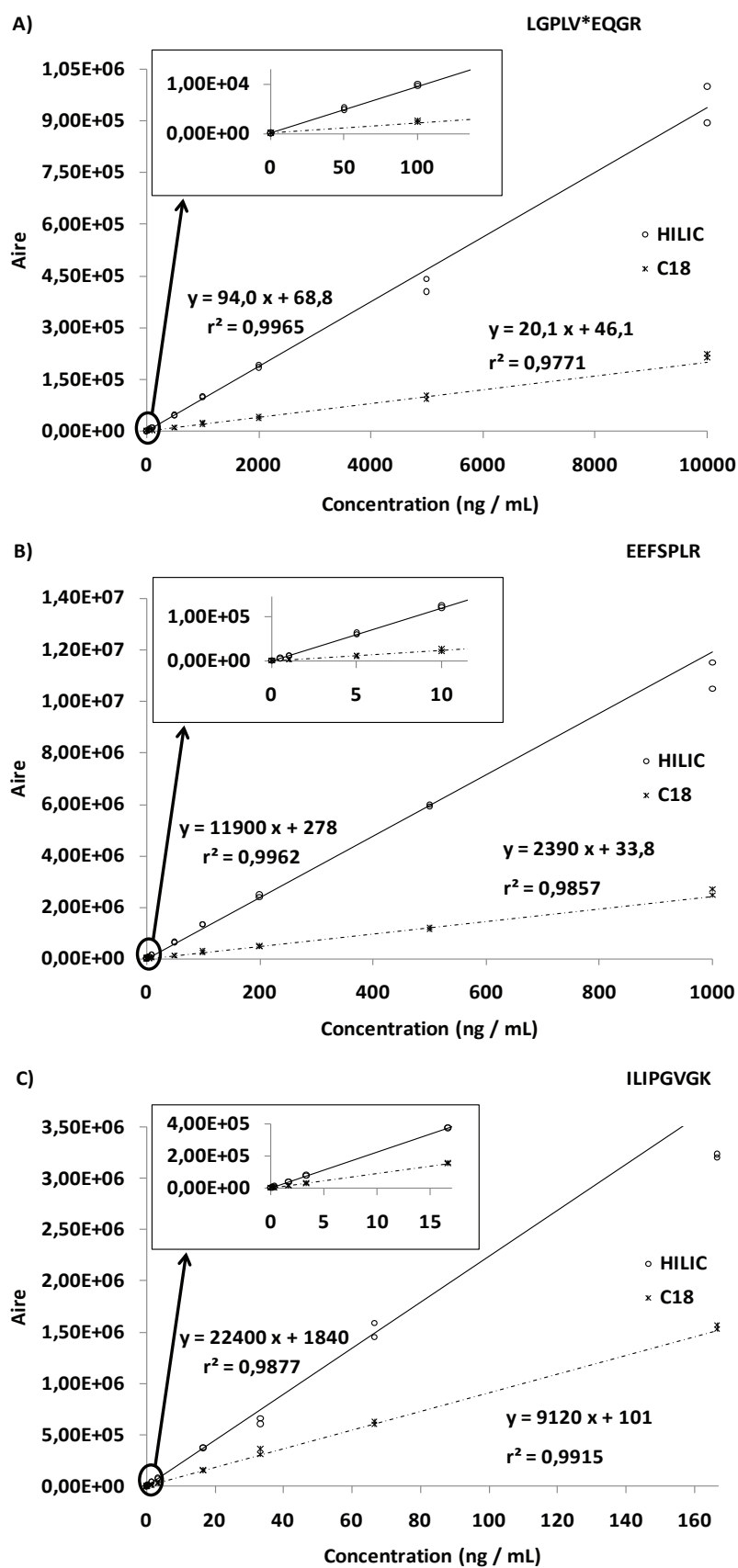


Figure 99 : Gammes des peptides LGPLV*EQGR (A), EEFSPLR (B) et ILIPGVGK (C) dans l'urine après séparation en HILIC ou en phase inverse.

Pour les trois peptides, la pente des droites est plus forte en HILIC ce qui témoigne d'une aire mesurée plus importante pour chaque peptide. Le rapport des pentes n'est toutefois que compris entre deux et cinq ce qui est un peu plus faible que dans l'eau (ce rapport variait entre cinq et huit). Cet écart est lié à un effet matrice différent entre la séparation en HILIC et en phase inverse. En effet, ces deux modes de séparations sont assez orthogonaux^{298, 320-322}, c'est pourquoi les colonnes HILIC sont couramment utilisées lors de séparations en deux dimensions. Puisque les séparations sont orthogonales, des composés coélus en phase inverse seront vraisemblablement séparés en HILIC et vice versa. L'effet matrice entre ces deux séparations ne peut donc absolument pas être considéré comme étant le même. Ceci rend l'interprétation des résultats plus délicate. Les exactitudes correspondant à ces gammes ont été reportées dans le tableau suivant :

Tableau 34 : Exactitudes (en %) associées aux gammes de la Figure 99.

Exactitude LGPLV*EQGR (en %)			Exactitude EEFSPLR (en %)			Exactitude ILIPGVGK (en %)		
Concentration (ng / mL)	C ₁₈	HILIC	Concentration (ng / mL)	C ₁₈	HILIC	Concentration (ng / mL)	C ₁₈	HILIC
0	N/D ^(a)	N/D	0	N/D	N/D	0	N/D	N/D
0	N/D	N/D	0	N/D	N/D	0	N/D	N/D
50	65,7	109,2	0,5	128,3	96,6	0,17	65,7	81,3
50	76,3	99,5	0,5	71,4	93,6	0,17	89,8	87,0
100	128,5	101,1	1	106,0	101,5	0,33	104,7	115,5
100	105,6	105,3	1	101,8	92,2	0,33	93,8	111,0
500	101,9	95,2	5	101,1	104,9	1,67	92,5	103,3
500	98,8	99,3	5	90,1	99,6	1,67	80,3	99,9
1000	118,7	106,3	10	110,2	104,1	3,33	109,1	106,0
1000	97,6	103,2	10	88,3	100,5	3,33	86,2	101,0
2000	103,3	101,5	50	97,7	102,5	16,7	104,1	99,7
2000	90,7	98,1	50	89,4	106,5	16,7	100,4	100,2
5000	103,6	93,8	100	116,2	109,7	33,3	119,2	88,7
5000	92,4	86,1	100	97,7	110,0	33,3	102,4	81,1
10000	111,9	106,4	200	98,9	103,7	66,7	104,2	106,2
10000	105,2	95,1	200	94,5	99,8	66,7	98,7	97,0
			500	100,8	100,4	166,7	103,5	85,7
			500	93,2	99,0	166,7	101,0	86,6
			1000	112,0	96,4			
			1000	102,5	87,9			

^(a) N/D : Non déterminée

Pour chaque peptide, les points les moins concentrés ne permettent pas d'obtenir une exactitude comprise entre 80 et 120% en phase inverse alors que c'est le cas en HILIC. L'HILIC permet donc d'abaisser les limites de quantification d'une protéine par le biais d'un peptide rapporteur. Ce gain de sensibilité varie d'un facteur deux à cinq selon le peptide étudié. Ce gain est donc plus faible que celui observé pour les mêmes peptides dans l'eau (*cf.* paragraphe III.5.6) page 239). En effet, il allait

d'un facteur cinq à un facteur dix. Comme nous l'avons vu précédemment, la capacité de pics est plus faible en HILIC et donc l'effet matrice aura tendance à être supérieur en HILIC qu'en phase inverse. Ceci explique que le gain de sensibilité soit légèrement plus faible dans l'urine que dans l'eau. Cet effet matrice plus important explique également la perte de linéarité des courbes de la Figure 98 lorsque le volume d'urine injectée en HILIC devient supérieur à 6 μ L.

IV) Conclusion

La chromatographie liquide d'interactions hydrophiles (HILIC) est donc une technique de séparation orthogonale à la chromatographie liquide en phase inverse. L'HILIC a été appliquée avec succès pour la séparation de nombreuses familles de composés dont les peptides. Il existe de nombreuses phases stationnaires permettant de réaliser des séparations en HILIC (silice pure, diol, cyano, amide, zwitterionique...). Cependant, pour la séparation de peptides, les principales phases stationnaires sont la silice pure et la silice greffée par un groupement amide ou zwitterionique. Quelle que soit la phase stationnaire, l'utilisation de phases mobiles tamponnées est généralement recommandée en HILIC. En effet, les tampons améliorent la forme des pics chromatographiques en réduisant les interactions entre les analytes chargés et les silanols déprotonés. Nous avons vu que ceci est particulièrement vrai pour les colonnes de silice pure et pour les silices greffées par un groupement zwitterionique. En revanche, l'ajout de tampons dans la phase mobile n'améliore pas la forme des pics pour la colonne amide testée probablement grâce au faible taux de silanols résiduels que possède cette phase stationnaire. De plus, la présence de tampons dans la phase mobile (même s'ils sont volatils) engendre une diminution du signal. Or, l'objectif lors d'une quantification est généralement d'avoir le plus de signal possible afin de détecter des quantités de plus en plus faibles. De ce fait, il est préférable d'utiliser la colonne amide sans ajouter de tampons dans la phase mobile pour séparer les peptides en HILIC lorsque les limites de quantification veulent être abaissées. Puisque la séparation en HILIC se fait dans un solvant majoritairement organique (environ 70 à 80% d'ACN pour éluer un peptide), la désolvatation des peptides est meilleure en HILIC qu'en phase inverse pour laquelle l'élution se déroule entre 10 et 30% d'ACN. Par conséquent, le signal en HILIC est plus important qu'en phase inverse. Cette propriété a été largement exploitée pour les petites molécules pour lesquelles des gains d'un facteur dix environ sont atteints en HILIC. En revanche, pour les peptides, le gain obtenu n'était en moyenne que d'un facteur deux à quatre. Ceci est lié au fait que les peptides sont des espèces possédant différents états de charge. Or, l'état de charge moyen observé dépend notamment de la tension de surface de la goutte lors de l'ionisation par électrospray : plus cette tension de surface est faible, moins le peptide est chargé. Puisque la tension de surface de l'ACN est plus faible que celle de l'eau, l'état de charge des peptides est diminué en HILIC. L'ajout d'alcool méta-nitrobenzylique (m-NBA) permet de réaugmenter cet état de charge moyen puisque la tension de surface du m-NBA est supérieure à celle de l'ACN. Ainsi, le gain de signal obtenu en HILIC se rapproche de celui rencontré pour les petites molécules qui sont généralement des espèces n'existant que sous un seul état de charge. Il varie en effet d'un facteur quatre à un facteur dix. Pour des matrices simples, l'HILIC est donc une très bonne alternative à la phase inverse lorsque les limites de quantifications doivent être diminuées. Cependant, pour des matrices

complexes telles que le sérum, l'HILIC présente une limitation. En effet, la capacité de charge de la phase stationnaire est assez limitée par rapport aux phases de type C_{18} . A quantité de matrice injectée équivalente, l'HILIC permet tout de même d'abaisser les limites de quantification d'un facteur deux à cinq. Cependant, lorsque de grandes quantités d'échantillons sont disponibles, l'HILIC peut être surplombée par la phase inverse en injectant des quantités beaucoup plus importantes. Pour la quantification de peptides, l'HILIC présente donc des atouts intéressants bien que la plus forte limitation actuelle à l'utilisation de ces colonnes soit leur capacité de charge. Il serait alors intéressant d'évaluer les moyens permettant d'augmenter cette capacité de charge. Par exemple, la présence de tampons dans la phase mobile permet d'augmenter sa force ionique et d'améliorer ainsi la capacité de charge de la phase stationnaire³²³. Cependant, nous avons vu que l'utilisation de tampons est néfaste pour le signal. Une possibilité à évaluer serait donc d'utiliser une phase mobile tamponnée lors de l'injection afin de pouvoir augmenter la capacité de charge de la colonne. Ensuite, il faudrait réutiliser une phase mobile non tamponnée afin de ne pas générer de suppression de signal lors de la désolvatation des peptides. Un tel montage peut être réalisé selon le modèle de la SPE en ligne et nécessite donc l'utilisation d'une pompe supplémentaire et d'une vanne à deux positions. La première pompe va conditionner la cartouche d'extraction en ligne avec une phase mobile contenant un tampon. Après injection de l'échantillon sur cette cartouche, la vanne est commutée et l'éluat de la cartouche d'extraction est dirigé vers la colonne HILIC par le biais d'une seconde pompe. Les solvants de cette pompe ne contiennent alors pas de tampon. Il faudrait toutefois évaluer l'impact d'un tel montage sur la forme des pics chromatographiques à cause du changement de type de phase mobile (présence puis absence de tampon).

Une autre possibilité pour s'affranchir de ces problèmes de capacité de charge est de réaliser de la chromatographie liquide en deux dimensions : une première dimension en phase inverse afin de bénéficier des avantages de ce mode de séparation (grande capacité de charge et grande capacité de pics afin de pouvoir séparer un maximum de composés de la matrice) et une seconde dimension en HILIC afin de bénéficier du gain de signal qui peut alors être généré. Puisqu'un fractionnement de l'échantillon est réalisé dans la première dimension, la quantité de matière qui sera injectée dans la seconde dimension sera alors suffisamment faible pour ne pas saturer la colonne HILIC. Ce système est relativement simple à mettre en œuvre lorsqu'un seul peptide veut être dosé puisqu'une seule fraction issue de la première dimension va être analysée en HILIC. En revanche, si de nombreux peptides doivent être étudiés et que l'ensemble de la séparation doit se faire en ligne, il faudra alors réaliser une séparation en HILIC très rapide (de l'ordre d'une minute). Cela n'est réalisable qu'en augmentant le débit de la phase mobile dans la deuxième dimension ce qui va engendrer une perte de signal à cause d'une moins bonne désolvatation des analytes (perte de signal par rapport à la même analyse en HILIC mais réalisée à plus faible débit). Comme précédemment, faire de la chromatographie en ligne en deux dimensions nécessite la présence d'une pompe supplémentaire et d'une vanne à deux positions.

Puisque l'analyse de peptides issus de la digestion enzymatique de protéines dans le sérum en HILIC pose des problèmes au niveau de la capacité de charge de la phase stationnaire en HILIC et qu'il est peu probable que ces problèmes de capacité de charge soient résolus rapidement, l'utilisation de l'HILIC peut paraître compromise pour améliorer la sensibilité d'une méthode de quantification absolue de protéines par rapport au même dosage effectué en phase inverse. En tout cas, l'utilisation de l'HILIC ne peut pas être recommandée lorsque des volumes importants de matrice sont

disponibles pour le dosage. En revanche, pour l'analyse du sérum d'organismes plus petits tels que les souris, le potentiel de l'HILIC peut être exploité.

De plus, il ne faut pas oublier que dans le sérum se trouvent de nombreux peptides faiblement concentrés pour lesquels l'HILIC pourrait devenir une technique très intéressante. En effet, les méthodes traditionnelles utilisent une précipitation des protéines par ajout d'un solvant organique suivie d'une centrifugation et d'une évaporation du surnageant qui est ensuite analysé en phase inverse. Une autre approche consiste à effectuer une extraction sur phase solide des peptides d'intérêt puis d'évaporer l'éluat qui est également analysé en phase inverse. Pour les peptides les plus concentrés, le débit d'analyse peut être considérablement augmenté. En effet, après précipitation des protéines, le surnageant peut être directement injecté sur la colonne HILIC. Ou alors, puisque le sérum a été déplété des protéines, la quantité de sérum pouvant être injectée sur la colonne HILIC va être considérablement augmentée. Ainsi, des dosages chez l'homme pourront probablement être réalisés sans saturer la phase stationnaire. Ces dosages auront l'avantage d'être plus sensibles grâce à l'utilisation de l'HILIC. Afin de vérifier cette dernière hypothèse, une étude est en cours au laboratoire afin de doser des angiotensines dans le sérum humain.

CONCLUSION GENERALE

Nous avons vu dans la première partie de ce manuscrit toute l'ampleur qu'ont prise les biomarqueurs au cours de ces dernières années et notamment les biomarqueurs protéiques. Cet intérêt croissant concerne non seulement leur découverte mais également leur quantification absolue. A ce jour, les méthodes de quantification de référence font appel aux méthodes immuno-enzymatiques. Cependant, du fait des limitations principalement liées à la disponibilité d'anticorps spécifiques de l'analyte cible, il est intéressant de disposer de méthodes alternatives. Dans ce contexte, la chromatographie en phase liquide couplée à la spectrométrie de masse en tandem s'est avérée être une méthode de choix car elle peut être utilisée non seulement pour la découverte des biomarqueurs mais également pour leur quantification absolue. En revanche, elle souffre également de quelques limitations par rapport aux dosages par ELISA :

- (i) une préparation d'échantillon fastidieuse (digestion enzymatique, extraction sur phase solide...) nécessaire du fait que la quantification soit réalisée par le biais d'un peptide rapporteur et non sur la protéine entière,
- (ii) la détection se fait par la mesure d'un rapport masse sur charge. Il faut donc d'une part connaître la séquence des protéines de l'individu afin de pouvoir choisir et calculer la masse d'un peptide rapporteur spécifique de cette protéine. D'autre part, il ne faut pas que ce peptide rapporteur soit modifié sous peine de ne plus être détecté et au final, de perdre une partie de l'information,
- (iii) les limites de détection / quantification actuelles sont encore bien au-delà de celles atteintes en ELISA (par exemple, la limite de quantification de l'antigène spécifique de la prostate est située vers 1 ng / mL par LC-MS/MS³²⁴ alors qu'elle peut atteindre 1 pg / mL en ELISA³²⁵).

Au cours de ces travaux de thèse, nous nous sommes intéressés plus particulièrement aux deux derniers points : la mise au point de méthodes de dosages de protéines dans des organismes partiellement séquencés ou par le biais de peptides pouvant être modifiés chimiquement puis l'évaluation de méthodes chromatographiques permettant d'abaisser les limites de quantification par LC-MS/MS.

Ainsi, dans le cadre du Plan National de Recherche sur les Perturbateurs Endocriniens (PNRPE) lancé en 2005, la première étude s'est attachée au développement d'une méthode de dosage d'un biomarqueur potentiel de perturbation endocrinienne : la vitellogénine (Vtg) chez un crustacé (*Gammarus fossarum*). Cette étude a permis de présenter la méthodologie générale à suivre lorsque la quantification absolue d'une protéine doit être mise en place par LC-MS/MS : (i) digestion enzymatique de l'échantillon, (ii) recherche des peptides donnant le meilleur signal, (iii) vérification de la spécificité du peptide sélectionné, (iv) vérification de la linéarité de la réponse du peptide et (v) détermination de la limite de quantification. Dans l'espèce étudiée, l'étape la plus cruciale est incontestablement la troisième. En effet, cette espèce n'est quasiment pas séquencée. La séquence complète de la protéine recherchée n'est même pas connue. Dans ce cas, la validation de la spécificité du peptide d'intérêt se fait en corrélant l'aire du signal de ce peptide avec celui d'autres peptides issus de la même protéine. La méthode ainsi développée a ensuite pu être appliquée afin de valider la fonction de la Vtg chez *Gammarus fossarum* pour ensuite moduler l'expression de cette protéine. Ceci présente un intérêt majeur afin de mieux comprendre le système endocrinien de cette

espèce. La compréhension de ce système endocrinien présente deux enjeux : elle va permettre de découvrir d'une part de nouveaux perturbateurs endocriniens chez *G. fossarum* et d'autre part, de nouveaux biomarqueurs de la perturbation endocrinienne. Ces découvertes vont permettre de mettre en évidence la pollution de certains sites sans forcément rechercher la nature exacte du polluant. La recherche du polluant constitue une tâche plus difficile à exécuter notamment lorsqu'il a été dissipé dans l'environnement alors que son impact sur la faune reste quant à lui quantifiable.

La méthode proposée ici constitue le premier exemple de dosage de la Vtg par LC-MS/MS chez un invertébré et ouvre la voie à la quantification de la Vtg chez n'importe quelle autre espèce par cette approche. Des travaux similaires ont d'ailleurs été réalisés chez un autre crustacé (*Eurytemora affinis*) en partenariat avec l'Irstea et l'Université du Havre. Ces résultats n'ont pas été présentés dans ce manuscrit car la méthode n'est pas encore entièrement développée par manque de matière première mais l'approche est la même que celle utilisée avec l'espèce *Gammarus fossarum*. De même, à partir de ces travaux, une approche a été proposée afin de doser la Vtg chez différentes espèces à partir du même peptide rapporteur. Cette approche repose sur le fait que la séquence de la Vtg soit relativement bien conservée entre des espèces phylogéniques proches.

Dans une seconde partie, nous nous sommes intéressés à un autre cas particulier lié au fait que la détection en spectrométrie de masse soit basée sur la mesure d'un rapport masse sur charge. Il s'agit de l'étude de peptides comportant une méthionine. Ces peptides peuvent donc être oxydés naturellement ce qui va changer leur masse. Dans ce cas, ils ne seront plus détectés. Ce phénomène très connu limitait jusqu'à ce jour le choix des peptides rapporteurs à ceux ne possédant pas de méthionine. En revanche, si on ne peut se passer d'un peptide contenant une méthionine, une quantification exacte et répétable ne peut pas être garantie à cause de l'oxydation non contrôlée de ces méthionines. Dans ce contexte, nous avons mis au point un protocole d'oxydation totale des méthionines en méthionines sulfones par ajout d'acide performique. Après avoir rigoureusement validé la totalité de la réaction ainsi que sa répétabilité en matrice complexe telle que du plasma, ce protocole a été appliqué pour doser l'apolipoprotéine E (Apo E) et l'un de ses variants génétiques, l'apolipoprotéine E4 (Apo E4) dans une cohorte de 673 plasmas. Cette étude est à ce jour l'une des premières réalisée par LC-MS/MS sur un nombre d'échantillons aussi important et sur une période relativement courte. Le protocole d'oxydation a dû être développé car le seul peptide protéotypique de l'Apo E4 possède une méthionine. L'Apo E4 présente quant à elle un intérêt majeur dans l'étude de la maladie d'Alzheimer. En effet, le fait de posséder le gène codant pour cet isoforme augmente le risque de développer la maladie d'Alzheimer. En revanche, les études réalisées par ELISA ne permettent pas d'affirmer si le taux plasmatique d'Apo E et / ou d'Apo E4 joue un rôle dans cette maladie puisque certaines études ont révélé une différence d'expression de l'Apo E (augmentation ou diminution) alors que d'autres non. Le dosage présenté ici aboutit à cette dernière conclusion : la variabilité biologique est telle que les quelques informations disponibles (âge, genre et trois modifications de la séquence d'ADN) ne permettent pas de distinguer les témoins des malades par la mesure de la concentration plasmatique d'Apo E ou d'Apo E4.

Le plus grand intérêt de la méthode développée ci-dessus est qu'elle ouvre la voie à de nouveaux horizons en spectrométrie de masse car il n'y a aucune contre indication à l'utiliser sur des protéines

moins concentrées que l'Apo E4. Jusqu'à présent, les peptides contenant une méthionine étaient évités. Cette approche va donc permettre d'abaisser les limites de quantification des protéines pour lesquelles le peptide donnant la meilleure réponse n'a pas été retenu pour le dosage final car il contient une méthionine.

Enfin, dans une dernière partie, nous avons évalué l'impact de la phase mobile pour la quantification par LC-MS/MS. Cet aspect a été divisé en deux études : d'abord en phase inverse puis en HILIC. En phase inverse, le solvant organique utilisé de façon standard est l'acétonitrile. Dans un contexte « de crise de l'acétonitrile », la comparaison de ce solvant avec le méthanol a été abordée en gardant également à l'esprit l'objectif d'abaisser les limites de quantification. Outre les propriétés physico-chimiques des solvants telles que la température d'ébullition, la tension de surface et la basicité en phase gaz qui sont toutes les trois favorables au méthanol, nous avons vu que d'autres propriétés pouvaient être prépondérantes pour générer un signal plus important en électrospray. Ces propriétés sont notamment la viscosité des mélanges hydro-organiques et la constante diélectrique du milieu. Ces deux dernières propriétés sont en revanche en défaveur du méthanol. Ainsi, à pourcentage de solvant organique identique, l'acétonitrile est le solvant engendrant le plus de signal pour les peptides. Cependant, puisque le méthanol est moins éluant que l'acétonitrile, il faut plus de méthanol que d'acétonitrile pour éluer un peptide. Par conséquent, le signal obtenu avec le méthanol devient légèrement supérieur en produit pur. En matrice complexe, les différentes sélectivités de ces deux solvants font que l'effet matrice va varier en fonction du solvant choisi (méthanol ou acétonitrile). Le gain de signal obtenu avec le méthanol est alors modulé au point que le signal obtenu avec le méthanol peut être inférieur à celui obtenu avec l'acétonitrile. En revanche, le fait de remplacer l'acétonitrile par du méthanol sans changer la pente du gradient de solvant éluant est un moyen simple et rapide d'augmenter la capacité de pics de la séparation chromatographique ce qui s'accompagne d'une baisse de l'effet matrice. Une diminution des limites de quantification jusqu'à un facteur deux peut ainsi être atteinte rapidement et à moindre coût puisque le méthanol reste moins onéreux que l'acétonitrile.

Quel que soit le solvant organique utilisé, pour maximiser le signal en électrospray, il est préférable que la teneur de ce solvant soit la plus grande possible. Une autre façon d'aboutir à cela consiste à faire de la chromatographie liquide d'interactions hydrophiles (HILIC). Ce type de chromatographie a été largement exploité pour l'analyse de petites molécules mais pas pour la quantification de peptides. Parmi les raisons potentielles, nous avons vu que l'utilisation de phases mobiles contenant des sels était néfaste pour le signal en ESI (même si ces sels sont volatils) alors que ce type de phase mobile est recommandé pour la séparation de peptides en HILIC. Cependant, avec les colonnes de type amide, ces tampons ne sont plus indispensables pour obtenir une bonne séparation. Ainsi, en l'absence de tampons dans la phase mobile, un facteur quatre en moyenne peut être gagné sur l'intensité des pics chromatographiques par rapport à la même séparation réalisée en présence de sels. Malgré cela, le gain obtenu en HILIC pour les peptides reste faible par rapport à celui qui pouvait être attendu d'après les nombreux travaux réalisés sur les petites molécules : ce gain est seulement d'un facteur quatre au lieu d'un facteur dix. Ceci est lié au fait que les peptides sont des espèces présentant différents états de charge. De ce fait, augmenter la teneur d'acétonitrile s'accompagne d'une baisse de la tension de surface au niveau des gouttes lors de l'ionisation électrospray et donc

d'une diminution de l'état de charge moyen des peptides. Afin de palier ce problème, de l'alcool méta-nitrobenzylique (m-NBA) a été ajouté dans la phase mobile pour redéplacer l'état de charge. Ainsi, après séparation d'un mélange peptidique, un facteur dix peut être gagné en chromatographie HILIC par rapport à la phase inverse. D'autres réactifs pourraient également être évalués pour redéplacer l'état de charge des peptides. Cependant, le principal inconvénient des colonnes de type HILIC est que leur capacité de charge reste faible par rapport aux colonnes de type C₁₈. Par conséquent, l'HILIC trouve son intérêt uniquement lorsque de faibles quantités de peptides doivent être injectées. Ceci est possible par exemple dans les trois cas suivants : (i) lorsque le volume d'échantillon est limitant, (ii) lorsque les peptides plasmatiques veulent être analysés ou (iii) lors d'une séparation en deux dimensions, sous réserve que la colonne HILIC soit placée dans la seconde dimension.

Les travaux présentés dans cette thèse permettent donc d'ouvrir de nouveaux horizons pour la quantification absolue de protéines par LC-MS/MS aussi bien en terme de choix des peptides protéotypiques qu'en terme de limite de quantification. Au cours de cette thèse, l'amélioration de la sensibilité a été recherchée notamment en étudiant des moyens permettant d'augmenter la désolvatation des ions. Cependant, une autre approche n'a pas été décrite ici. Il s'agit des moyens mis en œuvre pour augmenter la spécificité de la détection. Si la détection devient plus spécifique, le bruit de fond diminue et le rapport signal sur bruit augmente. Nous avons vu lors du premier chapitre que la MRM³, méthode développée dans notre laboratoire permettait de réaliser ceci. Cependant, il existe d'autres approches. C'est le cas notamment de la photo-SRM, également développée dans notre laboratoire et qui a fait l'objet d'une publication en tant que co-auteur dans le journal « *Rapid Communications in Mass Spectrometry* »³²⁶. Ces travaux faisant l'objet d'une autre thèse, cette approche n'a pas été présentée dans ce manuscrit. Le principe de la photo-SRM est presque le même que celui de la SRM : filtrer les ions selon leur rapport masse sur charge dans le premier et le troisième quadripôle. La différence intervient au niveau du deuxième quadripôle : en SRM, les molécules sont fragmentées de façon non spécifique suite à leur collision avec du gaz alors qu'en photo-SRM, seules les molécules pouvant absorber les photons émis par un laser donné vont se fragmenter. Ceci permet d'ajouter un niveau de sélectivité supplémentaire dans la détection et donc d'améliorer le rapport signal sur bruit.

ANNEXES

**ANNEXE A : SEQUENCE DE L'APOLIPOPROTEINE E ET DES
PEPTIDES TRYPTIQUES POTENTIELS.**

L'apolipoprotéine E (Apo E) est une protéine de 317 acides aminés dont la séquence complète est présentée sur la figure suivante :

MKVLWAALLVTFLAGCQAKVEQAVETEPEPELQQTEWQSGQRWELALGRFWDYLRWVQTLSEQVQEELLSSQ
VTQELRALMDETMKELKAYKSELEEQLTPVAEETRARLSKELQAAQARLGADMEDVCGRLVQYRGEVQAMLGQS
TEELRVRLASHLRKLRKLLRDADDLQKRLAVYQAGAREGAERGLSAIRERLGPLVEQGRVRAATVGSLAGQPLQER
AQAWGERLRARMEEMGSRTDRDLDEVKEQVAEVRAKLEEQAQQIRLQAEAFQARLKSWEPLVEDMQRQWAG
LVEKVQAAVGTSAAPVPSDNH

Figure 100 : Séquence de l'apolipoprotéine E.

Après digestion par de la trypsine, l'Apo E génère potentiellement 48 peptides :

Tableau 35 : Liste des peptides tryptiques potentiels de l'apolipoprotéine E.

Position	Masse (Da)	Séquence
1 - 2	277,4	MK
3 - 19	1803,2	VLWAALLVTFLAGCQAK
20 - 33	1625,8	VEQAVETEPEPELR
34 - 43	1247,3	QQTEWQSGQR
44 - 50	844,0	WELALGR
51 - 56	899,0	FWDYLR
57 - 79	2731,0	WVQTLSEQVQEELLSSQVTQELR
80 - 87	938,1	ALMDETMK
88 - 90	388,5	ELK
91 - 93	380,5	AYK
94 - 108	1730,9	SELEEQLTPVAEETR
109 - 110	245,3	AR
111 - 113	346,4	LSK
114 - 121	886,0	ELQAAQAR
122 - 132	1164,3	LGADMEDVCGR
133 - 137	677,8	LVQYR
138 - 152	1647,8	GEVQAMLGQSTEELR
153 - 154	273,3	VR
155 - 160	695,8	LASHLR
161 - 161	146,2	K
162 - 163	287,4	LR
164 - 164	146,2	K
165 - 165	174,2	R
166 - 168	400,5	LLR
169 - 175	803,8	DADDLQK
176 - 176	174,2	R
177 - 185	948,1	LAVYQAGAR
186 - 190	560,6	EGAER
191 - 196	615,7	GLSAIR
197 - 198	303,3	ER
199 - 207	968,1	LGPLVEQGR
208 - 209	273,3	VR
210 - 224	1497,7	AATVGSLAGQPLQER
225 - 231	816,9	AQAWGER
232 - 233	287,4	LR
234 - 235	245,3	AR
236 - 242	839,0	MEEMGSR
243 - 244	275,3	TR
245 - 246	289,3	DR

247 - 251	602,7	LDEVK
252 - 258	829,9	EQVAEVR
259 - 260	217,3	AK
261 - 269	1114,2	LEEQAQQIR
270 - 278	1033,2	LQAEAFQAR
279 - 280	259,4	LK
281 - 292	1536,7	SWFEPLVEDMQR
293 - 300	930,1	QWAGLVEK
301 - 317	1620,8	VQAAVGTSAAPVPSDNH

ANNEXE B : ANALYSE STATISTIQUE DE DONNEES.

Au cours de ces travaux de thèse, deux outils statistiques ont été utilisés : l'analyse de variance à un facteur, réalisée sous Excel 2007 et l'analyse en composantes principales réalisée par le logiciel Jump 9.0. Ces deux outils vont être présentés plus en détail.

I) L'analyse de variance

L'analyse de variance (ANOVA) permet de comparer des moyennes entre deux échantillons. Nous allons détailler ici l'exemple présenté dans le Tableau 18 page 176 dans lequel le taux moyen d'apolipoprotéine E totale a été comparé entre les individus porteurs du génotype $\epsilon 2/\epsilon 3$ et les individus ayant pour génotype $\epsilon 2/\epsilon 4$. Pour cette comparaison, seuls les individus atteints de la maladie d'Alzheimer ont été étudiés. L'ensemble des valeurs mesurées est rassemblé dans le tableau suivant :

Tableau 36 : Taux d'apolipoprotéine E mesuré chez les patients atteints de la maladie d'Alzheimer et portant le génotype $\epsilon 2/\epsilon 3$ ou $\epsilon 2/\epsilon 4$.

Taux d'Apo E en $\mu\text{g} / \text{mL}$ (génotype $\epsilon 2/\epsilon 3$)	Taux d'Apo E en $\mu\text{g} / \text{mL}$ (génotype $\epsilon 2/\epsilon 4$)
92,5	79,8
75,6	42,2
94,8	73,3
71,9	100,8
65,2	73,1
76,1	62,6
74,4	72,5
79,3	75,3
78,2	67,9
59,0	59,4
83,2	77,7
	54,4
	77,5
	65,2
	47,7
	62,5
	48,8
	84,2
	57,0
	49,9

Dans un premier temps, l'utilitaire d'analyse détermine pour chaque groupe le nombre d'échantillons, la somme des valeurs de chaque échantillon, la moyenne pour chaque groupe ainsi que la variance. Ces valeurs sont alors listées pour aboutir au tableau suivant :

Tableau 37 : Première partie du rapport détaillé obtenu après utilisation de l'utilitaire d'analyse intitulé « analyse de variance : un facteur » sous Excel 2007.

RAPPORT DÉTAILLÉ				
Groupes	Nombre d'échantillons	Somme	Moyenne	Variance
ε2/ε3	11	850.2	77.3	110.4
ε2/ε4	20	1331.9	66.6	208.9

Ensuite, la variance entre les groupes est comparée à celle à l'intérieur de chaque groupe et les résultats sont donnés dans le tableau suivant :

Tableau 38 : Seconde partie du rapport détaillé obtenu après utilisation de l'utilitaire d'analyse intitulé « analyse de variance : un facteur » sous Excel 2007.

ANALYSE DE VARIANCE

Source des variations	Somme des carrés	Degré de liberté	Moyenne des carrés	F	Probabilité	Valeur critique pour F
Entre Groupes	812	1	812	4,64	0,040	4,18
A l'intérieur des groupes	5073	29	175			
Total	5885	30				

La somme des carrés des écarts (SCE) entre groupes est calculée par la formule suivante :

$SCE \text{ entre groupes} = \sum (\bar{x}_i - \bar{x})^2 \cdot n_i$ avec : i le nombre de groupes ; $\bar{x}_i$ la moyenne au sein du groupe i ; $\bar{x}$ la moyenne de tous les échantillons et n_i le nombre d'échantillons dans le groupe i .

Dans ce cas, $i = 2$; $\bar{x}_1 = 77,3$; $\bar{x}_2 = 66,6$; $\bar{x} = 70,4$; $n_1 = 11$ et $n_2 = 20$.

La SCE à l'intérieur des groupes est quant à elle calculée par la formule suivante :

$SCE \text{ intra groupe} = \sum \left(\sum_{j=1}^{n_i} (v_j - \bar{x}_i)^2 \right) (\bar{x}_i - \bar{x})^2 \cdot n_i$ avec : v_j la valeur de l'échantillon j dans le groupe i (par exemple, $v_1 = 92,5$ dans le groupe ε2/ε3 et $v_{20} = 49,9$ dans le groupe ε2/ε4).

Le nombre de degrés de liberté (ddl) entre groupes correspond au nombre de groupes moins un ($2 - 1 = 1$) quant au nombre de degrés de liberté à l'intérieur des groupes, il est donné par le nombre total d'échantillons moins deux ($11 + 20 - 2 = 29$).

Les moyennes des carrés sont calculées par les rapports suivants :

$$\text{Moyenne des carrés entre groupes} = \frac{SCE \text{ entre groupes}}{ddl \text{ entre groupes}}$$

$$\text{et Moyenne des carrés intra groupes} = \frac{SCE \text{ intra groupe}}{ddl \text{ intra groupe}}$$

Ensuite, la valeur de F est calculée par le ratio des deux valeurs précédentes :

$$F = \frac{\text{Moyenne des carrés entre groupes}}{\text{Moyenne des carrés intra groupe}}$$

Pour terminer, cette valeur de F est comparée à la valeur critique qui est donnée dans un tableau de Fisher-Snedecor tel que le suivant :

Tableau 39 : Tableau de Fisher-Snedecor pour un risque de 5%.

$v_1 \backslash v_2$	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
1	161,4	199,5	215,7	224,6	230,2	234,8	236,8	238,9	240,5	241,9
2	18,51	19,00	19,16	19,25	19,30	19,35	19,35	19,37	19,38	19,40
3	10,13	9,55	9,28	9,12	9,01	8,89	8,89	8,85	8,81	8,79
4	7,71	6,94	6,59	6,39	6,26	6,09	6,09	6,04	6,00	5,96
5	6,61	5,79	5,41	5,19	5,05	4,88	4,88	4,82	4,77	4,74
6	5,99	5,14	4,76	4,53	4,39	4,21	4,21	4,15	4,10	4,05
7	5,59	4,74	4,35	4,12	3,97	3,79	3,79	3,73	3,68	3,64
8	5,32	4,46	4,07	3,84	3,69	3,50	3,50	3,44	3,39	3,35
9	5,12	4,26	3,86	3,63	3,48	3,29	3,29	3,23	3,18	3,14
10	4,96	4,10	3,71	3,48	3,33	3,14	3,14	3,07	3,02	2,98
11	4,84	3,98	3,59	3,36	3,20	3,01	3,01	2,95	2,90	2,85
12	4,75	3,89	3,49	3,26	3,11	2,91	2,91	2,85	2,80	2,75
13	4,67	3,81	3,41	3,18	3,03	2,83	2,83	2,77	2,71	2,67
14	4,60	3,74	3,34	3,11	2,96	2,76	2,7	2,70	2,65	2,62
15	4,54	3,68	3,29	3,06	2,90	2,71	2,71	2,64	2,59	2,54
16	4,49	3,63	3,24	3,01	2,85	2,66	2,66	2,59	2,54	2,49
17	4,45	3,59	3,20	2,96	2,81	2,61	2,61	2,55	2,46	2,45
18	4,41	3,55	3,16	2,93	2,77	2,58	2,58	2,51	2,49	2,41
19	4,38	3,52	3,13	2,90	2,74	2,54	2,54	2,48	2,46	2,38
20	4,35	3,49	3,10	2,87	2,71	2,51	2,51	2,45	2,42	2,35
21	4,32	3,47	3,07	2,84	2,68	2,49	2,49	2,42	2,39	2,32
22	4,30	3,44	3,05	2,82	2,66	2,46	2,46	2,40	2,37	2,30
23	4,28	3,42	3,03	2,80	2,64	2,44	2,44	2,37	2,34	2,27
24	4,26	3,40	3,01	2,78	2,62	2,42	2,42	2,36	2,32	2,25
25	4,24	3,39	2,99	2,76	2,60	2,40	2,40	2,34	2,30	2,24
26	4,23	3,37	2,98	2,74	2,59	2,39	2,39	2,32	2,28	2,22
27	4,21	3,35	2,96	2,73	2,57	2,37	2,37	2,31	2,27	2,20
28	4,20	3,34	2,95	2,71	2,56	2,36	2,36	2,29	2,25	2,19
29	4,18	3,33	2,93	2,70	2,55	2,35	2,35	2,28	2,24	2,18
30	4,17	3,32	2,92	2,69	2,53	2,33	2,33	2,27	2,22	2,16

Dans ce tableau, v_1 et v_2 correspondent respectivement aux degrés de liberté entre groupes et à l'intérieur des groupes. La valeur critique de F est donc dans notre cas celle correspondant à $v_1 = 1$ et $v_2 = 29$ soit $F_{\text{critique}} = 4,18$.

Pour que les deux groupes soient significativement différents (avec un risque de 5%), il faut donc que la valeur observée de F soit supérieure à la valeur critique. Ici, $F_{\text{observée}} > F_{\text{critique}}$ donc les deux moyennes sont différentes. La probabilité indiquée (0,040) correspond au risque pour que les deux moyennes soient identiques. C'est cette valeur de probabilité qui a été reportée dans les chapitres précédents lorsqu'une ANOVA a été réalisée.

II) L'analyse en composantes principales

L'analyse en composantes principales (ACP) permet de traiter un ensemble de données contenant n paramètres caractérisant x échantillons. L'objectif de l'ACP est de résumer les variables initiales en un nombre de variables plus restreint et non corrélées entre elles. Ces nouvelles variables sont appelées les composantes principales et sont obtenues par combinaisons linéaires des variables initiales. Cette méthode permet de projeter les échantillons sur un plan (défini par les composantes principales) en fonction de leur proximité et également de projeter les variables initiales selon leurs corrélations. Le détail des calculs matriciels nécessaires pour réaliser une ACP n'étant pas l'objet de cette thèse, seuls les principaux résultats vont être présentés.

L'exemple suivant concerne les résultats décrits dans la Figure 73 page 182. Cette figure a été obtenue à partir des dosages réalisés sur les individus porteurs du génotype $\epsilon 3/\epsilon 3$ et pour lesquels l'ensemble des paramètres suivants étaient décrits : sexe, âge, SNP en position 427, 219 et 491. Ceci concerne donc 279 échantillons pour lesquels le taux d'Apo E totale a été mesuré. La première étape a consisté à coder les variables qualitatives (sexe et les trois SNP) en variables quantitatives. Pour le sexe, il n'y a que deux possibilités : homme ou femme. En revanche, pour les SNP, il existe trois variants pour chaque position : CC, TC ou TT en position 427 ; GG, GT ou TT en position 219 ; AA, AT ou TT en position 491. Pour réaliser l'ACP, les variables qualitatives ayant n niveaux (deux pour le sexe ou trois pour chaque SNP) ont été converties en $n-1$ variables quantitatives discrètes prenant pour valeur 0 ou 1. Ainsi, les valeurs suivantes ont été utilisées :

Tableau 40 : Valeurs des variables quantitatives discrètes utilisées.

Variable qualitative	Valeur	Nom variable quantitative	Valeur variable quantitative
Sexe	Homme		0
	Femme		1
SNP en position 427	CC	APOE427 A	0
		APOE427 B	0
	TC	APOE427 A	1
		APOE427 B	0
	TT	APOE427 A	0
		APOE427 B	1
	GG	APOE219 A	0
		APOE219 B	0
SNP en position 219	GT	APOE219 A	0
		APOE219 B	1
	TT	APOE219 A	1
		APOE219 B	0
	AA	APOE491 A	0
		APOE491 B	0
SNP en position 491	AT	APOE491 A	0
		APOE491 B	1
	TT	APOE491 A	1
		APOE491 B	0

Au total, neuf descripteurs ont donc été utilisés : les sept présentés dans le tableau précédent, l'âge et le taux d'Apo E totale mesuré. Les premiers résultats de l'ACP sont donnés sous forme d'un tableau présentant les corrélations entre les différentes variables :

Tableau 41 : Matrice des corrélations entre les variables utilisées pour l'ACP.

	Sexe	Age	APOE427 A	APOE427 B	APOE219 A	APOE219 B	APOE491 A	APOE491 B	Apo E
Sexe	1,0000	-0,1283	0,0603	-0,0507	-0,0028	-0,0014	-0,0484	-0,0043	-0,2446
Age	-0,1283	1,0000	0,0045	-0,0147	0,0585	-0,0513	-0,0689	0,0733	-0,0264
APOE427 A	0,0603	0,0045	1,0000	<u>-0,9827</u>	0,0145	0,0419	0,1404	-0,1119	-0,0702
APOE427 B	-0,0507	-0,0147	<u>-0,9827</u>	1,0000	-0,0344	-0,0308	-0,1366	0,1170	0,0450
APOE219 A	-0,0028	0,0585	0,0145	-0,0344	1,0000	-0,5222	0,1085	0,0384	-0,0571
APOE219 B	-0,0014	-0,0513	0,0419	-0,0308	-0,5222	1,0000	-0,0768	0,0892	-0,0649
APOE491 A	-0,0484	-0,0689	0,1404	-0,1366	0,1085	-0,0768	1,0000	-0,1023	0,0788
APOE491 B	-0,0043	0,0733	-0,1119	0,1170	0,0384	0,0892	-0,1023	1,0000	-0,1574
Apo E	-0,2446	-0,0264	-0,0702	0,0450	-0,0571	-0,0649	0,0788	-0,1574	1,0000

Ce tableau permet de voir quelles variables sont corrélées entre elles. Dans cet exemple, les variables APOE427 A et APOE427 B sont fortement corrélées. Ceci semble logique puisque dans la cohorte $\epsilon 3/\epsilon 3$ disponible, un seul échantillon possède la séquence nucléotidique CC en position 427. Ainsi, les autres échantillons n'ayant pas la séquence TT ont forcément la séquence TC. L'une de ces deux variables (APOE427 A ou APOE427 B) aurait donc pu être ôtée pour réaliser l'ACP. Ceci a d'ailleurs été réalisé mais les conclusions de l'analyse sont restées inchangées.

Pour connaître la part de variation expliquée par les composantes, il faut étudier le graphique des valeurs propres :

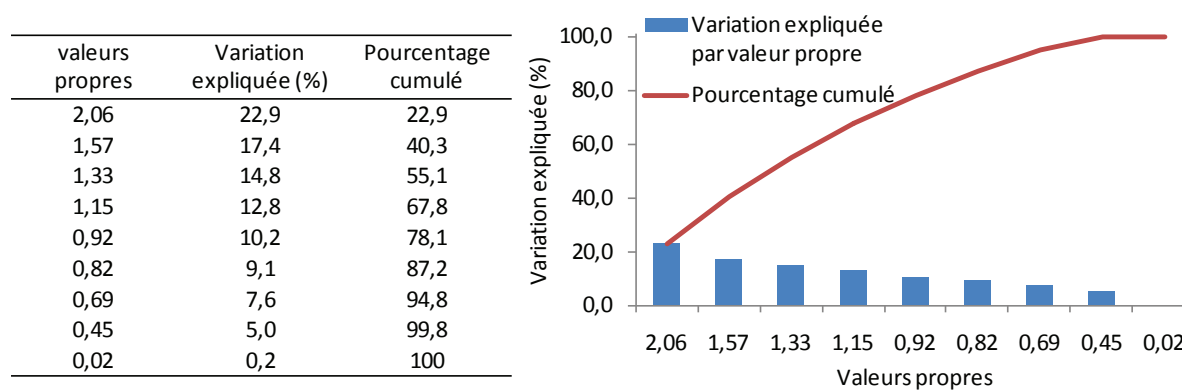


Figure 101 : Matrice des valeurs propres et graphique correspondant à cette matrice.

Ce tableau montre que la première composante permet d'expliquer 22,9 % de la variation totale. Ainsi, avec deux composantes, seulement 40,3 % de la variation totale va être expliquée.

Ensuite, chacune des variables est projetée sur le cercle unité :

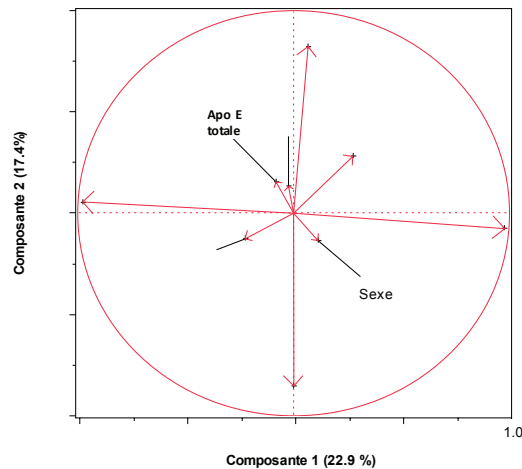


Figure 102 : Projection des variables sur le cercle unité.

Pour être bien représentée dans un plan, une variable doit être projetée près du cercle unité c'est-à-dire se situer à une distance du centre supérieure à 0,7. Lorsque deux variables bien représentées se projettent en des points voisins, elles sont positivement corrélées. Lorsqu'elles sont projetées en des points diamétralement opposées, elles sont négativement corrélées. Enfin, lorsqu'elles sont situées sur des droites orthogonales, elles sont indépendantes. Ainsi, ce graphique confirme que les variables APOE427 A et APOE427 B sont négativement corrélées (de même que les variables APOE219 A et APOE219 B) et montre que les SNP en position 219 et 427 sont indépendantes. Toutes les autres propriétés sont mal représentées et ne peuvent donc pas être utilisées lors de l'interprétation des résultats.

Ensuite, la matrice des facteurs est reportée dans un tableau :

Tableau 42 : Matrice des facteurs.

Variable	Composante n°								
	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Sexe	0,1122	-0,1344	0,5900	-0,5240	-0,2079	0,1904	0,5143	0,0517	-0,0002
Age	-0,0236	0,1327	0,0632	0,7743	-0,2378	0,5249	0,2144	0,0189	0,0008
APOE427 A	<u>0,9779</u>	-0,0762	0,0255	0,1174	-0,0202	-0,1179	0,0127	-0,0279	0,0912
APOE427 B	<u>-0,9769</u>	0,0556	-0,0112	-0,1278	0,0302	0,1270	-0,0242	0,0119	0,0910
APOE219 A	0,0672	<u>0,8230</u>	0,2831	0,0298	0,0588	-0,1318	-0,0730	0,4593	0,0022
APOE219 B	0,0012	<u>-0,8529</u>	-0,1151	0,0693	0,1730	0,1073	-0,0392	0,4600	0,0003
APOE491 A	0,2741	0,2801	-0,2907	-0,2545	0,6693	0,4898	0,0870	-0,0413	-0,0008
APOE491 B	-0,2249	-0,1269	0,4553	0,4179	0,5722	-0,3641	0,2868	-0,0958	-0,0003
Apo E	-0,0814	0,1543	-0,7678	0,0116	-0,0989	-0,2822	0,5297	0,0994	0,0025

Cette matrice permet de voir le poids de chaque variable pour chacune des composantes obtenues. Puisque très peu de variables sont bien représentées dans notre cas, les colonnes correspondant aux deux premières composantes peuvent être rapidement déduites. En effet, la première composante dépend de la SNP en position 427 alors que la deuxième dépend de celle en position 219.

Enfin, les individus peuvent être projetés sur le plan défini par les deux premières composantes :

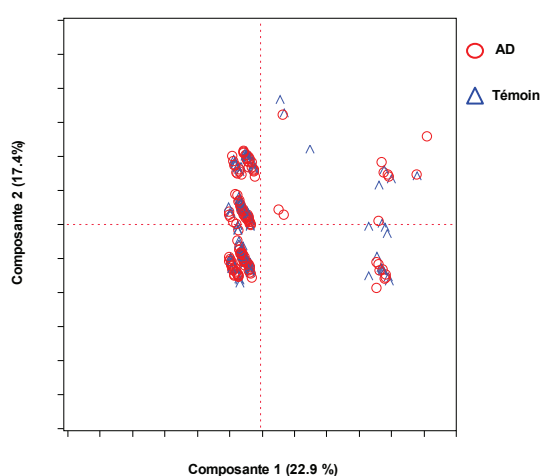


Figure 103 : Projection des individus sur le plan défini par les deux premières composantes.

Sur ce dernier graphique apparaît chacun des individus de l'étude : les témoins et les porteurs de la maladie d'Alzheimer sont représentés respectivement par des triangles bleus et des cercles rouges. Comme nous l'avons vu au paragraphe III.5.2) page 182 du chapitre III, aucune distinction n'est réalisée entre ces deux populations.

ANNEXE C : COMMUNICATIONS ECRITES ET ORALES.

I) Communications écrites

I.1) Publications dans des journaux à comité de lecture

1. **Simon, R.**; Jubeaux, G.; Chaumot, A.; Lemoine, J.; Geffard, O.; Salvador, A.,
Mass spectrometry assay as an alternative to the enzyme-linked immunosorbent assay test for biomarker quantitation in ecotoxicology: Application to vitellogenin in Crustacea (*Gammarus fossarum*).
J. Chromatogr. A **2010**, 1217 (31), 5109-5115.
2. Enjalbert, Q.; **Simon, R.**; Salvador, A.; Antoine, R.; Redon, S.; Ayhan, M. M.; Darbour, F.; Chambert, S.; Bretonniere, Y.; Dugourd, P.; Lemoine, J.,
Photo-SRM: laser-induced dissociation improves detection selectivity of selected reaction monitoring mode.
Rapid Commun. Mass Spectrom. **2011**, 25 (22), 3375-3381.
3. Jubeaux, G.; **Simon, R.**; Salvador, A.; Queau, H.; Chaumot, A.; Geffard, O.,
Vitellogenin-like proteins in the freshwater amphipod *Gammarus fossarum* (Koch, 1835): Functional characterization throughout reproductive process, potential for use as an indicator of oocyte quality and endocrine disruption biomarker in males.
Aquatic toxicology (Amsterdam, Netherlands) **2012**, 112-113, 72-82.
4. **Simon, R.** ; Girod, M. ; Fonbonne, C. ; Salvador, A. ; Clément, Y. ; Lanteri, P. ; Amouyel, P. ; Lambert, J.C. ; Lemoine, J.,
Total ApoE and ApoE4 isoform assays in an Alzheimer's disease case-control study (n = 669) by targeted mass spectrometry: a pilot assay for methionine-containing proteotypic peptides.
Mol. Cell. Proteomics **2012**, (soumis)
5. Jubeaux, G.; Audouard-Combe, F.; **Simon, R.**; Tutundjian, R.; Salvador, A.; Geffard, O.; Chaumot, A.,
Vitellogenin-like proteins among invertebrate species diversity: potential of proteomic mass spectrometry (LC-MS/MS) for biomarker development.
Environmental Science & Technology **2012**, (soumis).

6. Jubeaux, G.; **Simon, R.**; Salvador, A.; Lopes, C.; Lacaze, E.; Quéau, H.; Chaumot, A.; Geffard, O.,
Vitellogenin-like protein measurement in caged Gammarus fossarum males as a biomarker of endocrine disruptor exposure: inconclusive experience.
Aquatic Toxicology **2012**, (soumis).

I.2) Posters

1. **Simon, R.**; Jubeaux, G.; Geffard, O.; Lemoine, J.; Chaumot, A.; Salvador, A.,
La LC/MS/MS : une alternative aux méthodes ELISA pour le dosage de biomarqueurs en écotoxicologie. Application aux dosages de la VTG chez G. fossarum.
26èmes Journées Françaises de Spectrométrie de Masse à Dijon, Septembre 2009.
2. Jubeaux G., **Simon R.**, Salvador A., Lemoine J., Quéau H., Chaumot A., Geffard O.,
Vitellogenin quantification by LC/MS-MS in the freshwater amphipod Gammarus fossarum : development, characterisation et perspectives.
SETAC Europe Annual meeting, Séville, Espagne, Mai 2010.
3. **Simon, R.** ; Meseguer, C. ; Fonbonne, C. ; Lemoine, J. ; Salvador, A.,
Apport de la chromatographie d'interactions hydrophiles (HILIC) pour la quantification de biomarqueurs protéiques par spectrométrie de masse.
27èmes Journées Françaises de Spectrométrie de Masse à Clermont-Ferrand, Septembre 2010.
4. Jubeaux G., **Simon R.**, Chaumot A., Audouard-Combe F., Salvador A., Geffard O.,
Developing a method for vitellogenin quantification to investigate the reproductive investment in gammarids.
XIVth International Colloquium on Amphipoda, Séville, Espagne, Septembre 2010.
5. Jubeaux, G.; Audouard-Combe, F.; **Simon, R.**; Tutundjian, R.; Quéau, H. ; Salvador, A.; Chaumot, A. ; Geffard, O.,
Generalisation potency of mass spectrometry (LC-MS/MS); Case of vitellogenin biomarker in invertebrates.
SETAC (Society of Environmental Toxicology and Chemistry) Europe 21st Annual Meeting, Milan, Mai 2011.

6. Jubeaux G., **Simon R.**, Audouard-Combe F., Quéau H., Salvador A., Chaumot A., Geffard O.
Mesure de la vitellogénine par spectrométrie de masse (LC-MS/MS) chez un amphipode dulçaquicole, *Gammarus fossarum* : un biomarqueur potentiel de la perturbation endocrinienne.
SEFA, Paris-France, Juin 2011.

7. Jubeaux G., Audouard-Combe F., **Simon R.**, Tutundjian R., Quéau H., Salvador A., Chaumot A., Geffard O.,
Mesure de la vitellogénine chez les invertébrés : pertinence et application de la spectrométrie de masse (LC-MS/MS) en vue de proposer une méthode spécifique et transférable entre espèces.
SEFA, Paris-France, Juin 2011.

8. **Simon, R.**; Audouard-Combe, F.; Jubeaux, G.; Tutundjian, R.; Quéau, H. ; Garric, J. ; Geffard, O. ; Lemoine, J. ; Chaumot, A. ; Salvador, A.,
Measurement of vitellogenin protein in invertebrates: relevance and usefulness of mass spectrometry (LC-MS/MS) to propose a specific and transferable method across non sequenced species.
28èmes Journées Françaises de Spectrométrie de Masse à Avignon, Septembre 2011.

9. **Simon, R.** ; Fonbonne, C. ; Salvador, A. ; Amouyel, P. ; Lambert, J.C. ; Lemoine, J.,
Quantification of total Apo E and Apo E4 isoform by targeted mass spectrometry across a clinical cohort (n=680): a case study for SRM-based assay validation and methionine-containing proteotypic peptide.
28èmes Journées Françaises de Spectrométrie de Masse à Avignon, Septembre 2011.

10. **Simon, R.** ; Girod, M. ; Fonbonne, C. ; Salvador, A. ; Clément, Y. ; Lanteri, P. ; Amouyel, P. ; Lambert, J.C. ; Lemoine, J.,
Total Apolipoprotein E and Apolipoprotein E4 isoform assay (n=672) by targeted mass spectrometry: a pilot assay for methionine-containing proteotypic peptide.
60th ASMS Conference on Mass Spectrometry and Allied Topics, Vancouver, Canada, Mai 2012.

II) Communications orales

1. **Simon, R.** ; Meseguer, C. ; Fortin, T. ; Charrier, J.P. ; Lacoux, X. ; Salvador, A. ; Lemoine, J.,
Improved sensitivity of Selected Reaction Monitoring-based protein quantification by LC-MS/MS using methanol instead of acetonitrile as organic modifier.
27èmes Journées Françaises de Spectrométrie de Masse à Clermont-Ferrand, Septembre 2010.
2. **Simon, R.** ; Lemoine, J.; Enjalbert, Q.; Fonbonne, C.; Salvador, A.,
Apport de la chromatographie d'interactions hydrophiles (HILIC) pour la quantification de biomarqueurs protéiques par spectrométrie de masse.
XVI^{èmes} rencontres du Club des Jeunes de la SFSM à Pissos, Avril 2011.
3. Jubeaux G., **Simon R.**, Audouard-Combe F., Quéau H., Salvador A., Chaumot A., Garric J., Geffard O.,
Quantification of vitellogenin by mass spectrometry (LC-MS/MS) in the freshwater amphipod, *Gammarus fossarum* : a potential endocrine disruption biomarker.
SETAC Europe Annual meeting, Milan, Italie, Mai 2011.
4. Jubeaux G., Audouard-Combe F., **Simon R.**, Tutundjian R., Quéau H., Salvador A., Chaumot A., Garric J., Geffard O.,
Measurement of vitellogenin protein in invertebrates : relevance and usefulness of mass spectrometry (LC-MS/MS) to propose a specific and transferable method across species.
SETAC Europe Annual meeting, Milan, Italie, Mai 2011.
5. **Simon, R.** ; Fonbonne, C. ; Girod, M. ; Clément, Y. ; Lanteri, P. ; Amouyel, P. ; Lambert, J.C. ; Jaffuel, J. ; Enjalbert, Q. ; Fortin, T. ; Charrier, J.P. ; Choquet Kastylevsky, G.; Salvador, A. ; Lemoine, J.,
La quantification (absolue) des peptides/protéines par couplage chromatographie liquide – spectrométrie de masse MS-MS en mode SRM.
Formation Inserm à Paris, 30 Novembre 2011.
6. **Simon, R.** ; Fonbonne, C. ; Girod, M. ; Clément, Y. ; Lanteri, P. ; Amouyel, P. ; Lambert, J.C. ; Salvador, A. ; Lemoine, J.,
Total Apolipoprotein E and Apolipoprotein E4 isoform assay (n=672) by targeted mass spectrometry: a pilot assay for methionine-containing proteotypic peptide.
XVII^{èmes} rencontres du Club des Jeunes de la SFSM à La Bresse, Avril 2012.

7. **Simon, R.** ; Fonbonne, C. ; Girod, M. ; Clément, Y. ; Lanteri, P. ; Amouyel, P. ; Lambert, J.C. ; Salvador, A. ; Lemoine, J.,
La quantification ciblée de protéines et peptides par chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse en tandem : développements analytiques et applications.
Road show Mini EC/MS/MS AB Sciex, Paris, 6 Juin 2012.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. Cummings, J.; Unwin, R.; Veenstra, T. D., Quantitative analysis of biomarkers by LC-MS/MS Preface. *Journal of Chromatography B-Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences* **2009**, 877 (13), 1221-1221.
2. Issaq, H. J.; Blonder, J., Electrophoresis and liquid chromatography/tandem mass spectrometry in disease biomarker discovery. *Journal of Chromatography B-Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences* **2009**, 877 (13), 1222-1228.
3. Nakayama, M.; Gonzalgo, M. L.; Yegnasubramanian, S.; Lin, X. H.; De Marzo, A. M.; Nelson, W. G., GSTP1 CpG island hypermethylation as a molecular biomarker for prostate cancer. *J. Cell. Biochem.* **2004**, 91 (3), 540-552.
4. Griffin, J. L.; Shockcor, J. P., Metabolic profiles of cancer cells. *Nat. Rev. Cancer* **2004**, 4 (7), 551-561.
5. Rifai, N.; Gillette, M. A.; Carr, S. A., Protein biomarker discovery and validation: the long and uncertain path to clinical utility. *Nat. Biotechnol.* **2006**, 24 (8), 971-983.
6. Ofarrell, P. H., HIGH-RESOLUTION 2-DIMENSIONAL ELECTROPHORESIS OF PROTEINS. *J. Biol. Chem.* **1975**, 250 (10), 4007-4021.
7. Boja, E.; Hiltke, T.; Rivers, R.; Kinsinger, C.; Rahbar, A.; Mesri, M.; Rodriguez, H., Evolution of Clinical Proteomics and its Role in Medicine. *J. Proteome Res.* **2011**, 10 (1), 66-84.
8. Righetti, P. G.; Candiano, G., Recent advances in electrophoretic techniques for the characterization of protein biomolecules: A poker of aces. *J. Chromatogr. A* **2011**, 1218 (49), 8727-8737.
9. Engvall, E.; Perlmann, P., ENZYME-LINKED IMMUNOSORBENT ASSAY (ELISA) QUANTITATIVE ASSAY OF IMMUNOGLOBULIN-G. *Immunochemistry* **1971**, 8 (9), 871-&.
10. van Weemen.Bk; Schuurs, A. H. W., IMMUNOASSAY USING HAPTEN-ENZYME CONJUGATES. *FEBS Lett.* **1972**, 24 (1), 77-&.
11. Whiteaker, J. R.; Lin, C. W.; Kennedy, J.; Hou, L. M.; Trute, M.; Sokal, I.; Yan, P.; Schoenherr, R. M.; Zhao, L.; Voytovich, U. J.; Kelly-Spratt, K. S.; Krasnoselsky, A.; Gafken, P. R.; Hogan, J. M.; Jones, L. A.; Wang, P.; Amon, L.; Chodosh, L. A.; Nelson, P. S.; McIntosh, M. W.; Kemp, C. J.; Paulovich, A. G., A targeted proteomics-based pipeline for verification of biomarkers in plasma. *Nat. Biotechnol.* **2011**, 29 (7), 625-U108.
12. Makawita, S.; Diamandis, E. P., The Bottleneck in the Cancer Biomarker Pipeline and Protein Quantification through Mass Spectrometry-Based Approaches: Current Strategies for Candidate Verification. *Clin. Chem.* **2010**, 56 (2), 212-222.
13. Rawlins, M. L.; Roberts, W. L., Performance characteristics of six third-generation assays for thyroid-stimulating hormone. *Clin. Chem.* **2004**, 50 (12), 2338-2344.
14. Taylor, B. S.; Pal, M.; Yu, J. J.; Laxman, B.; Kalyana-Sundararri, S.; Zhao, R.; Menon, A.; Wei, J. T.; Nesvizhskii, A. I.; Ghosh, D.; Omenn, G. S.; Lubman, D. M.; Chinnaiyan, A. M.; Sreekumar, A., Humoral response profiling reveals pathways to prostate cancer progression. *Mol. Cell. Proteomics* **2008**, 7 (3), 600-611.
15. Preissner, C. M.; O'Kane, D. J.; Singh, R. J.; Morris, J. C.; Grebe, S. K. G., Phantoms in the assay tube: Heterophile antibody interferences in serum thyroglobulin assays. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **2003**, 88 (7), 3069-3074.
16. Fleseriu, M.; Lee, M.; Pineyro, M. M.; Skugor, M.; Reddy, S. K.; Siraj, E. S.; Hamrahian, A. H., Giant invasive pituitary prolactinoma with falsely low serum prolactin: the significance of 'hook effect'. *J. Neuro-Oncol.* **2006**, 79 (1), 41-43.
17. Fortin, T.; Salvador, A.; Charrier, J. P.; Lenz, C.; Lacoux, X.; Morla, A.; Choquet-Kastylevsky, G.; Lemoine, J., Clinical Quantitation of Prostate-specific Antigen Biomarker in the Low Nanogram/Milliliter Range by Conventional Bore Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry (Multiple Reaction Monitoring) Coupling and Correlation with ELISA Tests. *Mol. Cell. Proteomics* **2009**, 8 (5), 1006-1015.

18. Norrgran, J.; Williams, T. L.; Woolfitt, A. R.; Solano, M. I.; Pirkle, J. L.; Barr, J. R., Optimization of digestion parameters for protein quantification. *Anal. Biochem.* **2009**, *393* (1), 48-55.
19. Lopez-Ferrer, D.; Heibeck, T. H.; Petritis, K.; Hixson, K. K.; Qian, W.; Monroe, M. E.; Mayampurath, A.; Moore, R. J.; Belov, M. E.; Camp, D. G.; Smith, R. D., Rapid sample processing for LC-MS-based quantitative proteomics using high intensity focused ultrasound. *J. Proteome Res.* **2008**, *7* (9), 3860-3867.
20. Proc, J. L.; Kuzyk, M. A.; Hardie, D. B.; Yang, J.; Smith, D. S.; Jackson, A. M.; Parker, C. E.; Borchers, C. H., A Quantitative Study of the Effects of Chaotropic Agents, Surfactants, and Solvents on the Digestion Efficiency of Human Plasma Proteins by Trypsin. *J. Proteome Res.* **2010**, *9* (10), 5422-5437.
21. Lopez-Ferrer, D.; Petritis, K.; Hixson, K. K.; Heibeck, T. H.; Moore, R. J.; Belov, M. E.; Camp, D. G.; Smith, R. D., Application of pressurized solvents for ultrafast trypsin hydrolysis in proteomics: Proteomics on the fly. *J. Proteome Res.* **2008**, *7* (8), 3276-3281.
22. Havlis, J.; Thomas, H.; Sebela, M.; Shevchenko, A., Fast-response proteomics by accelerated in-gel digestion of proteins. *Analytical Chemistry* **2003**, *75* (6), 1300-1306.
23. Dempster, A. J., A new method of positive ray analysis. *Phys. Rev.* **1918**, *11* (4), 316-325.
24. Munson, M. S. B.; Field, F. H., CHEMICAL IONIZATION MASS SPECTROMETRY .I. GENERAL INTRODUCTION. *J. Am. Chem. Soc.* **1966**, *88* (12), 2621-&.
25. Karas, M.; Hillenkamp, F., LASER DESORPTION IONIZATION OF PROTEINS WITH MOLECULAR MASSES EXCEEDING 10000 DALTONS. *Analytical Chemistry* **1988**, *60* (20), 2299-2301.
26. Caprioli, R. M.; Farmer, T. B.; Zhang, H. Y.; Stoeckli, M., Molecular imaging of biological samples by MALDI MS. *Abstr. Pap. Am. Chem. Soc.* **1997**, *214*, 113-ANYL.
27. Dole, M.; Mack, L. L.; Hines, R. L., MOLECULAR BEAMS OF MACROIONS. *J. Chem. Phys.* **1968**, *49* (5), 2240-&.
28. Yamashita, M.; Fenn, J. B., ELECTROSPRAY ION-SOURCE - ANOTHER VARIATION ON THE FREE-JET THEME. *J. Phys. Chem.* **1984**, *88* (20), 4451-4459.
29. Fenn, J. B.; Mann, M.; Meng, C. K.; Wong, S. F.; Whitehouse, C. M., ELECTROSPRAY IONIZATION FOR MASS-SPECTROMETRY OF LARGE BIOMOLECULES. *Science* **1989**, *246* (4926), 64-71.
30. Nguyen, H. P.; Schug, K. A., The advantages of ESI-MS detection in conjunction with HILIC mode separations: Fundamentals and applications. *J. Sep. Sci.* **2008**, *31* (9), 1465-1480.
31. Cech, N. B.; Enke, C. G., Practical implications of some recent studies in electrospray ionization fundamentals. *Mass Spectrom. Rev.* **2001**, *20* (6), 362-387.
32. Iribarne, J. V.; Thomson, B. A., On the evaporation of small ions from charged droplets. *J. Chem. Phys.* **1976**, *64* (6), 2287-2294.
33. Thomson, B. A.; Iribarne, J. V., FIELD-INDUCED ION EVAPORATION FROM LIQUID SURFACES AT ATMOSPHERIC-PRESSURE. *J. Chem. Phys.* **1979**, *71* (11), 4451-4463.
34. Iavarone, A. T.; Williams, E. R., Mechanism of charging and supercharging molecules in electrospray ionization. *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125* (8), 2319-2327.
35. Paul, W.; Steinwedel, H., *EIN NEUES MASSENSPEKTROMETER OHNE MAGNETFELD. *Z. Naturfors. Sect. A-J. Phys. Sci.* **1953**, *8* (7), 448-450.
36. March, R. E., QUADRUPOLE ION TRAPS. *Mass Spectrom. Rev.* **2009**, *28* (6), 961-989.
37. Huttenhain, R.; Malmstrom, J.; Picotti, P.; Aebersold, R., Perspectives of targeted mass spectrometry for protein biomarker verification. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2009**, *13* (5-6), 518-525.
38. Fortin, T.; Salvador, A.; Charrier, J. P.; Lenz, C.; Bettsworth, F.; Lacoux, X.; Choquet-Kastylevsky, G.; Lemoine, J., Multiple Reaction Monitoring Cubed for Protein Quantification at the Low Nanogram/Milliliter Level in Nondepleted Human Serum. *Analytical Chemistry* **2009**, *81* (22), 9343-9352.
39. Silva, J. C.; Denny, R.; Dorschel, C.; Gorenstein, M. V.; Li, G. Z.; Richardson, K.; Wall, D.; Geromanos, S. J., Simultaneous qualitative and quantitative analysis of the Escherichia coli Proteome - A sweet tale. *Mol. Cell. Proteomics* **2006**, *5* (4), 589-607.

40. Rappsilber, J.; Ryder, U.; Lamond, A. I.; Mann, M., Large-scale proteomic analysis of the human spliceosome. *Genome Res.* **2002**, *12* (8), 1231-1245.
41. Ishihama, Y.; Oda, Y.; Tabata, T.; Sato, T.; Nagasu, T.; Rappsilber, J.; Mann, M., Exponentially modified protein abundance index (emPAI) for estimation of absolute protein amount in proteomics by the number of sequenced peptides per protein. *Mol. Cell. Proteomics* **2005**, *4* (9), 1265-1272.
42. Lu, P.; Vogel, C.; Wang, R.; Yao, X.; Marcotte, E. M., Absolute protein expression profiling estimates the relative contributions of transcriptional and translational regulation. *Nat. Biotechnol.* **2007**, *25* (1), 117-124.
43. Florens, L.; Carozza, M. J.; Swanson, S. K.; Fournier, M.; Coleman, M. K.; Workman, J. L.; Washburn, M. P., Analyzing chromatin remodeling complexes using shotgun proteomics and normalized spectral abundance factors. *Methods* **2006**, *40* (4), 303-311.
44. Neilson, K. A.; Ali, N. A.; Muralidharan, S.; Mirzaei, M.; Mariani, M.; Assadourian, G.; Lee, A.; van Sluyter, S. C.; Haynes, P. A., Less label, more free: Approaches in label-free quantitative mass spectrometry. *Proteomics* **2011**, *11* (4), 535-553.
45. Oda, Y.; Huang, K.; Cross, F. R.; Cowburn, D.; Chait, B. T., Accurate quantitation of protein expression and site-specific phosphorylation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1999**, *96* (12), 6591-6596.
46. Ong, S. E.; Blagoev, B.; Kratchmarova, I.; Kristensen, D. B.; Steen, H.; Pandey, A.; Mann, M., Stable isotope labeling by amino acids in cell culture, SILAC, as a simple and accurate approach to expression proteomics. *Mol. Cell. Proteomics* **2002**, *1* (5), 376-386.
47. Yao, X. D.; Freas, A.; Ramirez, J.; Demirev, P. A.; Fenselau, C., Proteolytic O-18 labeling for comparative proteomics: Model studies with two serotypes of adenovirus. *Analytical Chemistry* **2001**, *73* (13), 2836-2842.
48. Zhang, X. L.; Jin, Q. K.; Carr, S. A.; Annan, R. S., N-Terminal peptide labeling strategy for incorporation of isotopic tags: a method for the determination of site-specific absolute phosphorylation stoichiometry. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* **2002**, *16* (24), 2325-2332.
49. Munchbach, M.; Quadroni, M.; Miotto, G.; James, P., Quantitation and facilitated de novo sequencing of proteins by isotopic N-terminal labeling of peptides with a fragmentation directing moiety. *Analytical Chemistry* **2000**, *72* (17), 4047-4057.
50. Schmidt, A.; Kellermann, J.; Lottspeich, F., A novel strategy for quantitative proteomics using isotope-coded protein labels. *Proteomics* **2005**, *5* (1), 4-15.
51. DeSouza, L. V.; Taylor, A. M.; Li, W.; Minkoff, M. S.; Romaschin, A. D.; Colgan, T. J.; Siu, K. W. M., Multiple reaction monitoring of mTRAQ-labeled peptides enables absolute quantification of endogenous levels of a potential cancer marker in cancerous and normal endometrial tissues. *J. Proteome Res.* **2008**, *7* (8), 3525-3534.
52. Thompson, A.; Schafer, J.; Kuhn, K.; Kienle, S.; Schwarz, J.; Schmidt, G.; Neumann, T.; Hamon, C., Tandem mass tags: A novel quantification strategy for comparative analysis of complex protein mixtures by MS/MS. *Analytical Chemistry* **2003**, *75* (8), 1895-1904.
53. Ross, P. L.; Huang, Y. L. N.; Marchese, J. N.; Williamson, B.; Parker, K.; Hattan, S.; Khainovski, N.; Pillai, S.; Dey, S.; Daniels, S.; Purkayastha, S.; Juhasz, P.; Martin, S.; Bartlett-Jones, M.; He, F.; Jacobson, A.; Pappin, D. J., Multiplexed protein quantitation in *Saccharomyces cerevisiae* using amine-reactive isobaric tagging reagents. *Mol. Cell. Proteomics* **2004**, *3* (12), 1154-1169.
54. Gygi, S. P.; Rist, B.; Gerber, S. A.; Turecek, F.; Gelb, M. H.; Aebersold, R., Quantitative analysis of complex protein mixtures using isotope-coded affinity tags. *Nat. Biotechnol.* **1999**, *17* (10), 994-999.
55. Ong, S. E.; Foster, L. J.; Mann, M., Mass spectrometric-based approaches in quantitative proteomics. *Methods* **2003**, *29* (2), 124-130.
56. Hansen, K. C.; Schmitt-Ulms, G.; Chalkley, R. J.; Hirsch, J.; Baldwin, M. A.; Burlingame, A. L., Mass spectrometric analysis of protein mixtures at low levels using cleavable C-13-isotope-coded affinity tag and multidimensional chromatography. *Mol. Cell. Proteomics* **2003**, *2* (5), 299-314.

57. Li, J. X.; Steen, H.; Gygi, S. P., Protein profiling with cleavable isotope-coded affinity tag (cICAT) reagents - The yeast salinity stress response. *Mol. Cell. Proteomics* **2003**, 2 (11), 1198-1204.
58. Zhou, H. L.; Ranish, J. A.; Watts, J. D.; Aebersold, R., Quantitative proteome analysis by solid-phase isotope tagging and mass spectrometry. *Nat. Biotechnol.* **2002**, 20 (5), 512-515.
59. Qiu, Y. C.; Sousa, E. A.; Hewick, R. M.; Wang, J. H., Acid-labile isotope-coded extractants: A class of reagents for quantitative mass spectrometric analysis of complex protein mixtures. *Analytical Chemistry* **2002**, 74 (19), 4969-4979.
60. Olsen, J. V.; Andersen, J. R.; Nielsen, P. A.; Nielsen, M. L.; Figeys, D.; Mann, M.; Wisniewski, J. R., HysTag - A novel proteomic quantification tool applied to differential display analysis of membrane proteins from distinct areas of mouse brain. *Mol. Cell. Proteomics* **2004**, 3 (1), 82-92.
61. Gerber, S. A.; Rush, J.; Stemman, O.; Kirschner, M. W.; Gygi, S. P., Absolute quantification of proteins and phosphoproteins from cell lysates by tandem MS. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2003**, 100 (12), 6940-6945.
62. Beynon, R. J.; Doherty, M. K.; Pratt, J. M.; Gaskell, S. J., Multiplexed absolute quantification in proteomics using artificial QCAT proteins of concatenated signature peptides. *Nat. Methods* **2005**, 2 (8), 587-589.
63. Kito, K.; Ota, K.; Fujita, T.; Ito, T., A synthetic protein approach toward accurate mass spectrometric quantification of component stoichiometry of multiprotein complexes. *J. Proteome Res.* **2007**, 6 (2), 792-800.
64. Brun, V.; Dupuis, A.; Adrait, A.; Marcellin, M.; Thomas, D.; Court, M.; Vandenesch, F.; Garin, J., Isotope-labeled protein standards. *Mol. Cell. Proteomics* **2007**, 6 (12), 2139-2149.
65. Gallien, S.; Duriez, E.; Domon, B., Selected reaction monitoring applied to proteomics. *J. Mass Spectrom.* **2011**, 46 (3), 298-312.
66. Li, F.; Schmerberg, C. M.; Ji, Q. C., Accelerated tryptic digestion of proteins in plasma for absolute quantitation using a protein internal standard by liquid chromatography/tandem mass spectrometry. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* **2009**, 23 (5), 729-732.
67. Anderson, N. L.; Anderson, N. G., The human plasma proteome - History, character, and diagnostic prospects. *Mol. Cell. Proteomics* **2002**, 1 (11), 845-867.
68. Keshishian, H.; Addona, T.; Burgess, M.; Kuhn, E.; Carr, S. A., Quantitative, multiplexed assays for low abundance proteins in plasma by targeted mass spectrometry and stable isotope dilution. *Mol. Cell. Proteomics* **2007**, 6 (12), 2212-2229.
69. Kebarle, P.; Tang, L., FROM IONS IN SOLUTION TO IONS IN THE GAS-PHASE - THE MECHANISM OF ELECTROSPRAY MASS-SPECTROMETRY. *Analytical Chemistry* **1993**, 65 (22), A972-A986.
70. Jessome, L. L.; Volmer, D. A., Ion suppression: A major concern in mass spectrometry. *Lc Gc N. Am.* **2006**, 24 (5), 498-+.
71. Antignac, J. P.; de Wasch, K.; Monteau, F.; De Brabander, H.; Andre, F.; Le Bizec, B., The ion suppression phenomenon in liquid chromatography-mass spectrometry and its consequences in the field of residue. *Anal. Chim. Acta* **2005**, 529 (1-2), 129-136.
72. King, R.; Bonfiglio, R.; Fernandez-Metzler, C.; Miller-Stein, C.; Olah, T., Mechanistic investigation of ionization suppression in electrospray ionization. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **2000**, 11 (11), 942-950.
73. Bonfiglio, R.; King, R. C.; Olah, T. V.; Merkle, K., The effects of sample preparation methods on the variability of the electrospray ionization response for model drug compounds. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* **1999**, 13 (12), 1175-1185.
74. Truffelli, H.; Palma, P.; Famiglini, G.; Cappiello, A., AN OVERVIEW OF MATRIX EFFECTS IN LIQUID CHROMATOGRAPHY-MASS SPECTROMETRY. *Mass Spectrom. Rev.* **2011**, 30 (3), 491-509.
75. Matuszewski, B. K.; Constanzer, M. L.; Chavez-Eng, C. M., Strategies for the assessment of matrix effect in quantitative bioanalytical methods based on HPLC-MS/MS. *Analytical Chemistry* **2003**, 75 (13), 3019-3030.

76. Matuszewski, B. K., Standard line slopes as a measure of a relative matrix effect in quantitative HPLC-MS bioanalysis. *Journal of Chromatography B-Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences* **2006**, 830 (2), 293-300.
77. Desiere, F.; Deutsch, E. W.; King, N. L.; Nesvizhskii, A. I.; Mallick, P.; Eng, J.; Chen, S.; Eddes, J.; Loevenich, S. N.; Aebersold, R., The PeptideAtlas project. *Nucleic Acids Res.* **2006**, 34, D655-D658.
78. Agger, S. A.; Marney, L. C.; Hoofnagle, A. N., Simultaneous Quantification of Apolipoprotein A-I and Apolipoprotein B by Liquid-Chromatography-Multiple-Reaction-Monitoring Mass Spectrometry. *Clin. Chem.* **2010**, 56 (12), 1804-1813.
79. Bordeerat, N. K.; Georgieva, N. I.; Klapper, D. G.; Collins, L. B.; Cross, T. J.; Borchers, C. H.; Swenberg, J. A.; Boysen, G., Accurate quantitation of standard peptides used for quantitative proteomics. *Proteomics* **2009**, 9 (15), 3939-3944.
80. Barr, J. R.; Maggio, V. L.; Patterson, D. G.; Cooper, G. R.; Henderson, L. O.; Turner, W. E.; Smith, S. J.; Hannon, W. H.; Needham, L. L.; Sampson, E. J., Isotope dilution mass spectrometric quantification of specific proteins: Model application with apolipoprotein A-I. *Clin. Chem.* **1996**, 42 (10), 1676-1682.
81. Anderson, L.; Hunter, C. L., Quantitative mass spectrometric multiple reaction monitoring assays for major plasma proteins. *Mol. Cell. Proteomics* **2006**, 5 (4), 573-588.
82. Williams, D. K.; Muddiman, D. C., Absolute Quantification of C-Reactive Protein in Human Plasma Derived from Patients with Epithelial Ovarian Cancer Utilizing Protein Cleavage Isotope Dilution Mass Spectrometry. *J. Proteome Res.* **2009**, 8 (2), 1085-1090.
83. Chen, Y. Y.; Lin, S. Y.; Yeh, Y. Y.; Hsiao, H. H.; Wu, C. Y.; Chen, S. T.; Wang, A. H. J., A modified protein precipitation procedure for efficient removal of albumin from serum. *Electrophoresis* **2005**, 26 (11), 2117-2127.
84. McKay, M. J.; Sherman, J.; Laver, M. T.; Baker, M. S.; Clarke, S. J.; Molloy, M. P., The development of multiple reaction monitoring assays for liver-derived plasma proteins. *Proteom. Clin. Appl.* **2007**, 1 (12), 1570-1581.
85. Lin, S. H.; Shaler, T. A.; Becker, C. H., Quantification of intermediate-abundance proteins in serum by multiple reaction monitoring mass spectrometry in a single-quadrupole ion trap. *Analytical Chemistry* **2006**, 78 (16), 5762-5767.
86. Whiteaker, J. R.; Zhao, L.; Zhang, H. Y.; Feng, L. C.; Piening, B. D.; Anderson, L.; Paulovich, A. G., Antibody-based enrichment of peptides for mass-spectrometry-based quantification on magnetic beads of serum biomarkers. *Anal. Biochem.* **2007**, 362 (1), 44-54.
87. Whiteaker, J. R.; Zhang, H. D.; Eng, J. K.; Fang, R. H.; Piening, B. D.; Feng, L. C.; Lorentzen, T. D.; Schoenherr, R. M.; Keane, J. F.; Holzman, T.; Fitzgibbon, M.; Lin, C. W.; Zhang, H.; Cooke, K.; Liu, T.; Camp, D. G.; Anderson, L.; Watts, J.; Smith, R. D.; McIntosh, M. W.; Paulovich, A. G., Head-to-head comparison of serum fractionation techniques. *J. Proteome Res.* **2007**, 6 (2), 828-836.
88. Liu, T.; Qian, W. J.; Mottaz, H. M.; Gritsenko, M. A.; Norbeck, A. D.; Moore, R. J.; Purvine, S. O.; Camp, D. G.; Smith, R. D., Evaluation of multiprotein immunoaffinity subtraction for plasma proteomics and candidate biomarker discovery using mass spectrometry. *Mol. Cell. Proteomics* **2006**, 5 (11), 2167-2174.
89. Keshishian, H.; Addona, T.; Burgess, M.; Mani, D. R.; Shi, X.; Kuhn, E.; Sabatine, M. S.; Gerszten, R. E.; Carr, S. A., Quantification of Cardiovascular Biomarkers in Patient Plasma by Targeted Mass Spectrometry and Stable Isotope Dilution. *Mol. Cell. Proteomics* **2009**, 8 (10), 2339-2349.
90. Tu, C. J.; Rudnick, P. A.; Martinez, M. Y.; Cheek, K. L.; Stein, S. E.; Slebos, R. J. C.; Liebler, D. C., Depletion of Abundant Plasma Proteins and Limitations of Plasma Proteomics. *J. Proteome Res.* **2010**, 9 (10), 4982-4991.
91. Bjorhall, K.; Miliotis, T.; Davidsson, P., Comparison of different depletion strategies for improved resolution in proteomic analysis of human serum samples. *Proteomics* **2005**, 5 (1), 307-317.
92. Gundry, R. L.; Fu, Q.; Jelinek, C. A.; Van Eyk, J. E.; Cotter, R. J., Investigation of an albumin-enriched fraction of human serum and its albuminome. *Proteom. Clin. Appl.* **2007**, 1 (1), 73-88.

93. Kuhn, E.; Wu, J.; Karl, J.; Liao, H.; Zolg, W.; Guild, B., Quantification of C-reactive protein in the serum of patients with rheumatoid arthritis using multiple reaction monitoring mass spectrometry and C-13-labeled peptide standards. *Proteomics* **2004**, *4* (4), 1175-1186.
94. Hoofnagle, A. N.; Becker, J. O.; Wener, M. H.; Heinecke, J. W., Quantification of Thyroglobulin, a Low-Abundance Serum Protein, by Immunoaffinity Peptide Enrichment and Tandem Mass Spectrometry. *Clin. Chem.* **2008**, *54* (11), 1796-1804.
95. Tirumalai, R. S.; Chan, K. C.; Prieto, D. A.; Issaq, H. J.; Conrads, T. P.; Veenstra, T. D., Characterization of the low molecular weight human serum proteome. *Mol. Cell. Proteomics* **2003**, *2* (10), 1096-1103.
96. Terracciano, R.; Gaspari, M.; Testa, F.; Pasqua, L.; Tagliaferri, P.; Cheng, M. M. C.; Nijdam, A. J.; Petricoin, E. F.; Liotta, L. A.; Cuda, G.; Ferrari, M.; Venuta, S., Selective binding and enrichment for low-molecular weight biomarker molecules in human plasma after exposure to nanoporous silica particles. *Proteomics* **2006**, *6* (11), 3243-3250.
97. Callipo, L.; Caruso, G.; Foglia, P.; Gubbiotti, R.; Samperi, R.; Lagana, A., Immunoprecipitation on magnetic beads and liquid chromatography-tandem mass spectrometry for carbonic anhydrase II quantification in human serum. *Anal. Biochem.* **2010**, *400* (2), 195-202.
98. Kumar, V.; Barnidge, D. R.; Chen, L. S.; Twentyman, J. M.; Cradic, K. W.; Grebe, S. K.; Singh, R. J., Quantification of Serum 1-84 Parathyroid Hormone in Patients with Hyperparathyroidism by Immunocapture In Situ Digestion Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry. *Clin. Chem.* **2010**, *56* (2), 306-313.
99. Winther, B.; Nordlund, M.; Paus, E.; Reubsaet, L.; Halvorsen, T. G., Immuno-capture as ultimate sample cleanup in LC-MS/MS determination of the early stage biomarker ProGRP. *J. Sep. Sci.* **2009**, *32* (17), 2937-2943.
100. Winther, B.; Moi, P.; Nordlund, M. S.; Lunder, N.; Paus, E.; Reubsaet, J. L. E., Absolute ProGRP quantification in a clinical relevant concentration range using LC-MS/MS and a comprehensive internal standard. *Journal of Chromatography B-Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences* **2009**, *877* (13), 1359-1365.
101. Dubois, M.; Fenaille, F.; Clement, G.; Lechmann, M.; Tabet, J. C.; Ezan, E.; Becher, F., Immunopurification and mass spectrometric quantification of the active form of a chimeric therapeutic antibody in human serum. *Analytical Chemistry* **2008**, *80* (5), 1737-1745.
102. Ho, E. N. M.; Wan, T. S. M.; Wong, A. S. Y.; Lam, K. K. H.; Stewart, B. D., Doping control analysis of insulin and its analogues in equine plasma by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *J. Chromatogr. A* **2008**, *1201* (2), 183-190.
103. Anderson, N. L.; Anderson, N. G.; Haines, L. R.; Hardie, D. B.; Olafson, R. W.; Pearson, T. W., Mass spectrometric quantitation of peptides and proteins using stable isotope standards and capture by anti-peptide antibodies (SISCAPA). *J. Proteome Res.* **2004**, *3* (2), 235-244.
104. Whiteaker, J. R.; Zhang, H.; Zhao, L.; Wang, P.; Kelly-Spratt, K. S.; Ivey, R. G.; Piening, B. D.; Feng, L. C.; Kasarda, E.; Gurley, K. E.; Eng, J. K.; Chodosh, L. A.; Kemp, C. J.; McIntosh, M. W.; Paulovich, A. G., Integrated pipeline for mass spectrometry-based discovery and confirmation of biomarkers demonstrated in a mouse model of breast cancer. *J. Proteome Res.* **2007**, *6* (10), 3962-3975.
105. Kuhn, E.; Addona, T.; Keshishian, H.; Burgess, M.; Mani, D. R.; Lee, R. T.; Sabatine, M. S.; Gerszten, R. E.; Carr, S. A., Developing Multiplexed Assays for Troponin I and Interleukin-33 in Plasma by Peptide Immunoaffinity Enrichment and Targeted Mass Spectrometry. *Clin. Chem.* **2009**, *55* (6), 1108-1117.
106. Ahn, Y. H.; Lee, J. Y.; Kim, Y. S.; Ko, J. H.; Yoo, J. S., Quantitative Analysis of an Aberrant Glycoform of TIMP1 from Colon Cancer Serum by L-PHA-Enrichment and SISCAPA with MRM Mass Spectrometry. *J. Proteome Res.* **2009**, *8* (9), 4216-4224.

107. Anderson, N. L.; Jackson, A.; Smith, D.; Hardie, D.; Borchers, C.; Pearson, T. W., SISCAPA Peptide Enrichment on Magnetic Beads Using an In-line Bead Trap Device. *Mol. Cell. Proteomics* **2009**, *8* (5), 995-1005.
108. Whiteaker, J. R.; Zhao, L.; Anderson, L.; Paulovich, A. G., An Automated and Multiplexed Method for High Throughput Peptide Immunoaffinity Enrichment and Multiple Reaction Monitoring Mass Spectrometry-based Quantification of Protein Biomarkers. *Mol. Cell. Proteomics* **2010**, *9* (1), 184-196.
109. Jiang, J.; Parker, C. E.; Hoadley, K. A.; Perou, C. M.; Boysen, G.; Borchers, C. H., Development of an immuno tandem mass spectrometry (iMALDI) assay for EGFR diagnosis. *Proteom. Clin. Appl.* **2007**, *1* (12), 1651-1659.
110. Addona, T. A.; Abbatiello, S. E.; Schilling, B.; Skates, S. J.; Mani, D. R.; Bunk, D. M.; Spiegelman, C. H.; Zimmerman, L. J.; Ham, A. J. L.; Keshishian, H.; Hall, S. C.; Allen, S.; Blackman, R. K.; Borchers, C. H.; Buck, C.; Cardasis, H. L.; Cusack, M. P.; Dodder, N. G.; Gibson, B. W.; Held, J. M.; Hiltke, T.; Jackson, A.; Johansen, E. B.; Kinsinger, C. R.; Li, J.; Mesri, M.; Neubert, T. A.; Niles, R. K.; Pulsipher, T. C.; Ransohoff, D.; Rodriguez, H.; Rudnick, P. A.; Smith, D.; Tabb, D. L.; Tegeler, T. J.; Variyath, A. M.; Vega-Montoto, L. J.; Wahlander, A.; Waldemarson, S.; Wang, M.; Whiteaker, J. R.; Zhao, L.; Anderson, N. L.; Fisher, S. J.; Liebler, D. C.; Paulovich, A. G.; Regnier, F. E.; Tempst, P.; Carr, S. A., Multi-site assessment of the precision and reproducibility of multiple reaction monitoring-based measurements of proteins in plasma. *Nat. Biotechnol.* **2009**, *27* (7), 633-U85.
111. Olsen, J. V.; Ong, S. E.; Mann, M., Trypsin cleaves exclusively C-terminal to arginine and lysine residues. *Mol. Cell. Proteomics* **2004**, *3* (6), 608-614.
112. Klapper, M. H., INDEPENDENT DISTRIBUTION OF AMINO-ACID NEAR NEIGHBOR PAIRS INTO POLYPEPTIDES. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1977**, *78* (3), 1018-1024.
113. Roepstorff, P.; Fohlman, J., PROPOSAL FOR A COMMON NOMENCLATURE FOR SEQUENCE IONS IN MASS-SPECTRA OF PEPTIDES. *Biomedical Mass Spectrometry* **1984**, *11* (11), 601-601.
114. Biemann, K., CONTRIBUTIONS OF MASS-SPECTROMETRY TO PEPTIDE AND PROTEIN-STRUCTURE. *Biomedical and Environmental Mass Spectrometry* **1988**, *16* (1-12), 99-111.
115. Burlet, O.; Orkiszewski, R. S.; Ballard, K. D.; Gaskell, S. J., CHARGE PROMOTION OF LOW-ENERGY FRAGMENTATIONS OF PEPTIDE IONS. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* **1992**, *6* (11), 658-662.
116. Tang, X. J.; Thibault, P.; Boyd, R. K., FRAGMENTATION REACTIONS OF MULTIPLY-PROTONATED PEPTIDES AND IMPLICATIONS FOR SEQUENCING BY TANDEM MASS-SPECTROMETRY WITH LOW-ENERGY COLLISION-INDUCED DISSOCIATION. *Analytical Chemistry* **1993**, *65* (20), 2824-2834.
117. Jones, J. L.; Dongre, A. R.; Somogyi, A.; Wysocki, V. H., SEQUENCE DEPENDENCE OF PEPTIDE FRAGMENTATION EFFICIENCY CURVES DETERMINED BY ELECTROSPRAY-IONIZATION SURFACE-INDUCED DISSOCIATION MASS-SPECTROMETRY. *J. Am. Chem. Soc.* **1994**, *116* (18), 8368-8369.
118. Paizs, B.; Suhai, S., Fragmentation pathways of protonated peptides. *Mass Spectrom. Rev.* **2005**, *24* (4), 508-548.
119. Picotti, P.; Aebersold, R.; Domon, B., The implications of proteolytic background for shotgun proteomics. *Mol. Cell. Proteomics* **2007**, *6* (9), 1589-1598.
120. Deutsch, E. W.; Lam, H.; Aebersold, R., PeptideAtlas: a resource for target selection for emerging targeted proteomics workflows. *EMBO Rep.* **2008**, *9* (5), 429-434.
121. Craig, R.; Cortens, J. P.; Beavis, R. C., Open source system for analyzing, validating, and storing protein identification data. *J. Proteome Res.* **2004**, *3* (6), 1234-1242.
122. Jones, P.; Cote, R. G.; Cho, S. Y.; Klie, S.; Martens, L.; Quinn, A. F.; Thorneycroft, D.; Hermjakob, H., PRIDE: new developments and new datasets. *Nucleic Acids Res.* **2008**, *36*, D878-D883.
123. Picotti, P.; Lam, H.; Campbell, D.; Deutsch, E. W.; Mirzaei, H.; Ranish, J.; Domon, B.; Aebersold, R., A database of mass spectrometric assays for the yeast proteome. *Nat. Methods* **2008**, *5* (11), 913-914.

124. Mallick, P.; Schirle, M.; Chen, S. S.; Flory, M. R.; Lee, H.; Martin, D.; Raught, B.; Schmitt, R.; Werner, T.; Kuster, B.; Aebersold, R., eComputational prediction of proteotypic peptides for quantitative proteomics. *Nat. Biotechnol.* **2007**, *25* (1), 125-131.
125. Sanders, W. S.; Bridges, S. M.; McCarthy, F. M.; Nanduri, B.; Burgess, S. C., Prediction of peptides observable by mass spectrometry applied at the experimental set level. *BMC bioinformatics* **2007**, *8 Suppl 7*, S23.
126. Fusaro, V. A.; Mani, D. R.; Mesirov, J. P.; Carr, S. A., Prediction of high-responding peptides for targeted protein assays by mass spectrometry. *Nat. Biotechnol.* **2009**, *27* (2), 190-198.
127. Lange, V.; Picotti, P.; Domon, B.; Aebersold, R., Selected reaction monitoring for quantitative proteomics: a tutorial. *Mol. Syst. Biol.* **2008**, *4*.
128. Dick, L. W.; Kim, C.; Qiu, D. F.; Cheng, K. C., Determination of the origin of the N-terminal pyro-glutamate variation in monoclonal antibodies using model peptides. *Biotechnol. Bioeng.* **2007**, *97* (3), 544-553.
129. Geiger, T.; Clarke, S., DEAMIDATION, ISOMERIZATION, AND RACEMIZATION AT ASPARAGINYL AND ASPARTYL RESIDUES IN PEPTIDES - SUCCINIMIDE-LINKED REACTIONS THAT CONTRIBUTE TO PROTEIN-DEGRADATION. *J. Biol. Chem.* **1987**, *262* (2), 785-794.
130. Piskiew.D; Landon, M.; Smith, E. L., ANOMALOUS CLEAVAGE OF ASPARTYL-PROLINE PEPTIDE BONDS DURING AMINO ACID SEQUENCE DETERMINATIONS. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1970**, *40* (5), 1173-&.
131. Hunt, D. F.; Yates, J. R.; Shabanowitz, J.; Winston, S.; Hauer, C. R., PROTEIN SEQUENCING BY TANDEM MASS-SPECTROMETRY. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1986**, *83* (17), 6233-6237.
132. Breci, L. A.; Tabb, D. L.; Yates, J. R.; Wysocki, V. H., Cleavage N-terminal to proline: Analysis of a database of peptide tandem mass spectra. *Analytical Chemistry* **2003**, *75* (9), 1963-1971.
133. Wysocki, V. H.; Tsaprailis, G.; Smith, L. L.; Breci, L. A., Special feature: Commentary - Mobile and localized protons: a framework for understanding peptide dissociation. *J. Mass Spectrom.* **2000**, *35* (12), 1399-1406.
134. Soto, A. M.; Sonnenschein, C.; Chung, K. L.; Fernandez, M. F.; Olea, N.; Serrano, F. O., The e-screen assay as a tool to identify estrogens - an update on estrogenic environmental-pollutants. *Environ. Health Perspect.* **1995**, *103*, 113-122.
135. Desbrow, C.; Routledge, E. J.; Brighty, G. C.; Sumpter, J. P.; Waldock, M., Identification of estrogenic chemicals in STW effluent. 1. Chemical fractionation and in vitro biological screening. *Environ. Sci. Technol.* **1998**, *32* (11), 1549-1558.
136. Pojana, G.; Bonfa, A.; Busetti, F.; Collarin, A.; Marcomini, A., Determination of natural and synthetic estrogenic compounds in coastal lagoon waters by HPLC-electrospray-mass spectrometry. *Int. J. Environ. Anal. Chem.* **2004**, *84* (10), 717-727.
137. DeRosa, C.; Richter, P.; Pohl, H.; Jones, D. E., Environmental exposures that affect the endocrine system: Public health implications. *J. Toxicol. Env. Health-Pt b-Crit. Rev.* **1998**, *1* (1), 3-26.
138. Harris, C. A.; Henttu, P.; Parker, M. G.; Sumpter, J. P., The estrogenic activity of phthalate esters in vitro. *Environ. Health Perspect.* **1997**, *105* (8), 802-811.
139. Valle, D., VITELLOGENESIS IN INSECTS AND OTHER GROUPS - A REVIEW. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* **1993**, *88* (1), 1-26.
140. Montorzi, M.; Falchuk, K. H.; Vallee, B. L., XENOPUS-LAEVIS VITELLOGENIN IS A ZINC PROTEIN. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1994**, *200* (3), 1407-1413.
141. Folmar, L. C.; Denslow, N. D.; Rao, V.; Chow, M.; Crain, D. A.; Enblom, J.; Marcino, J.; Guillette, L. J., Vitellogenin induction and reduced serum testosterone concentrations in feral male carp (*Cyprinus carpio*) captured near a major metropolitan sewage treatment plant. *Environ. Health Perspect.* **1996**, *104* (10), 1096-1101.
142. Parks, L. G.; Cheek, A. O.; Denslow, N. D.; Heppell, S. A.; McLachlan, J. A.; LeBlanc, G. A.; Sullivan, C. V., Fathead minnow (*Pimephales promelas*) vitellogenin: purification, characterization

- and quantitative immunoassay for the detection of estrogenic compounds. *Comp. Biochem. Physiol. C-Pharmacol. Toxicol. Endocrinol.* **1999**, *123* (2), 113-125.
143. Wahli, W.; Dawid, I. B.; Ryffel, G. U.; Weber, R., VITELLOGENESIS AND THE VITELLOGENIN GENE FAMILY. *Science* **1981**, *212* (4492), 298-304.
144. Flouriot, G.; Pakdel, F.; Ducouret, B.; Valotaire, Y., INFLUENCE OF XENOBIOTICS ON RAINBOW-TROUT LIVER ESTROGEN-RECEPTOR AND VITELLOGENIN GENE-EXPRESSION. *J. Mol. Endocrinol.* **1995**, *15* (2), 143-151.
145. Flouriot, G.; Vaillant, C.; Salbert, G.; Pelissero, C.; Guiraud, J. M.; Valotaire, Y., MONOLAYER AND AGGREGATE CULTURES OF RAINBOW-TROUT HEPATOCYTES - LONG-TERM AND STABLE LIVER-SPECIFIC EXPRESSION IN AGGREGATES. *J. Cell Sci.* **1993**, *105*, 407-416.
146. Flouriot, G.; Pakdel, F.; Valotaire, Y., Transcriptional and post-transcriptional regulation of rainbow trout estrogen receptor and vitellogenin gene expression. *Mol. Cell. Endocrinol.* **1996**, *124* (1-2), 173-183.
147. Nimrod, A. C.; Benson, W. H., Estrogenic responses to xenobiotics in channel catfish (*Ictalurus punctatus*). *Mar. Environ. Res.* **1996**, *42* (1-4), 155-160.
148. Korsgaard, B.; Pedersen, K. L., Vitellogenin in *Zoarces viviparus*: Purification, quantification by ELISA and induction by estradiol-17 beta and 4-nonylphenol. *Comp. Biochem. Physiol. C-Pharmacol. Toxicol. Endocrinol.* **1998**, *120* (1), 159-166.
149. Christensen, L. J.; Korsgaard, B.; Bjerregaard, P., The effect of 4-nonylphenol on the synthesis of vitellogenin in the flounder *Platichthys flesus*. *Aquat. Toxicol.* **1999**, *46* (3-4), 211-219.
150. Monteverdi, G. H.; Di Giulio, R. T., An enzyme-linked immunosorbent assay for estrogenicity using primary hepatocyte cultures from the channel catfish (*Ictalurus punctatus*). *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* **1999**, *37* (1), 62-69.
151. Arukwe, A.; Celius, T.; Walther, B. T.; Goksoyr, A., Effects of xenoestrogen treatment on zona radiata protein and vitellogenin expression in Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Aquat. Toxicol.* **2000**, *49* (3), 159-170.
152. Hashimoto, S.; Bessho, H.; Hara, A.; Nakamura, M.; Iguchi, T.; Fujita, K., Elevated serum vitellogenin levels and gonadal abnormalities in wild male flounder (*Pleuronectes yokohamae*) from Tokyo Bay, Japan. *Mar. Environ. Res.* **2000**, *49* (1), 37-53.
153. Fossi, M. C.; Casini, S.; Marsili, L.; Neri, G.; Mori, G.; Ancora, S.; Moscatelli, A.; Ausili, A.; Notarbartolo-di-Sciara, G., Biomarkers for endocrine disruptors in three species of Mediterranean large pelagic fish. *Mar. Environ. Res.* **2002**, *54* (3-5), 667-671.
154. Kordes, C.; Rieber, E. P.; Gutzeit, H. O., An in vitro vitellogenin bioassay for oestrogenic substances in the medaka (*Oryzias latipes*). *Aquat. Toxicol.* **2002**, *58* (3-4), 151-164.
155. Verslycke, T.; Vandenberghe, G. F.; Versonnen, B.; Arijs, K.; Janssen, C. R., Induction of vitellogenesis in 17 alpha-ethinylestradiol-exposed rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*): a method comparison. *Comp. Biochem. Physiol. C-Toxicol. Pharmacol.* **2002**, *132* (4), 483-492.
156. Pickford, K. A.; Thomas-Jones, R. E.; Wheals, B.; Tyler, C. R.; Sumpter, J. P., Route of exposure affects the oestrogenic response of fish to 4-tert-nonylphenol. *Aquat. Toxicol.* **2003**, *65* (3), 267-279.
157. Jobling, S.; Casey, D.; Rodgers-Gray, T.; Oehlmann, J.; Schulte-Oehlmann, U.; Pawlowski, S.; Baunbeck, T.; Turner, A. P.; Tyler, C. R., Comparative responses of molluscs and fish to environmental estrogens and an estrogenic effluent. *Aquat. Toxicol.* **2003**, *65* (2), 205-220.
158. Robinson, C. D.; Brown, E.; Craft, J. A.; Davies, I. M.; Moffat, C. F.; Pirie, D.; Robertson, F.; Stagg, R. M.; Struthers, S., Effects of sewage effluent and ethynyl oestradiol upon molecular markers of oestrogenic exposure, maturation and reproductive success in the sand goby (*Pomatoschistus minutus*, Pallas). *Aquat. Toxicol.* **2003**, *62* (2), 119-134.
159. Versonnen, B. J.; Goemans, G.; Belpaire, C.; Janssen, C. R., Vitellogenin content in European eel (*Anguilla anguilla*) in Flanders, Belgium. *Environ. Pollut.* **2004**, *128* (3), 363-371.
160. Sumpter, J. P.; Jobling, S., VITELLOGENESIS AS A BIOMARKER FOR ESTROGENIC CONTAMINATION OF THE AQUATIC ENVIRONMENT. *Environ. Health Perspect.* **1995**, *103*, 173-178.

161. Segner, H.; Carroll, K.; Fenske, M.; Janssen, C. R.; Maack, G.; Pascoe, D.; Schafers, C.; Vandenberg, G. F.; Watts, M.; Wenzel, A., Identification of endocrine-disrupting effects in aquatic vertebrates and invertebrates: report from the European IDEA project. *Ecotox. Environ. Safe.* **2003**, *54* (3), 302-314.
162. Depledge, M. H.; Billingham, Z., Ecological significance of endocrine disruption in marine invertebrates. *Mar. Pollut. Bull.* **1999**, *39* (1-12), 32-38.
163. Comber, M. H. I.; Williams, T. D.; Stewart, K. M., THE EFFECTS OF NONYLPHENOL ON DAPHNIA-MAGNA. *Water Res.* **1993**, *27* (2), 273-276.
164. Shurin, J. B.; Dodson, S. I., Sublethal toxic effects of cyanobacteria and nonylphenol on environmental sex determination and development in Daphnia. *Environ. Toxicol. Chem.* **1997**, *16* (6), 1269-1276.
165. Zou, E. M.; Fingerman, M., Effects of estrogenic xenobiotics on molting of the water flea, Daphnia magna. *Ecotox. Environ. Safe.* **1997**, *38* (3), 281-285.
166. Oehlmann, J.; Schulte-Oehlmann, U.; Tillmann, M.; Markert, B., Effects of endocrine disruptors on prosobranch snails (Mollusca : Gastropoda) in the laboratory. Part I: Bisphenol A and octylphenol as xeno-estrogens. *Ecotoxicology* **2000**, *9* (6), 383-397.
167. Kramer, V. J.; Miles-Richardson, S.; Pierens, S. L.; Giesy, J. P., Reproductive impairment and induction of alkaline-labile phosphate, a biomarker of estrogen exposure, in fathead minnows (*Pimephales promelas*) exposed to waterborne 17 beta-estradiol. *Aquat. Toxicol.* **1998**, *40* (4), 335-360.
168. Gagne, F.; Blaise, C., Estrogenic properties of municipal and industrial wastewaters evaluated with a rapid and sensitive chemoluminescent in situ hybridization assay (CISH) in rainbow trout hepatocytes. *Aquat. Toxicol.* **1998**, *44* (1-2), 83-91.
169. Stanton, M. G., COLORIMETRIC DETERMINATION OF INORGANIC PHOSPHATE IN PRESENCE OF BIOLOGICAL MATERIAL AND ADENOSINE TRIPHOSPHATE. *Anal. Biochem.* **1968**, *22* (1), 27-31.
170. Pedersen, S. N.; Christiansen, L. B.; Pedersen, K. L.; Korsgaard, B.; Bjerregaard, P., In vivo estrogenic activity of branched and linear alkylphenols in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Sci. Total Environ.* **1999**, *233* (1-3), 89-96.
171. Christiansen, L. B.; Pedersen, K. L.; Korsgaard, B.; Bjerregaard, P., Estrogenicity of xenobiotics in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) using in vivo synthesis of vitellogenin as a biomarker. *Mar. Environ. Res.* **1998**, *46* (1-5), 137-140.
172. Lomax, D. P.; Roubal, W. T.; Moore, J. D.; Johnson, L. L., An enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for measuring vitellogenin in English sole (*Pleuronectes vetulus*): development, validation and cross-reactivity with other pleuronectids. *Comp. Biochem. Physiol. B-Biochem. Mol. Biol.* **1998**, *121* (4), 425-436.
173. Nilsen, B. M.; Berg, K.; Arukwe, A.; Goksoyr, A., Monoclonal and polyclonal antibodies against fish vitellogenin for use in pollution monitoring. *Mar. Environ. Res.* **1998**, *46* (1-5), 153-157.
174. Mosconi, G.; Carnevali, O.; Carletta, R.; Nabissi, M.; Polzonetti-Magni, A. M., Gilthead seabream (*Sparus aurata*) vitellogenin: Purification, partial characterization, and validation of an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). *Gen. Comp. Endocrinol.* **1998**, *110* (3), 252-261.
175. Irwin, L. K.; Gray, S.; Oberdorster, E., Vitellogenin induction in painted turtle, *Chrysemys picta*, as a biomarker of exposure to environmental levels of estradiol. *Aquat. Toxicol.* **2001**, *55* (1-2), 49-60.
176. Nichols, K. M.; Snyder, E. M.; Snyder, S. A.; Pierens, S. L.; Miles-Richardson, S. R.; Giesy, J. P., Effects of nonylphenol ethoxylate exposure on reproductive output and bioindicators of environmental estrogen exposure in fathead minnows, *Pimephales promelas*. *Environ. Toxicol. Chem.* **2001**, *20* (3), 510-522.
177. Fenske, M.; van Aerle, R.; Brack, S.; Tyler, C. R.; Segner, H., Development and validation of a homologous zebrafish (*Danio rerio* Hamilton-Buchanan) vitellogenin enzyme-linked immunosorbent

- assay (ELISA) and its application for studies on estrogenic chemicals. *Comp. Biochem. Physiol. C-Toxicol. Pharmacol.* **2001**, 129 (3), 217-232.
178. Tyler, C. R.; van Aerle, R.; Nilsen, M. V.; Blackwell, R.; Maddix, S.; Nilsen, B. M.; Berg, K.; Hutchinson, T. H.; Goksoyr, A., Monoclonal antibody enzyme-linked immunosorbent assay to quantify vitellogenin for studies on environmental estrogens in the rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Environ. Toxicol. Chem.* **2002**, 21 (1), 47-54.
179. Hennies, M.; Wiesmann, M.; Allner, B.; Sauerwein, H., Vitellogenin in carp (*Cyprinus carpio*) and perch (*Perca fluviatilis*): purification, characterization and development of an ELISA for the detection of estrogenic effects. *Sci. Total Environ.* **2003**, 309 (1-3), 93-103.
180. Jensen, K. M.; Ankley, G. T., Evaluation of a commercial kit for measuring vitellogenin in the fathead minnow (*Pimephales promelas*). *Ecotox. Environ. Safe.* **2006**, 64 (2), 101-105.
181. Tsukimura, B.; Waddy, S. L.; Vogel, J. M.; Linder, C. J.; Bauer, D. K.; Borst, D. W., Characterization and quantification of yolk proteins in the lobster, *Homarus americanus*. *J. Exp. Zool.* **2002**, 292 (4), 367-375.
182. Sagi, A.; Khalaila, I.; Abdu, U.; Shoukrun, R.; Weil, S., A newly established ELISA showing the effect of the androgenic gland on secondary-vitellogenic-specific protein in the hemolymph of the crayfish *Cherax qundricarinatus*. *Gen. Comp. Endocrinol.* **1999**, 115 (1), 37-45.
183. Lee, C. Y.; Watson, R. D., DEVELOPMENT OF A QUANTITATIVE ENZYME-LINKED-IMMUNOSORBENT-ASSAY FOR VITELLIN AND VITELLOGENIN OF THE BLUE-CRAB *CALLINECTES-SAPIDUS*. *J. Crustac. Biol.* **1994**, 14 (4), 617-626.
184. Chen, L. Q.; Jiang, H. B.; Zhou, Z. L.; Li, K.; Deng, G. Y.; Liu, Z. J., Purification of vitellin from the ovary of Chinese mitten-handed crab (*Eriocheir sinensis*) and development of an antivitelin ELISA. *Comp. Biochem. Physiol. B-Biochem. Mol. Biol.* **2004**, 138 (3), 305-311.
185. Ghekiere, A.; Fenske, M.; Verslycke, T.; Tyler, C.; Janssen, C., Development of a quantitative enzyme-linked immunosorbent assay for vitellin in the mysid *Neomysis integer* (Crustacea : Mysidacea). *Comp. Biochem. Physiol. A-Mol. Integr. Physiol.* **2005**, 142 (1), 43-49.
186. Vincent, S. G. P.; Keller, R.; Subramoniam, T., Development of vitellogenin-ELISA, an in vivo bioassay, and identification of two vitellogenesis-inhibiting hormones of the tiger shrimp *Penaeus monodon*. *Mar. Biotechnol.* **2001**, 3 (6), 561-571.
187. Tsukimura, B.; Bender, J. S.; Linder, C. J., Development of an anti-vitelin ELISA for the assessment of reproduction in the ridgeback shrimp, *Sicyonia ingentis*. *Comparative Biochemistry and Physiology a-Molecular and Integrative Physiology* **2000**, 127 (2), 215-224.
188. Boucard, C. G. V.; Levy, P.; Ceccaldi, H. J.; Brogren, C. H., Developmental changes in concentrations of vitellin, vitellogenin, and lipids in hemolymph, hepatopancreas, and ovaries from different ovarian stages of Indian white prawn *Fenneropenaeus indicus*. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* **2002**, 281 (1-2), 63-75.
189. Okumura, H.; Todo, T.; Adachi, S.; Yamauchi, K., Changes in hepatic vitellogenin mRNA levels during oocyte development in the Japanese eel, *Anguilla japonica*. *Gen. Comp. Endocrinol.* **2002**, 125 (1), 9-16.
190. Islinger, M.; Pawlowski, S.; Hollert, H.; Volkl, A.; Braunbeck, T., Measurement of vitellogenin-mRNA expression in primary cultures of rainbow trout hepatocytes in a non-radioactive dot blot/RNase protection-assay. *Sci. Total Environ.* **1999**, 233 (1-3), 109-122.
191. Pawlowski, S.; Ternes, T.; Bonerz, M.; Kluczka, T.; van der Burg, B.; Nau, H.; Erdinger, L.; Braunbeck, T., Combined in situ and in vitro assessment of the estrogenic activity of sewage and surface water samples. *Toxicol. Sci.* **2003**, 75 (1), 57-65.
192. Celius, T.; Matthews, J. B.; Giesy, J. P.; Zacharewski, T. R., Quantification of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) zona radiata and vitellogenin mRNA levels using real-time PCR after in vivo treatment with estradiol-17 beta or alpha-zearalenol. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* **2000**, 75 (2-3), 109-119.

193. Ota, M.; Saito, T.; Yoshizaki, G.; Otsuki, A., Vitellogenin-like gene expression in liver of male zebrafish (*Danio rerio*) by 1 μ g 3-methylcholanthrene treatment: The possibility of a rapid and sensitive in vivo bioassay. *Water Res.* **2000**, *34* (8), 2400-2403.
194. Yadetie, F.; Male, R., Effects of 4-nonylphenol on gene expression of pituitary hormones in juvenile Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Aquat. Toxicol.* **2002**, *58* (1-2), 113-129.
195. Ackermann, G. E.; Schwaiger, J.; Negele, R. D.; Fent, K., Effects of long-term nonylphenol exposure on gonadal development and biomarkers of estrogenicity in juvenile rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquat. Toxicol.* **2002**, *60* (3-4), 203-221.
196. Barucca, M.; Canapa, A.; Olmo, E.; Regoli, F., Analysis of vitellogenin gene induction as a valuable biomarker of estrogenic exposure in various Mediterranean fish species. *Environ. Res.* **2006**, *101* (1), 68-73.
197. Ciocan, C. M.; Puinean, M. A.; Cubero-Leon, E.; Hill, E. M.; Minier, C.; Osada, M.; Itoh, N.; Rotchell, J. M., Endocrine Disruption, Reproductive Cycle and Pollutants in Blue Mussel *Mytilus edulis*. *Interdisciplinary Studies on Environmental Chemistry — Biological Responses to Contaminants*, Eds., N. Hamamura, S. Suzuki, S. Mendo, C. M. Barroso, H. Iwata and S. Tanabe **2010**, 121-126.
198. Cohen, A. M.; Mansour, A. A. H.; Banoub, J. H., Absolute quantification of Atlantic salmon and rainbow trout vitellogenin by the 'signature peptide' approach using electrospray ionization QqToF tandem mass spectrometry. *J. Mass Spectrom.* **2006**, *41* (5), 646-658.
199. Cohen, A. M.; Jahouh, F.; Sioud, S.; Rideout, R. M.; Morgan, M. J.; Banoub, J. H., Quantification of Greenland halibut serum vitellogenin: a trip from the deep sea to the mass spectrometer. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **2009**, *23* (7), 1049-1060.
200. Zhang, F. G.; Bartels, M. J.; Brodeur, J. C.; Woodburn, K. B., Quantitative measurement of fathead minnow vitellogenin by liquid chromatography combined with tandem mass spectrometry using a signature peptide of vitellogenin. *Environ. Toxicol. Chem.* **2004**, *23* (6), 1408-1415.
201. Qiao, L.; Liu, Y.; Hudson, S. P.; Yang, P. Y.; Magner, E.; Liu, B. H., A nanoporous reactor for efficient proteolysis. *Chem.-Eur. J.* **2008**, *14* (1), 151-157.
202. Arsene, C. G.; Ohlendorf, R.; Burkitt, W.; Pritchard, C.; Henrion, A.; O'Connor, G.; Bunk, D. M.; Guttler, B., Protein quantification by isotope dilution mass spectrometry of proteolytic fragments: Cleavage rate and accuracy. *Anal. Chem.* **2008**, *80* (11), 4154-4160.
203. Simon, R.; Jubeaux, G.; Chaumot, A.; Lemoine, J.; Geffard, O.; Salvador, A., Mass spectrometry assay as an alternative to the enzyme-linked immunosorbent assay test for biomarker quantitation in ecotoxicology: Application to vitellogenin in Crustacea (*Gammarus fossarum*). *J. Chromatogr. A* **2010**, *1217* (31), 5109-5115.
204. Stahnke, H.; Kittlaus, S.; Kempe, G.; Alder, L., Reduction of Matrix Effects in Liquid Chromatography–Electrospray Ionization–Mass Spectrometry by Dilution of the Sample Extracts: How Much Dilution is Needed? *Anal. Chem.* **2012**, *In press*.
205. Soltwisch, J.; Dreisewerd, K., Discrimination of Isobaric Leucine and Isoleucine Residues and Analysis of Post-Translational Modifications in Peptides by MALDI In-Source Decay Mass Spectrometry Combined with Collisional Cooling. *Anal. Chem.* **2010**, *82* (13), 5628-5635.
206. Gupta, K.; Kumar, M.; Chandrashekar, K.; Krishnan, K. S.; Balaram, P., Combined Electron Transfer Dissociation–Collision-Induced Dissociation Fragmentation in the Mass Spectrometric Distinction of Leucine, Isoleucine, and Hydroxyproline Residues in Peptide Natural Products. *J. Proteome Res.* **2012**, *In press*.
207. Jubeaux, G.; Simon, R.; Salvador, A.; Quéau, H.; Chaumot, A.; Geffard, O., Vitellogenin-like proteins in the freshwater amphipod *Gammarus fossarum* (Koch, 1835): functional characterization throughout reproductive process, potential for use as an indicator of oocyte quality and endocrine disruption biomarker in males. *Aquat. Toxicol.* **2012**.
208. Mu, X. Y.; LeBlanc, G. A., Environmental antiestrogens alter embryo development in the crustacean *Daphnia magna*. *J. Exp. Zool.* **2002**, *292* (3), 287-292.

209. Mu, X. Y.; Leblanc, G. A., Cross communication between signaling pathways: Juvenoid hormones modulate ecdysteroid activity in a crustacean. *J. Exp. Zool. Part A* **2004**, 301A (10), 793-801.
210. Souty, C.; Besse, G.; Picaud, J. L., ECDYSONE STIMULATES THE RATE OF VITELLOGENIN RELEASE IN HEMOLYMPH OF THE TERRESTRIAL CRUSTACEAN ISOPODA PORCELLIO-DILATATUS BRANDT. *Comptes Rendus Acad. Sci. Ser. III-Sci. Vie-Life Sci.* **1982**, 294 (22), 1057-1059.
211. Gunamalai, V.; Kirubakaran, R.; Subramoniam, T., Hormonal coordination of molting and female reproduction by ecdysteroids in the mole crab *Emerita asiatica* (Milne Edwards). *Gen. Comp. Endocrinol.* **2004**, 138 (2), 128-138.
212. Nagaraju, G. P. C.; Suraj, N. J.; Reddy, P. S., Methyl farnesoate stimulates gonad development in *Macrobrachium malcolmsonii* (H. Milne Edwards) (Decapoda, Palaemonidae). *Crustaceana* **2003**, 76, 1171-1178.
213. Laufer, H.; Biggers, W. J., Unifying concepts learned from methyl farnesoate for invertebrate reproduction and post-embryonic development. *Am. Zool.* **2001**, 41 (3), 442-457.
214. Jubeaux, G.; Audouard-Combe, F.; Simon, R.; Tutundjian, R.; Salvador, A.; Geffard, O.; Chaumot, A., Vitellogenin-like proteins among invertebrate species diversity: potential of proteomic mass spectrometry (LC-MS/MS) for biomarker development. *Environmental Science & Technology* **2012**, (soutmis).
215. Britschgi, M.; Rufibach, K.; Huang, S. L. B.; Clark, C. M.; Kaye, J. A.; Li, G.; Peskind, E. R.; Quinn, J. F.; Galasko, D. R.; Wyss-Coray, T., Modeling of Pathological Traits in Alzheimer's Disease Based on Systemic Extracellular Signaling Proteome. *Mol. Cell. Proteomics* **2011**, 10 (10).
216. Garai, K.; Baban, B.; Frieden, C., Self-Association and Stability of the ApoE Isoforms at Low pH: Implications for ApoE-Lipid Interactions. *Biochemistry* **2011**, 50 (29), 6356-6364.
217. Eisenberg, D. T. A.; Kuzawa, C. W.; Hayes, M. G., Worldwide Allele Frequencies of the Human Apolipoprotein E Gene: Climate, Local Adaptations, and Evolutionary History. *Am. J. Phys. Anthropol.* **2010**, 143 (1), 100-111.
218. Ballard, C.; Gauthier, S.; Corbett, A.; Brayne, C.; Aarsland, D.; Jones, E., Alzheimer's disease. *Lancet* **2011**, 377 (9770), 1019-1031.
219. Elliott, D. A.; Tsoi, K.; Holinkova, S.; Chan, S. L.; Kim, W. S.; Halliday, G. M.; Rye, K. A.; Garner, B., Isoform-specific proteolysis of apolipoprotein-E in the brain. *Neurobiol. Aging* **2011**, 32 (2), 257-271.
220. Sullivan, P. M.; Han, B.; Liu, F.; Mace, B. E.; Ervin, J. F.; Wu, S.; Koger, D.; Paul, S.; Bales, K. R., Reduced levels of human apoE4 protein in an animal model of cognitive impairment. *Neurobiol. Aging* **2011**, 32 (5), 791-801.
221. Yu, C. E.; Seltman, H.; Peskind, E. R.; Galloway, N.; Zhou, P. X.; Rosenthal, E.; Wijsman, E. M.; Tsuang, D. W.; Devlin, B.; Schellenberg, G. D., Comprehensive analysis of APOE and selected proximate markers for late-onset Alzheimer's disease: Patterns of linkage disequilibrium and disease/marker association. *Genomics* **2007**, 89 (6), 655-665.
222. Bell, R. D.; Sagare, A. P.; Friedman, A. E.; Bedi, G. S.; Holtzman, D. M.; Deane, R.; Zlokovic, B. V., Transport pathways for clearance of human Alzheimer's amyloid beta-peptide and apolipoproteins E and J in the mouse central nervous system. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* **2007**, 27 (5), 909-918.
223. Hayashi, H.; Campenot, R. B.; Vance, D. E.; Vance, J. E., Protection of Neurons from Apoptosis by Apolipoprotein E-containing Lipoproteins Does Not Require Lipoprotein Uptake and Involves Activation of Phospholipase C gamma 1 and Inhibition of Calcineurin. *J. Biol. Chem.* **2009**, 284 (43), 29605-29613.
224. Beekman, M.; Posthuma, D.; Heijmans, B. T.; Lakenberg, N.; Suchiman, H. E. D.; Snieder, H.; de Knijff, P.; Frants, R. R.; van Ommen, G. J. B.; Kluft, C.; Vogler, G. P.; Slagboom, P. E.; Boomsma, D. I., Combined association and linkage analysis applied to the APOE locus. *Genet. Epidemiol.* **2004**, 26 (4), 328-337.

225. Bohnet, K.; Pillot, T.; Visvikis, S.; Sabolovic, N.; Siest, G., Apolipoprotein (apo) E genotype and apoE concentration determine binding of normal very low density lipoproteins to HepG2 cell surface receptors. *J. Lipid Res.* **1996**, *37* (6), 1316-1324.
226. Uchida, Y.; Ito, S.; Nukina, N., Sandwich ELISA for the measurement of Apo-E4 levels in serum and the estimation of the allelic status of Apo-E4 isoforms. *J. Clin. Lab. Anal.* **2000**, *14* (6), 260-264.
227. Riddell, D. R.; Zhou, H.; Atchison, K.; Warwick, H. K.; Atkinson, P. J.; Jefferson, J.; Xu, L.; Aschmies, S.; Kirksey, Y.; Hu, Y.; Wagner, E.; Parratt, A.; Xu, J.; Li, Z. T.; Zaleska, M. M.; Jacobsen, J. S.; Pangalos, M. N.; Reinhart, P. H., Impact of Apolipoprotein E (ApoE) Polymorphism on Brain ApoE Levels. *J. Neurosci.* **2008**, *28* (45), 11445-11453.
228. Yuksel, D.; Ichiyama, T.; Yilmaz, D.; Anlar, B., Cerebrospinal fluid apolipoprotein e levels in subacute sclerosing panencephalitis. *Brain & development* **2012**, *34* (4), 298-301.
229. Carlsson, J.; Armstrong, V. W.; Reiber, H.; Felgenhauer, K.; Seidel, D., CLINICAL RELEVANCE OF THE QUANTIFICATION OF APOLIPOPROTEIN-E IN CEREBROSPINAL-FLUID. *Clin. Chim. Acta* **1991**, *196* (2-3), 167-176.
230. Siest, G.; Bertrand, P.; Qin, B.; Herbeth, B.; Serot, J. M.; Masana, L.; Ribalta, J.; Passmore, A. P.; Evans, A.; Ferrari, M.; Franceschi, M.; Shepherd, J.; Cuchel, M.; Beisiegel, U.; Zuchowsky, K.; Rukavina, A. S.; Sertic, J.; Stojanov, M.; Kostic, V.; Mitrevski, A.; Petrova, V.; Sass, C.; Merched, A.; Salonen, J. T.; Tiret, L.; Visvikis, S.; ApoEurope, G., Apolipoprotein E polymorphism and serum concentration in Alzheimer's disease in nine European centres: The ApoEurope study. *Clin. Chem. Lab. Med.* **2000**, *38* (8), 721-730.
231. Gupta, V. B.; Laws, S. M.; Villemagne, V. L.; Ames, D.; Bush, A. I.; Ellis, K. A.; Lui, J. K.; Masters, C.; Rowe, C. C.; Szoeki, C.; Taddei, K.; Martins, R. N.; Grp, A. R., Plasma apolipoprotein E and Alzheimer disease risk The AIBL study of aging. *Neurology* **2011**, *76* (12), 1091-1098.
232. Scacchi, R.; Gambina, G.; Ruggeri, M.; Martini, M. C.; Ferrari, G.; Silvestri, M.; Schiavon, R.; Corbo, R. M., Plasma levels of apolipoprotein E and genetic markers in elderly patients with Alzheimer's disease. *Neurosci. Lett.* **1999**, *259* (1), 33-36.
233. Slooter, A. J. C.; de Knijff, P.; Hofman, A.; Cruts, M.; Breteler, M. M. B.; Van Broeckhoven, C.; Havekes, L. M.; van Duijn, C. M., Serum apolipoprotein E level is not increased in Alzheimer's disease: the Rotterdam study. *Neurosci. Lett.* **1998**, *248* (1), 21-24.
234. Panza, F.; Solfrizzi, V.; Colacicco, A. M.; Basile, A. M.; D'Introno, A.; Capurso, C.; Sabba, M.; Capurso, S.; Capurso, A., Apolipoprotein E (APOE) polymorphism influences serum APOE levels in Alzheimer's disease patients and centenarians. *Neuroreport* **2003**, *14* (4), 605-608.
235. Lehtimäki, T.; Pirttilä, T.; Mehta, P. D.; Wisniewski, H. M.; Frey, H.; Nikkari, T., APOLIPOPROTEIN-E (APOE) POLYMORPHISM AND ITS INFLUENCE ON APOE CONCENTRATIONS IN THE CEREBROSPINAL-FLUID IN FINNISH PATIENTS WITH ALZHEIMERS-DISEASE. *Hum. Genet.* **1995**, *95* (1), 39-42.
236. Fukumoto, H.; Ingelsson, M.; Garevik, N.; Wahlund, L. O.; Nukina, N.; Yaguchi, Y.; Shibata, M.; Hyman, B. T.; Rebeck, G. W.; Irizarry, M. C., APOE epsilon 3/epsilon 4 heterozygotes have an elevated proportion of apolipoprotein E4 in cerebrospinal fluid relative to plasma, independent of Alzheimer's disease diagnosis. *Exp. Neurol.* **2003**, *183* (1), 249-253.
237. Taddei, K.; Clarnette, R.; Gandy, S. E.; Martins, R. N., Increased plasma apolipoprotein E (apoE) levels in Alzheimer's disease. *Neurosci. Lett.* **1997**, *223* (1), 29-32.
238. Liu, C.; Zhang, N.; Yu, H.; Chen, Y.; Liang, Y.; Deng, H.; Zhang, Z., Proteomic analysis of human serum for Finding pathogenic factors and potential biomarkers in preeclampsia. *Placenta* **2011**, *32* (2), 168-174.
239. Kuzyk, M. A.; Smith, D.; Yang, J. C.; Cross, T. J.; Jackson, A. M.; Hardie, D. B.; Anderson, N. L.; Borchers, C. H., Multiple Reaction Monitoring-based, Multiplexed, Absolute Quantitation of 45 Proteins in Human Plasma. *Mol. Cell. Proteomics* **2009**, *8* (8), 1860-1877.
240. Wildsmith, K. R.; Han, B. M.; Bateman, R. J., Method for the simultaneous quantitation of apolipoprotein E isoforms using tandem mass spectrometry. *Anal. Biochem.* **2009**, *395* (1), 116-118.

241. Stadtman, E. R.; Van Remmen, H.; Richardson, A.; Wehr, N. B.; Levine, R. L., Methionine oxidation and aging. *BBA-Proteins Proteomics* **2005**, *1703* (2), 135-140.
242. Liu, C.; Zhang, N.; Yu, H.; Chen, Y.; Liang, Y.; Deng, H.; Zhang, Z., Proteomic analysis of human serum for Finding pathogenic factors and potential biomarkers in preeclampsia. *Placenta* **2010**, *32* (2), 168-174.
243. Gevaert, K.; Van Damme, J.; Goethals, M.; Thomas, G. R.; Hoorelbeke, B.; Demol, H.; Martens, L.; Puype, M.; Staes, A.; Vandekerckhove, J., Chromatographic isolation of methionine-containing peptides for gel-free proteome analysis - Identification of more than 800 Escherichia coli proteins. *Mol. Cell. Proteomics* **2002**, *1* (11), 896-903.
244. Jaquinod, M.; Villiers, F.; Kieffer-Jaquinod, S.; Hugouvieu, V.; Bruley, C.; Garin, J.; Bourguignon, J., A proteomics dissection of Arabidopsis thaliana vacuoles isolated from cell culture. *Mol. Cell. Proteomics* **2007**, *6* (3), 394-412.
245. Huettenhain, R.; Malmstroem, J.; Picotti, P.; Aebersold, R., Perspectives of targeted mass spectrometry for protein biomarker verification. *Current Opinion in Chemical Biology* **2009**, *13* (5-6), 518-525.
246. Boughton, B. A.; Callahan, D. L.; Silva, C.; Bowne, J.; Nahid, A.; Rupasinghe, T.; Tull, D. L.; McConville, M. J.; Bacic, A.; Roessner, U., Comprehensive Profiling and Quantitation of Amine Group Containing Metabolites. *Anal. Chem.* **2011**, *83* (19), 7523-7530.
247. Teh, L. C.; Murphy, L. J.; Huq, N. L.; Surus, A. S.; Friesen, H. G.; Lazarus, L.; Chapman, G. E., Methionine oxidation in human growth hormone and human chorionic somatomotropin. Effects on receptor binding and biological activities. *J. Biol. Chem.* **1987**, *262* (14), 6472-6477.
248. Hayes, C. S.; Illades-Aguar, B.; Casillas-Martinez, L.; Setlow, P., In vitro and in vivo oxidation of methionine residues in small, acid-soluble spore proteins from Bacillus species. *J. Bacteriol.* **1998**, *180* (10), 2694-2700.
249. Kim, Y. H.; Berry, A. H.; Spencer, D. S.; Stites, W. E., Comparing the effect on protein stability of methionine oxidation versus mutagenesis: steps toward engineering oxidative resistance in proteins. *Protein Eng.* **2001**, *14* (5), 343-347.
250. Glaser, C. B.; Yamin, G.; Uversky, V. N.; Fink, A. L., Methionine oxidation, alpha-synuclein and Parkinson's disease. *BBA-Proteins Proteomics* **2005**, *1703* (2), 157-169.
251. Uversky, V. N.; Yamin, G.; Souillac, P. O.; Goers, J.; Glaser, C. B.; Fink, A. L., Methionine oxidation inhibits fibrillation of human alpha-synuclein in vitro. *FEBS Lett.* **2002**, *517* (1-3), 239-244.
252. Van Damme, P.; Van Damme, J.; Demol, H.; Staes, A.; Vandekerckhove, J.; Gevaert, K., A review of COFRADIC techniques targeting protein N-terminal acetylation. *BMC proceedings* **2009**, *3 Suppl 6*, S6.
253. Ghesquiere, B.; Jonckheere, V.; Colaert, N.; Van Durme, J.; Timmerman, E.; Goethals, M.; Schymkowitz, J.; Rousseau, F.; Vandekerckhove, J.; Gevaert, K., Redox proteomics of protein-bound methionine oxidation. *Molecular & cellular proteomics : MCP* **2011**, *10* (5), M110.006866.
254. Gevaert, K.; Pinxteren, J.; Demol, H.; Hugelier, K.; Staes, A.; Van Damme, J.; Martens, L.; Vandekerckhove, J., Four stage liquid chromatographic selection of methionyl peptides for peptide-centric proteome analysis: The proteome of human multipotent adult progenitor cells. *J. Proteome Res.* **2006**, *5* (6), 1415-1428.
255. Pesavento, J. J.; Garcia, B. A.; Streeky, J. A.; Kelleher, N. L.; Mizzen, C. A., Mild performic acid oxidation enhances chromatographic and top down mass spectrometric analyses of histones. *Mol. Cell. Proteomics* **2007**, *6* (9), 1510-1526.
256. Froelich, J. M.; Reid, G. E., The origin and control of ex vivo oxidative peptide modifications prior to mass spectrometry analysis. *Proteomics* **2008**, *8* (7), 1334-1345.
257. Cao, R.; Liu, Y. S.; Chen, P.; Lv, R.; Song, Q.; Sheng, T. T.; He, Q. Y.; Wang, Y.; Wang, X. C.; Liang, S. P., Improvement of hydrophobic integral membrane protein identification by mild performic acid oxidation-assisted digestion. *Anal. Biochem.* **2010**, *407* (2), 196-204.

258. Dai, J. Q.; Zhang, Y. J.; Wang, J. L.; Li, X. H.; Lu, Z.; Cai, Y.; Qian, X. H., Identification of degradation products formed during performic oxidation of peptides and proteins by high-performance liquid chromatography with matrix-assisted laser desorption/ionization and tandem mass spectrometry. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **2005**, *19* (9), 1130-1138.
259. Shchepin, R.; Moller, M. N.; Kim, H. Y. H.; Hatch, D. M.; Bartesaghi, S.; Kalyanaraman, B.; Radi, R.; Porter, N. A., Tyrosine-Lipid Peroxide Adducts from Radical Termination: Para Coupling and Intramolecular Diels-Alder Cyclization. *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132* (49), 17490-17500.
260. *The Protein Protocols Handbook, 2nd Edition.* Humana Press Inc., Totowa, NJ: 2002.
261. de Villiers, A.; Lestremau, F.; Szucs, R.; Gelebart, S.; David, F.; Sandra, P., Evaluation of ultra performance liquid chromatography - Part I. Possibilities and limitations. *J. Chromatogr. A* **2006**, *1127* (1-2), 60-69.
262. Kim, J.; Basak, J. M.; Holtzman, D. M., The Role of Apolipoprotein E in Alzheimer's Disease. *Neuron* **2009**, *63* (3), 287-303.
263. Slooter, A. J. C.; Cruts, M.; Kalmijn, S.; Hofman, A.; Breteler, M. M. B.; Van Broeckhoven, C.; van Duijn, C. M., Risk estimates of dementia by apolipoprotein E genotypes from a population-based incidence study: The Rotterdam study. *Arch. Neurol.* **1998**, *55* (7), 964-968.
264. Haddy, N.; De Bacquer, D.; Chemaly, M. M.; Maurice, M.; Ehnholm, C.; Evans, A.; Sans, S.; Martins, M. D.; De Backer, G.; Siest, G.; Visvikis, S., The importance of plasma concentration in addition apolipoprotein E to its common polymorphism on inter-individual variation in lipid levels: results from Apo Europe. *Eur. J. Hum. Genet.* **2002**, *10* (12), 841-850.
265. Phillips, N. R.; Havel, R. J.; Kane, J. P., SEX-RELATED DIFFERENCES IN THE CONCENTRATIONS OF APOLIPOPROTEIN-E IN HUMAN-BLOOD PLASMA AND PLASMA-LIPOPROTEINS. *J. Lipid Res.* **1983**, *24* (11), 1525-1531.
266. Havel, R. J.; Kotite, L.; Vigne, J. L.; Kane, J. P.; Tun, P.; Phillips, N.; Chen, G. C., RADIOIMMUNOASSAY OF HUMAN ARGININE-RICH APOLIPOPROTEIN, APOPROTEIN-E - CONCENTRATION IN BLOOD-PLASMA AND LIPOPROTEINS AS AFFECTED BY APOPROTEIN-E-3 DEFICIENCY. *J. Clin. Invest.* **1980**, *66* (6), 1351-1362.
267. Noma, A.; Hata, Y.; Goto, Y., QUANTITATION OF SERUM APOLIPOPROTEIN-A-I, APOLIPOPROTEIN-A-II, APOLIPOPROTEIN-B, APOLIPOPROTEIN-C-II, APOLIPOPROTEIN-C-III AND APOLIPOPROTEIN-E IN HEALTHY JAPANESE BY TURBIDIMETRIC IMMUNOASSAY - REFERENCE VALUES, AND AGE-RELATED AND SEX-RELATED DIFFERENCES. *Clin. Chim. Acta* **1991**, *199* (2), 147-157.
268. Vincent-Viry, M.; Schiele, F.; Gueguen, R.; Bohnet, K.; Visvikis, S.; Siest, G., Biological variations and genetic reference values for apolipoprotein E serum concentrations: Results from the STANISLAS cohort study. *Clin. Chem.* **1998**, *44* (5), 957-965.
269. Siest, G.; Zaiou, M.; Visvikis, S., Human apolipoprotein E concentration in response to diseases and therapeutic treatments. *Drug Dev. Res.* **2002**, *56* (2), 95-110.
270. Lecomte, E.; Herbeth, B.; Paille, F.; Steinmetz, J.; Artur, Y.; Siest, G., Changes in serum apolipoprotein and lipoprotein profile induced by chronic alcohol consumption and withdrawal: Determinant effect on heart disease? *Clin. Chem.* **1996**, *42* (10), 1666-1675.
271. Schiele, F.; De Bacquer, D.; Vincent-Viry, M.; Beisiegel, U.; Ehnholm, C.; Evans, A.; Kafatos, A.; Martins, M. C.; Sans, S.; Sass, C.; Visvikis, S.; De Backer, G.; Siest, G.; ApoEurope, G., Apolipoprotein E serum concentration and polymorphism in six European countries: the ApoEurope Project. *Atherosclerosis* **2000**, *152* (2), 475-488.
272. Mojtahedi, Z.; Khademi, B.; Hashemi, S. B.; Abtahi, S. M. B.; Ghasemi, M. A.; Fattahi, M. J.; Ghaderi, A., Serum Interleukine-6 Concentration, But Not Interleukine-18, is Associated with Head and Neck Squamous Cell Carcinoma Progression. *Pathol. Oncol. Res.* **2011**, *17* (1), 7-10.
273. Page, J. S.; Kelly, R. T.; Tang, K.; Smith, R. D., Ionization and transmission efficiency in an electrospray ionization-mass spectrometry interface. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **2007**, *18* (9), 1582-1590.

274. Tang, K. Q.; Lin, Y. H.; Matson, D. W.; Kim, T.; Smith, R. D., Generation of multiple electrosprays using microfabricated emitter arrays for improved mass spectrometric sensitivity. *Anal. Chem.* **2001**, *73* (8), 1658-1663.
275. Kelly, R. T.; Page, J. S.; Zhao, R.; Qian, W. J.; Mottaz, H. M.; Tang, K. Q.; Smith, R. D., Capillary-based multi nanoelectrospray emitters: Improvements in ion transmission efficiency and implementation with capillary reversed-phase LC-ESI-MS. *Anal. Chem.* **2008**, *80* (1), 143-149.
276. Hossain, M.; Kaleta, D. T.; Robinson, E. W.; Liu, T.; Zhao, R.; Page, J. S.; Kelly, R. T.; Moore, R. J.; Tang, K. Q.; Camp, D. G.; Qian, W. J.; Smith, R. D., Enhanced Sensitivity for Selected Reaction Monitoring Mass Spectrometry-based Targeted Proteomics Using a Dual Stage Electrodynamical Ion Funnel Interface. *Mol. Cell. Proteomics* **2011**, *10* (2).
277. Mirzaei, H.; Regnier, F., Enhancing electrospray ionization efficiency of peptides by derivatization. *Anal. Chem.* **2006**, *78* (12), 4175-4183.
278. Walker, S. H.; Lilley, L. M.; Enamorado, M. F.; Comins, D. L.; Muddiman, D. C., Hydrophobic Derivatization of N-linked Glycans for Increased Ion Abundance in Electrospray Ionization Mass Spectrometry. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **2011**, *22* (8), 1309-1317.
279. Salvador, A.; Moretton, C.; Píram, A.; Faure, R., On-line solid-phase extraction with on-support derivatization for high-sensitivity liquid chromatography tandem mass spectrometry of estrogens in influent/effluent of wastewater treatment plants. *J. Chromatogr. A* **2007**, *1145* (1-2), 102-109.
280. Guilleme, D.; Heinisch, S.; Rocca, J. L., Effect of temperature in reversed phase liquid chromatography. *J. Chromatogr. A* **2004**, *1052* (1-2), 39-51.
281. Skoog, B.; Wichman, A., CALCULATION OF THE ISOELECTRIC POINTS OF POLYPEPTIDES FROM THE AMINO-ACID-COMPOSITION. *Trac-Trends Anal. Chem.* **1986**, *5* (4), 82-83.
282. Bull, H. B.; Breese, K., SURFACE-TENSION OF AMINO-ACID SOLUTIONS - HYDROPHOBICITY SCALE OF AMINO-ACID RESIDUES. *Arch. Biochem. Biophys.* **1974**, *161* (2), 665-670.
283. Gilar, M.; Olivova, P.; Daly, A. E.; Gebler, J. C., Two-dimensional separation of peptides using RP-RP-HPLC system with different pH in first and second separation dimensions. *J. Sep. Sci.* **2005**, *28* (14), 1694-1703.
284. Eggink, M.; Romero, W.; Vreuls, R. J.; Lingeman, H.; Niessen, W. M. A.; Irth, H., Development and optimization of a system for comprehensive two-dimensional liquid chromatography with UV and mass spectrometric detection for the separation of complex samples by multi-step gradient elution. *J. Chromatogr. A* **2008**, *1188* (2), 216-226.
285. CRC Handbook of Chemistry and Physics, Internet Version 2005, CRC Press, Boca, Raton, FL. David R. Lide, e., Ed. 2005.
286. Kostianen, R.; Kauppila, T. J., Effect of eluent on the ionization process in liquid chromatography-mass spectrometry. *J. Chromatogr. A* **2009**, *1216* (4), 685-699.
287. Fritz, R.; Ruth, W.; Kragl, U., Assessment of acetone as an alternative to acetonitrile in peptide analysis by liquid chromatography/mass spectrometry. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **2009**, *23* (14), 2139-2145.
288. Iribarne, J. V.; Thomson, B. A., EVAPORATION OF SMALL IONS FROM CHARGED DROPLETS. *J. Chem. Phys.* **1976**, *64* (6), 2287-2294.
289. Colin, H.; Diezmasa, J. C.; Guiochon, G.; Czajkowska, T.; Miedziak, I., ROLE OF THE TEMPERATURE IN REVERSED-PHASE HIGH-PERFORMANCE LIQUID-CHROMATOGRAPHY USING PYROCARBON-CONTAINING ADSORBENTS. *Journal of Chromatography* **1978**, *167* (DEC), 41-65.
290. Giorgianni, F.; Cappiello, A.; Baranova-Giorgianni, S.; Palma, P.; Trufelli, H.; Desiderio, D. M., LC-MS/MS analysis of peptides with methanol as organic modifier: Improved limits of detection. *Anal. Chem.* **2004**, *76* (23), 7028-7038.
291. Keppel, T. R.; Jacques, M. E.; Weis, D. D., The use of acetone as a substitute for acetonitrile in analysis of peptides by liquid chromatography/electrospray ionization mass spectrometry. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **2010**, *24* (1), 6-10.

292. Hao, Z. G.; Xiao, B. M.; Weng, N. D., Impact of column temperature and mobile phase components on selectivity of hydrophilic interaction chromatography (HILIC). *J. Sep. Sci.* **2008**, *31* (9), 1449-1464.
293. Alpert, A. J., HYDROPHILIC-INTERACTION CHROMATOGRAPHY FOR THE SEPARATION OF PEPTIDES, NUCLEIC-ACIDS AND OTHER POLAR COMPOUNDS. *Journal of Chromatography* **1990**, *499*, 177-196.
294. Dejaegher, B.; Heyden, Y. V., HILIC methods in pharmaceutical analysis. *J. Sep. Sci.* **2010**, *33* (6-7), 698-715.
295. Shou, W. Z.; Chen, Y. L.; Eerkes, A.; Tang, Y. Q.; Magis, L.; Jiang, X. Y.; Weng, N. D., Ultrafast liquid chromatography/tandem mass spectrometry bioanalysis of polar analytes using packed silica columns. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **2002**, *16* (17), 1613-1621.
296. Grumbach, E. S.; Diehl, D. M.; Neue, U. D., The application of novel 1.7 μm ethylene bridged hybrid particles for hydrophilic interaction chromatography. *J. Sep. Sci.* **2008**, *31* (9), 1511-1518.
297. Van Dorpe, S.; Vergote, V.; Pezeshki, A.; Burvenich, C.; Peremans, K.; De Spiegeleer, B., Hydrophilic interaction LC of peptides: Columns comparison and clustering. *J. Sep. Sci.* **2010**, *33* (6-7), 728-739.
298. Boersema, P. J.; Mohammed, S.; Heck, A. J. R., Hydrophilic interaction liquid chromatography (HILIC) in proteomics. *Anal. Bioanal. Chem.* **2008**, *391* (1), 151-159.
299. Yoshida, T., Peptide separation in normal phase liquid chromatography. *Anal. Chem.* **1997**, *69* (15), 3038-3043.
300. Hemstrom, P.; Irgum, K., Hydrophilic interaction chromatography. *J. Sep. Sci.* **2006**, *29* (12), 1784-1821.
301. Chirita, R. I.; West, C.; Finaru, A. L.; Elfakir, C., Approach to hydrophilic interaction chromatography column selection: Application to neurotransmitters analysis. *J. Chromatogr. A* **2010**, *1217* (18), 3091-3104.
302. Fountain, K. J.; Xu, J.; Diehl, D. M.; Morrison, D., Influence of stationary phase chemistry and mobile-phase composition on retention, selectivity, and MS response in hydrophilic interaction chromatography. *J. Sep. Sci.* **2010**, *33* (6-7), 740-751.
303. Chauve, B.; Guillarme, D.; Cleon, P.; Veuthey, J. L., Evaluation of various HILIC materials for the fast separation of polar compounds. *J. Sep. Sci.* **2010**, *33* (6-7), 752-764.
304. Chirita, R. I.; West, C.; Zubrzycki, S.; Finaru, A. L.; Elfakir, C., Investigations on the chromatographic behaviour of zwitterionic stationary phases used in hydrophilic interaction chromatography. *J. Chromatogr. A* **2011**, *1218* (35), 5939-5963.
305. Zook, D. R.; Forsmo-Bruce, H.; Briem, S., ESI-MS response characteristics of a synthetic peptide. *Chromatographia* **2000**, *52*, S60-S64.
306. Wujcik, C. E.; Tweed, J.; Kadar, E. P., Application of hydrophilic interaction chromatography retention coefficients for predicting peptide elution with TFA and methanesulfonic acid ion-pairing reagents. *J. Sep. Sci.* **2010**, *33* (6-7), 826-833.
307. Yang, Y. Z.; Boysen, R. I.; Hearn, M. T. W., Hydrophilic interaction chromatography coupled to electrospray mass spectrometry for the separation of peptides and protein digests. *J. Chromatogr. A* **2009**, *1216* (29), 5518-5524.
308. Hewavitharana, A. K.; Herath, H.; Shaw, P. N.; Cabot, P. J.; Kebarle, P., Effect of solvent and electrospray mass spectrometer parameters on the charge state distribution of peptides - a case study using liquid chromatography/mass spectrometry method development for beta-endorphin assay. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **2010**, *24* (24), 3510-3514.
309. Iavarone, A. T.; Jurchen, J. C.; Williams, E. R., Effects of solvent on the maximum charge state and charge state distribution of protein ions produced by electrospray ionization. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **2000**, *11* (11), 976-985.

310. Sterling, H. J.; Williams, E. R., Origin of Supercharging in Electrospray Ionization of Noncovalent Complexes from Aqueous Solution. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **2009**, *20* (10), 1933-1943.
311. Sterling, H. J.; Daly, M. P.; Feld, G. K.; Thoren, K. L.; Kintzer, A. F.; Krantz, B. A.; Williams, E. R., Effects of Supercharging Reagents on Noncovalent Complex Structure in Electrospray Ionization from Aqueous Solutions. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **2010**, *21* (10), 1762-1774.
312. Zubarev, R. A.; Kelleher, N. L.; McLafferty, F. W., Electron capture dissociation of multiply charged protein cations. A nonergodic process. *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, *120* (13), 3265-3266.
313. Iavarone, A. T.; Williams, E. R., Supercharging in electrospray ionization: effects on signal and charge. *Int. J. Mass Spectrom.* **2002**, *219* (1), 63-72.
314. Iavarone, A. T.; Jurchen, J. C.; Williams, E. R., Supercharged protein and peptide ions formed by electrospray ionization. *Anal. Chem.* **2001**, *73* (7), 1455-1460.
315. Siu, K. W. M.; Guevremont, R.; Leblanc, J. C. Y.; O'Brien, R. T.; Berman, S. S., IS DROPLET EVAPORATION CRUCIAL IN THE MECHANISM OF ELECTROSPRAY MASS-SPECTROMETRY. *Org. Mass Spectrom.* **1993**, *28* (5), 579-584.
316. Yin, S.; Loo, J. A., Top-down mass spectrometry of supercharged native protein-ligand complexes. *Int. J. Mass Spectrom.* **2011**, *300* (2-3), 118-122.
317. Kjeldsen, F.; Giessing, A. M. B.; Ingrell, C. R.; Jensen, O. N., Peptide sequencing and characterization of post-translational modifications by enhanced ion-charging and liquid chromatography electron-transfer dissociation tandem mass spectrometry. *Anal. Chem.* **2007**, *79* (24), 9243-9252.
318. Unger, K. K.; Racaiyte, K.; Wagner, K.; Miliotis, T.; Edholm, L. E.; Bischoff, R.; Marko-Varga, G., Is multidimensional high performance liquid chromatography (HPLC) an alternative in protein analysis to 2D gel electrophoresis? *HRC-J. High Resolut. Chromatogr.* **2000**, *23* (3), 259-265.
319. Motoyama, A.; Yates, J. R., Multidimensional LC separations in shotgun proteomics. *Anal. Chem.* **2008**, *80* (19), 7187-7193.
320. Gilar, M.; Olivova, P.; Daly, A. E.; Gebler, J. C., Orthogonality of separation in two-dimensional liquid chromatography. *Anal. Chem.* **2005**, *77* (19), 6426-6434.
321. Liu, A.; Tweed, J.; Wujcik, C. E., Investigation of an on-line two-dimensional chromatographic approach for peptide analysis in plasma by LC-MS-MS. *J. Chromatogr. B* **2009**, *877* (20-21), 1873-1881.
322. Jian, W. Y.; Edom, R. W.; Xu, Y. D.; Weng, N. D., Recent advances in application of hydrophilic interaction chromatography for quantitative bioanalysis. *J. Sep. Sci.* **2010**, *33* (6-7), 681-697.
323. McCalley, D. V., Evaluation of the properties of a superficially porous silica stationary phase in hydrophilic interaction chromatography. *J. Chromatogr. A* **2008**, *1193* (1-2), 85-91.
324. Kulasingam, V.; Smith, C. R.; Batruch, H.; Buckler, A.; Jeffery, D. A.; Diamandis, E. P., "Product ion monitoring" assay for prostate-specific antigen in serum using a linear ion-trap. *J. Proteome Res.* **2008**, *7* (2), 640-647.
325. Wilson, D. H.; Hanlon, D. W.; Provuncher, G. K.; Chang, L.; Song, L. N.; Patel, P. P.; Ferrell, E. P.; Lopor, H.; Partin, A. W.; Chan, D. W.; Sokoll, L. J.; Cheli, C. D.; Thiel, R. P.; Fournier, D. R.; Duffy, D. C., Fifth-Generation Digital Immunoassay for Prostate-Specific Antigen by Single Molecule Array Technology. *Clin. Chem.* **2011**, *57* (12), 1712-1721.
326. Enjalbert, Q.; Simon, R.; Salvador, A.; Antoine, R.; Redon, S.; Ayhan, M. M.; Darbour, F.; Chambert, S.; Bretonniere, Y.; Dugourd, P.; Lemoine, J., Photo-SRM: laser-induced dissociation improves detection selectivity of selected reaction monitoring mode. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **2011**, *25* (22), 3375-3381.

Résumé

En recherche clinique ou environnementale, les biomarqueurs protéiques présentent un intérêt croissant. Bien que les immuno-dosages restent les méthodes de référence pour leur quantification, les récentes avancées en spectrométrie de masse (MS) font de cette technique une alternative crédible à l'ELISA. Ce travail apporte quelques éléments méthodologiques pour repousser certaines limitations de la MS.

D'abord, deux dosages ont été proposés. Celui réalisé chez *G. fossarum* représente le premier exemple de dosage de la Vitellogénine chez un invertébré par LC-MS/MS. L'un des défis de la méthode présentée est de doser spécifiquement une protéine dans un organisme dont le génome est majoritairement inconnu. Le second dosage concerne les peptides contenant une méthionine. Nous avons développé un protocole d'oxydation des méthionines afin de s'affranchir du biais lié à leur oxydation partielle. Cette méthode a ensuite été appliquée à une protéine impliquée dans la maladie d'Alzheimer (l'Apolipoprotéine E4) dans une cohorte de 673 plasmas. Ce dosage est à ce jour l'une des plus grandes études réalisées par LC-MS/MS et montre toute la robustesse de cette approche.

Enfin, l'influence de la phase mobile sur la sensibilité des dosages de peptides a été étudiée : d'abord en phase inverse, où le méthanol est une bonne alternative à l'acétonitrile ; ensuite en HILIC, où les difficultés liées à l'étude d'ions multichargés en milieu majoritairement organique ont été abordées. Les problèmes liés à la capacité de charge des colonnes ont également été soulevés. La chromatographie HILIC reste prometteuse pour la quantification de peptides puisqu'un facteur dix en sensibilité peut être apporté.

Mots clés :

Biomarqueurs protéiques, quantification absolue, spectrométrie de masse, chromatographie liquide

Abstract

Both in clinical and environmental research, protein biomarkers are of growing interest. Although immunoassays are the gold standard for their quantification, recent advances in mass spectrometry (MS) make this technique a viable alternative to ELISA. This work provides some methodological elements to eliminate some limitations of the MS approach.

First, two assays have been proposed. The first one achieved for *G. fossarum* represents the first example of quantification of vitellogenin in an invertebrate by LC-MS/MS. One of the challenges of the presented method is to specifically assay a protein in an organism whose genome is largely unknown. The second assay relates to methionine-containing peptides. A protocol was developed for total oxidation of methionines in order to overcome the bias due to their partial oxidation. This method was then applied to a protein involved in Alzheimer's disease (Apolipoprotein E4) in a cohort of 673 plasma samples. This assay is to date one of the largest study carried out by LC-MS/MS and shows all the robustness of this approach.

Lastly, the influence of the mobile phase on the sensitivity of peptides assays was studied: first in reversed phase, where methanol is a good alternative to acetonitrile; then in HILIC, where the difficulties associated with the study of multicharged ions in a mainly organic content were discussed. Problems related to the carrying capacity of the columns were also raised. HILIC chromatography is a promising technique for the quantification of peptides since a factor of ten in sensitivity can be obtained.

Key words:

Protein biomarkers, Absolute quantification, Mass spectrometry, Liquid chromatography.