



HAL
open science

Développement d'une méthode de séparation électrocinétique de biomarqueurs de la polyneuropathie amyloïde familiale à transthyrétine : vers une miniaturisation de l'analyse

Sonia Korchane

► **To cite this version:**

Sonia Korchane. Développement d'une méthode de séparation électrocinétique de biomarqueurs de la polyneuropathie amyloïde familiale à transthyrétine : vers une miniaturisation de l'analyse. Chimie analytique. Université Paris Sud - Paris XI, 2014. Français. NNT : 2014PA112112 . tel-01056470

HAL Id: tel-01056470

<https://theses.hal.science/tel-01056470>

Submitted on 20 Aug 2014

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.

UNIVERSITE PARIS-SUD

ÉCOLE DOCTORALE de chimie Paris-Sud
Institut Galien Paris-Sud

Chimie Analytique

THÈSE DE DOCTORAT

soutenue le 19/05/2014

par **Sonia KORCHANE**

Développement d'une méthode de séparation électrocinétique
de biomarqueurs de la polyneuropathie amyloïde familiale à
transthyrétine: vers une miniaturisation de l'analyse

Directeur de thèse : Isabelle LE POTIER Maître de conférences (Université Paris-Sud, CNRS UMR 8612)

Composition du jury :

<i>Président du jury :</i>	Christian POÛS	Professeur (Université Paris-Sud, Faculté de pharmacie)
<i>Rapporteurs :</i>	Catherine PERRIN	Professeur (UFR de Pharmacie de Montpellier, CNRS UMR 5247)
	Stéphanie DESCROIX	Chargé de recherche (Institut Curie, MMBM CNRS, Paris)
<i>Examineurs :</i>	Régis DANIEL	Directeur de recherche (Université Evry Val d'Essonne, UMR CNRS 8587)
<i>Membres invités :</i>	Antoine PALLANDRE	Maître de conférence (Université Paris-Sud, CNRS UMR 8612)

A Mehdi, pour ton soutien infallible

A Adam, la prunelle de mes yeux

A mes parents, pour avoir fait de moi ce que je suis

« Quel que soit votre vie future, faites qu'elle soit utile. Pour cela, attachez-vous à réaliser un progrès, si modeste qu'il puisse vous paraître dans l'œuvre que vous aurez choisi. Soyez certain que vous aiderez ainsi au bien-être général. »

Gustave Eiffel

Remerciements

C'est avec un grand plaisir que je réserve ces quelques pages comme signe de gratitude et de profond respect à toutes les personnes qui, de près ou de loin, ont participé à la réussite de cette thèse dans les meilleures conditions.

Je remercie L'Agence Nationale de la recherche (ANR) pour avoir financé ma thèse. Cette thèse qui s'est déroulée au sein de l'équipe de Protéines et Nanotechnologies en Sciences Séparatives de l'Institut Galien Paris-Sud. Je remercie donc Elias FATTAL pour son accueil au sein de l'UMR 8612 ainsi que Myriam TAVERNA pour son accueil chaleureux au sein du laboratoire ainsi que pour ses nombreuses discussions scientifiques très enrichissantes.

Je souhaiterais remercier vivement, tous les membres du jury pour avoir accepté d'évaluer ce travail de thèse.

Mes remerciements les plus sincères s'adressent aussi à ma directrice de thèse Isabelle LE POTIER, qui, tout au long de cette thèse m'a encadrée, orientée et motivée. Je vous remercie aussi pour votre disponibilité et vos nombreux conseils. A ces remerciements, je souhaiterais joindre Antoine PALLANDRE, qui a su être présent et à l'écoute pendant ces années de thèse. Merci pour m'avoir initié à la microfluidique et pour toutes ces heures que tu as su libérer pour les manip malgré les enseignements.

La thèse est avant tout une aventure humaine d'une grande richesse. Je souhaiterais donc réserver ces quelques lignes pour remercier tout les membres de l'équipe de Protéines et Nanotechnologies en Sciences Séparatives de l'Institut Galien Paris-Sud. Tout particulièrement mes compagnons de route Ludivide et Kiarach. Merci pour votre amitié, votre soutien infailible jusqu'à la dernière minute.

A tous ceux qui ont partagé mon bureau, un repas, un café ou un thé merci pour votre si sympathique compagnie : Ly, Ichraf, Nacera, Monica, Farid, Mohamed, Romain, Alison, Reda...

Je remercie aussi les deux stagiaires qui ont travaillé avec moi pendant cette thèse. D'abord la charmante Marie-Chinda, je te souhaite de devenir, une imminente analyste de la police scientifique (comme dans « Les experts » !). Je remercie aussi Nidia, qui a su être une stagiaire exemplaire tant du point de vue des manip que du point de vue de ton humeur toujours, agréable. Vous avez toutes les deux contribué à l'obtention des résultats obtenus dans cette thèse, et vous encadrer a été pour moi une très belle expérience aussi bien du point de vue scientifique qu'humain.

Merci à Thuy TRAN, pour nos virées sportives (enfin presque sportives!). Merci à Marie-Claude ANMELLA pour tes bons gâteaux et pour ton aide pour toutes les démarches administratives. Merci à Claire SMADJA, pour nos nombreuses discussions, et débats, toujours très enrichissants.

Je remercie aussi Claire GUEUTIN, pour m'avoir permis de faire quelques heures d'enseignements dans son UE. Ce fut une excellente opportunité pour moi de découvrir l'enseignement, et de voir à quel point je m'y plais.

Je remercie aussi les administratifs de l'institut Galien Paris-sud, Sylvie, Patricia et Dominique pour leurs disponibilités et leurs aides pour effectuer toutes les démarches.

Lors de ma thèse, j'ai eu l'occasion de travailler au sein de différents laboratoires ce qui m'a permis de rencontrer des personnes formidables que je souhaite remercier. Je commencerai par Mme Anne-Marie HAGHIRI GOSNET, pour son aimable accueil au sein de son groupe Nanotechnologie et Dispositifs Microfluidiques au LPN. Je remercie aussi toutes les personnes avec qui j'ai eu l'occasion de travailler au LPN pour leur aimable assistance et collaboration : Syrine, Sébastien, Anne-Claire...

Je remercie aussi Régis DANIEL et Florence GONNET pour leur accueil au sein du Laboratoire d'Analyse et Modélisation pour la Biologie et l'Environnement (LAMBE), laboratoire dans lequel j'ai eu l'occasion de faire des expériences en spectrométrie de masse. Je remercie aussi Cédric PRZYBYLSKI pour m'avoir initié à la spectrométrie de masse et aussi pour ces précieuses corrections de la partie masse de ce manuscrit.

Je remercie aussi Mehdi, mon âme sœur, pour son amour, soutiens et aide très précieuse dans l'élaboration de ce manuscrit. Tu as passé des nuits entières à chercher le bon code « Latex » pour la bonne couleur de bleu, le bon espacement, la bonne mise en forme de ma thèse. De plus tu as accepté tant de sacrifices pendant ces quatre années pour que je puisse faire cette thèse dans les meilleures conditions. Un seul mot MERCI.

Table des matières

Introduction générale	1
Chapitre 1 Introduction bibliographique	5
A Les amyloses	5
I Généralités	5
II Les amyloses à transthyréline	7
II.1 La transthyréline (TTR)	8
II.2 Amylose à TTR non mutante	9
II.3 Amylose à TTR mutante	9
B Electrophorèse capillaire et spectrométrie de masse pour l'analyse des peptides et des protéines	18
I L'électrophorèse capillaire (EC)	18
I.1 Les phénomènes de transport en EC	18
I.2 Efficacité et résolution	21
I.3 Limitations de l'EC	23
I.4 Les principaux modes de séparation en EC	24
I.5 Les principaux modes de détection en EC	26
II La spectrométrie de masse (MS)	32
II.1 Les sources d'ionisation	33
II.2 Les analyseurs	36
Chapitre 2 Étude de la digestion enzymatique de la transthyréline	39

A	Développement de la méthode de digestion enzymatique de la TTR et contrôle de son efficacité par MS	40
B	Développement de la méthode d'analyse des fragments peptidiques de la TTR par EC couplée à la détection par absorption dans l'UV	49
I	Étude préliminaire : séparation des peptides d'intérêt pour l'étude de la substitution TTR Thr49Ala	49
I.1	Optimisation de la séparation	49
I.2	Validation de la méthode	52
II	Carte peptidique de la TTR	53
C	Conclusions	57

Chapitre 3 Dérivation des peptides d'intérêt pour l'étude de la substitution TTR Thr49Ala 59

A	Optimisation du marquage des peptides natif et mutant par des réactifs fluorogènes	60
I	Marquage des peptides PN et PM par le NDA	62
I.1	Mise en place du couplage EC-LIF à 442 nm	62
I.2	Optimisation de la réaction de marquage	67
I.3	Contrôle de la réaction de marquage par spectrométrie de masse	73
II	Marquage des peptides par le FQ	75
II.1	Développement de la réaction de marquage	76
II.2	Contrôle de la réaction de marquage par analyse par spectrométrie de masse	81
B	Optimisation du marquage des peptides par des réactifs fluorescents	86
I	Marquage des peptides par les dérivés de la fluorescéine	86
II	Marquage des peptides par le TAMRA-SE	90
C	Conclusions	96

Chapitre 4	Séparation électrocinétique des peptides natif et mutant après marquage fluorescent	99
A	Séparations électrocinétiques en EC-LIF	100
I	Séparation EC-LIF des dérivés obtenus par marquage avec le NDA des peptides PN et PM	100
I.1	Optimisation de la méthode de séparation	100
I.2	Validation de la méthode	107
II	Séparation EC-LIF des dérivés obtenus par marquage avec le FQ des peptides PN et PM	109
II.1	Optimisation de la méthode de séparation	109
II.2	Validation de la méthode de séparation	110
III	Optimisation de la séparation EC-LIF des dérivés obtenus par dérivé avec le TAMRA-SE des peptides PN et PM	111
IV	Conclusions	115
B	Séparations électrocinétiques sur puce microfluidique	117
I	Mise en place du poste d'analyse sur puces	118
II	Séparations sur puce microfluidique	124
II.1	Diminution du flux résiduel dans le canal de séparation	124
II.2	Séparations électrocinétiques	125
	Conclusion et perspectives	131
Annexe A	Procédures d'analyse SDS-PAGE, de digestion en gel et récapitulatif des résultats de MS	136
I	Analyse de la TTR sur gel de polyacrylamide en présence de SDS	136
II	Digestion trypsique en gel de la TTR	139
III	Tableau récapitulatif des analyses en spectrométrie de masse de l'échantillon de TTR issu de patient	141
IV	Analyse NanoLC-MS/MS	141

Annexe B	Protocoles et outils	143
I	Protocole de marquage des peptides par le NDA	143
II	Protocole de dessalage des peptides par le NDA	143
III	Protocole de marquage des peptides par le FQ	144
IV	Spectre de masse MALDI-TOF entre 300 et 5000 m/z	145
V	Tableau de calcul de masse des peptides résidus d'acides aminés	145
VI	Dérivation des peptides avec FITC	148
VII	Dérivation des peptides avec NHS fluoresceine	148
VIII	Rinçage du capillaire pour l'analyse des solutions de peptides marqués par le NHS-Fluoresceine	149
IX	Dérivation des peptides avec TAMRA-SE	149
X	Rinçages de la puce	149
	Bibliographie	151

Table des figures

1.1	Organisation structurelle des fibrilles amyloïdes. Plaque amyloïde (gauche), électromyographe de fibrilles (milieu) et feuillets bêta (droite)	7
1.2	Séquence de la transthyréine	8
1.3	Représentation tridimensionnelle du tétramère de la TTR. Chaque monomère est représenté en une couleur différente. Les flèches en gras représentent les sites de fixation de la RBP/vitamine A	9
1.4	Mécanisme de formation des fibrilles amyloïdes de la TTR	10
1.5	Formule brute et développée du tafamidis	16
1.6	Schéma de principe du silençage génique	16
1.7	Différentes stratégies thérapeutiques en cours de développement pour le traitement des neuropathies amyloïdes familiales à TTR	17
1.8	Recommandations thérapeutiques des neuropathies amyloïdes héréditaires	17
1.9	Schéma représentant la double couche et le flux électro-osmotique au sein d'un capillaire de silice vierge	20
1.10	Profil d'écoulement (a) parabolique en HPLC, (b) plat en EC	22
1.11	Diagramme de Jablonski pour la fluorescence	28
1.12	schéma d'un détecteur LIF. Faisceau d'excitation (trait plein). Faisceau d'émission (tirets)	29
1.13	Représentation schématique d'une analyse par spectrométrie de masse	33
1.14	Représentation du processus de désorption/ionisation par MALDI	34
1.15	Représentation du principe de l'électronébulisation	35
1.16	Représentation d'une détection après analyse en temps de vol en mode réflecteur	36

1.17	Représentation de la trajectoire des ions (en rouge) dans un analyseur de type Orbitrap	38
2.1	Schéma représentant les étapes pour la préparation de l'échantillon de TTR avant analyse en EC-UV : extraction du sérum, digestion trypsique	41
2.2	Analyse par spectrométrie de masse MALDI-TOF en détection positive et matrice CHCA du digestat de la TTR mode réflectron	43
2.3	Analyses nanoLC-ESI-MS/MS du digestat de la TTR (A) le courant ionique total comprenant (B) le spectre MS des ions $[M+2H/2]^{2+}$ et $[M+3H/3]^{3+}$ correspondant au peptide PN	44
2.4	Identification MASCOT des différentes protéines présentes dans l'échantillon de digestat de la TTR	45
2.5	Courant ionique total obtenu lors de l'analyse du digestat de TTR (noir). Extraction de l'ion (XIC) di- chargé (rouge) et tri-chargé (vert) du peptide PN	46
2.6	Analyse PAGE-SDS de la TTR commerciale	47
2.7	Analyses nano LC-ESI-MS/MS du digestat de la TTR (A) le courant ionique total comprenant (B) le spectre MS des ions $[M+2H/2]^{2+}$ et $[M+3H/3]^{3+}$ correspondant au peptide PN	48
2.8	Identification MASCOT des différentes protéines présentes dans l'échantillon de digestat de la TTR (A). Résultats MASCOT pour l'identification du PN pour les ions $^{2+}$ (B) et $^{3+}$ (C)	48
2.9	Résolution entre les pics caractéristiques de PN et PM en fonction du pH du tampon de séparation (R_s calculée en utilisant le modèle gaussien de représentation des pics)	50
2.10	Analyse en électrophorèse capillaire d'un mélange des peptides PN et PM . .	51
2.11	Étude de la linéarité de la réponse aire de pic en fonction de la concentration (A) du peptide natif et (B) du peptide mutant	52
2.12	Carte peptidique de la TTR établie par électrophorèse capillaire en tampon de séparation de pH acide	54

2.13	Carte peptidique de la TTR en milieu basique (tirets) avec un ajout dosé de peptide PN (5 μ M) (trait plein)	56
2.14	Carte peptidique de la TTR en milieu basique (tirets) avec un ajout dosé de peptides PN et PM (5 μ M chacun) (trait plein) et ajout dosé de PN (5 μ M) (grands tirets)	57
3.1	Structure primaire de la TTR (en rouge) les peptides d'intérêt	60
3.2	Réaction de marquage d'une amine par le NDA	62
3.3	Spectres d'émission de fluorescence d'une solution de PN marqué par le NDA enregistrée pour différentes longueurs d'ondes d'excitation	63
3.4	Système optique du détecteur LIF et mise en place des filtres	64
3.5	Spectre de la lumière émise par une lampe LED (rouge) et une lampe à vapeur de mercure (bleu)	65
3.6	Spectre de la lumière émise par une lampe LED avant (vert) et après le passage par les filtres coupe bande 442 nm (rouge) et passe haut 475 nm (bleu) .	66
3.7	Spectre de caractérisation du laser 442 nm	66
3.8	Analyses par spectrofluorimétrie du peptide natif marqué par le NDA à différents temps de réaction $\lambda_{ex}=419$ nm	67
3.9	Electrophérogramme de PN-NDA : rapport molaire NDA/PN=100 (tirets) rapport molaire NDA/PN=40 (trait plein) blanc NDA (pointillés).	68
3.10	Graphique représentant l'évolution de l'aire du pic du dérivé PN-NDA par rapport au rapport molaire NDA/PN	69
3.11	Évolution de l'aire du pic du dérivé PN-NDA (trait plein) et de l'efficacité du pic du dérivé PN-NDA (tirets) en fonction de la force ionique du tampon de dérivation	70
3.12	Histogramme représentant l'efficacité de pic du dérivé PN-NDA en fonction du pH du tampon de dérivation pour les deux électrolytes supports testés pour la séparation électrocinétique	72

3.13	Histogramme représentant l'aire du pic du dérivé PN-NDA en fonction du pH du tampon de dérivation pour les deux électrolytes supports testés pour la séparation électrocinétique	72
3.14	Évolution de l'aire du pic du dérivé PN-NDA (trait pleins) et du nombre de plateaux théoriques (tirets) en fonction du pH du tampon de dérivation (borate 70 mM) - Électrolyte support : borate pH 10 40 mM	73
3.15	Analyse en spectrométrie de masse MALDI-TOF de PN et PM avant (a, c) et après dérivation par le NDA (b, d)	74
3.16	Réaction de marquage d'une amine par le FQ	76
3.17	Spectres d'émission de fluorescence après excitation 488 nm du PN marqué par FQ, blanc FQ (mélange de dérivation sans peptide) et blanc peptide (mélange de dérivation sans FQ).	77
3.18	Analyse EC-LIF de la dérivation par le FQ de PN	78
3.19	Analyse EC-LIF de la dérivation par le FQ de PM	79
3.20	Aires du pic du dérivé PN-FQ en fonction du rapport molaire FQ/PN	79
3.21	Analyse EC-LIF de la dérivation par le FQ de PN 55°C 15 min (a) et 65°C 15 min (b)	80
3.22	Analyse en spectrométrie de masse MALDI-TOF de PN (a) PN dérivé par le FQ (b) PM (c) PM dérivé par le FQ (d)	82
3.23	Spectres de masse ESI-Trappe ionique en infusion directe en électrospray de solutions de peptide PN (a) PN marqué par le FQ (b) peptide PM (c) PM marqué par le FQ	83
3.24	Analyse du spectre de masse MS/MS de PN monomarké, ion précurseur : 1348,8 m/z	85
3.25	Exemple de fragmentation d'un peptide en ions b et y	85
3.26	Réaction (1) du NHS fluorescéine et (2) du 5-FITC avec une amine primaire	87
3.27	Analyses EC-LIF de la dérivation par le FITC de PN et d'un blanc FITC	88
3.28	Analyse EC-LIF du NHS-fluoresceine	89
3.29	Réaction de marquage d'une amine primaire par le TAMRA-SE	91

3.30	Spectres d'émission de fluorescence après excitation à 532 nm du blanc TAMRA-SE et de PN marqué par le TAMRA-SE	92
3.31	Analyses EC-LIF de la dérivation par le TAMRA-SE de PN et d'un blanc TAMRA-SE	92
3.32	Analyse en spectrométrie de masse de PN (a) PN dérivé par le TAMRA-SE (b) de PM (c) PM dérivé par le TAMRA-SE (d)	93
3.33	Pourcentage du peptide natif et des dérivés mono-, di- et tri-marqués en fonction du temps pour un marquage effectué en tampon borate 40 mM pH=10 (a) pH=7,9 (b)	95
4.1	Analyse EC-LIF de la dérivation par le NDA d'un mélange équimolaire de PN et PM en tampon acide	100
4.2	Analyse EC-LIF de la dérivation par le NDA d'un mélange équimolaire de PN et PM en tampons basiques	101
4.3	Analyse EC-LIF de la dérivation par le NDA d'un mélange équimolaire de PN et PM à différents voltages	103
4.4	Courbe représentant l'intensité du courant en fonction de la tension appliquée	104
4.5	Évolution de la résolution entre les peptides PN et PM marqués par le NDA en fonction de la tension appliquée.	104
4.6	Évolution de la résolution entre les peptides PN et PM marqués par le NDA en fonction de la longueur effective du capillaire	105
4.7	Analyse EC-LIF de la dérivation par le NDA d'un mélange équimolaire de PN et PM dans les conditions optimisées	106
4.8	Droite d'étalonnage obtenue pour l'analyse de PN-NDA	107
4.9	Analyse EC-LIF de la dérivation par le FQ d'un mélange équimolaire de PN et PM	110
4.10	Analyse EC-LIF de la dérivation par le TAMRA-SE d'un mélange équimolaire de PN et PM	112

4.11	Principe de la compression de la bande (stacking) de l'échantillon en électrophorèse capillaire	113
4.12	Analyse EC-LIF de la dérivation par le TAMRA-SE d'un mélange équimolaire de PN et PM	114
4.13	Photographie du poste d'analyse sur puce	119
4.14	Schéma explicatif de la gestion des fluides pour les étapes préparatives et de séparation sur puce microfluidique	120
4.15	Photographies du chip-holder associé au support démontable de platine Karl Zeiss qui s'insère juste au dessus des objectifs du microscope inversé	123
4.16	Représentation schématique d'une puce simple croix afin de désigner les quatre réservoirs par une ou deux lettres qui sont couramment utilisées en microfluidique	125
4.17	Photographie prise en microscopie de fluorescence lors de l'injection de l'échantillon entre les réservoirs S et SW	127
4.18	Électrophérogrammes obtenus à partir d'analyses sur puce du PN (A) et du PM (B) marqués par le TAMRA-SE	128

Liste des tableaux

1.1	Nomenclature et classification des amyloses	6
2.1	Caractéristiques des peptides obtenus théoriquement lors de la digestion tryptique de la TTR	40
2.2	Résultats MASCOT pour l'indentification de PN pour les ions 2+(A) et 3+(B)	45
2.3	Caractéristiques physico-chimiques des peptides d'intérêt pour l'étude du variant TTR Thr49Ala (informations obtenues avec l'outil ProtParam de la plateforme ExPASy)	49
2.4	Caractéristiques des différents électrolytes utilisés pour la séparation des peptides PN et PM par EC	50
3.1	Récapitulatif des caractéristiques des différents fluorophores utilisés dans notre étude	61
3.2	Principales caractéristiques des réactions de marquage fluorescent de PN et PM optimisées	98
4.1	Récapitulatif des conditions optimales de séparation EC-LIF des peptides natif et mutant après marquage fluorescent	116
4.2	Récapitulatif de la validation des méthodes d'analyse EC-LIF des dérivés fluorescents obtenus par marquage de PN et PM	117
4.3	Potentiels électriques imposés lors des analyses en puce	127
4.4	Récapitulatif des données des analyses des peptides PN et PM marqués par le TAMRA-SE sur puce.	129

Introduction générale

La polyneuropathie amyloïde familiale (FAP) à transthyrétine (TTR) est une maladie héréditaire à transmission autosomique dominante liée à la production de formes mutantes de la TTR. Ces formes mutantes s'agrègent sous forme de fibrilles amyloïdes qui s'accumulent au niveau des tissus du système nerveux autonome, des nerfs périphériques et d'organes tel que le cœur entraînant de graves dysfonctionnements neurologiques et cardiaques. Les premiers symptômes de cette maladie grave apparaissent généralement vers l'âge de 40 ans avec une forte probabilité de décès dans les 10 ans qui suivent. En France, plus de 300 cas de FAP-TTR ont été diagnostiqués et sont associés à une quinzaine de variants de TTR, les principaux étant : TTR Val30Met (le plus fréquent), TTR Thr49Ala, TTR Ser77Tyr et TTR Ile107Val. Le principal traitement de la FAP-TTR actuellement proposé est la transplantation hépatique, celle-ci empêchant la synthèse du variant amyloïdogénique de la TTR.

Évaluer les teneurs en TTR mutante et non mutante circulant dans le sérum par une méthode rapide et simple de mise en œuvre constitue une forte demande des cliniciens puisqu'elle leur permettrait de suivre au jour le jour l'efficacité de la greffe hépatique et d'évaluer l'effet des différents traitements médicamenteux associés. Un tel dosage permettrait également d'étudier rétrospectivement les variations encore inexplicées dans la cinétique d'apparition des signes cliniques chez les patients voire de fournir des indications pronostiques.

Cette demande nécessite le développement et l'utilisation d'outils analytiques sensibles et résolutifs. Dans ce contexte, notre projet de recherche est d'étudier le potentiel des séparations électrocinétiques en veine liquide (capillaire et puce) pour l'analyse de fragments ciblés obtenus par digestion enzymatique de la TTR extraite du sérum. Ce mode de séparation, jusqu'alors inexploité dans le cadre du diagnostic des FAP-TTR, est en effet particulièrement

bien adapté à l'analyse rapide, efficace et résolutive des polypeptides. L'aboutissement de ce projet consistera à intégrer en amont de la séparation les étapes préparatives de l'échantillon biologique pour concevoir un système analytique intégré « Point of Care » voué à une utilisation hospitalière simple, efficace et rapide pour effectuer le suivi thérapeutique de patients FAP-TTR.

L'objectif des travaux présentés est de développer une stratégie d'analyse par électrophorèse capillaire (EC), transposable sur puce, permettant une quantification de peptides pouvant constituer des biomarqueurs d'intérêt pour l'étude de la mutation du gène de la TTR conduisant au variant TTR Thr49Ala (substitution du résidu thréonine en position 49 par l'alanine). Ces travaux s'articuleront en quatre chapitres.

Le premier chapitre introductif est une étude bibliographique présentant dans une première partie la polyneuropathie amyloïde familiale à transthyrétine, les méthodes de diagnostic et traitements associés à cette pathologie. Dans une seconde partie, les principales méthodes d'analyse des polypeptides utilisées au cours de nos travaux : électrophorèse capillaire, spectrométrie de masse, marquage et détection des peptides par fluorescence seront présentées.

Le second chapitre est consacré à l'étude de la digestion enzymatique de la TTR. La première partie présente le développement de la méthode de digestion de la protéine et le contrôle de son efficacité par spectrométrie de masse. La seconde partie est consacrée au développement de la méthode d'analyse par électrophorèse capillaire couplée à la détection spectrométrique d'absorbance dans l'UV des fragments peptidiques de la TTR. Une étude préliminaire présente l'optimisation de la séparation des peptides d'intérêt pour l'étude de la mutation TTR Thr49Ala. La méthode de séparation a été dans un second temps appliquée pour établir la carte peptidique de la TTR.

Dans le troisième chapitre nous nous sommes intéressés au marquage par fluorescence des peptides d'intérêt pour l'étude de la mutation TTR Thr49Ala en vue de réaliser leur analyse par électrophorèse capillaire couplée à une détection par fluorescence induite par laser et sur une puce de séparation. L'optimisation de la dérivation pré-capillaire des peptides par différents agents fluorophores est présentée.

Le quatrième chapitre est consacré à l'optimisation de la séparation électrocinétique des dérivés fluorescents obtenus par marquage des peptides d'intérêt pour l'étude de la mutation TTR Thr49Ala avec différents fluorophores. La première partie détaillera la mise au point des trois méthodes de séparation des dérivés fluorescents développées par électrophorèse capillaire couplée à la détection par fluorescence induite par laser. La seconde partie portera sur le développement des séparations effectuées sur microsysteme en verre.

Enfin, après une conclusion générale sur l'ensemble de ces travaux, les annexes présentées détailleront les données et protocoles expérimentaux utilisés au cours de ces travaux de thèse.

Chapitre 1

Introduction bibliographique

A Les amyloses

I Généralités

Les amyloses sont un vaste groupe hétérogène de maladies diagnostiquées histologiquement par la présence de dépôts extracellulaires d'une substance protéique amorphe et insoluble : la substance amyloïde [1, 2]. Ces dépôts amyloïdes envahissent les tissus et organes, empêchant leur fonctionnement normal, et sont donc responsables de la pathologie. Il peut s'agir de maladies acquises ou héréditaires, elles peuvent être localisées ou disséminées, asymptomatiques ou au contraire de pronostic fatal. Il s'agit de pathologies relativement rares qui peuvent poser de difficiles problèmes diagnostiques et thérapeutiques. Les amyloses regroupent une large gamme de maladies comprenant des formes sporadiques, secondaires ou héréditaires [3]. Les formes sporadiques ou amyloses acquises ont comme précurseur la chaîne légère d'immunoglobulines monoclonales (amyloses AL), elles surviennent le plus souvent chez les personnes âgées de 60 à 70 ans. L'amylose secondaire, dénommée amylose AA, est une complication de l'inflammation chronique, la protéine majoritaire des dépôts est un fragment de la protéine sérum amyloïde A (SAA) dont la concentration sanguine augmente lors de la réaction inflammatoire. Les amyloses héréditaires sont plus rares (environ 4% des cas), elles sont dues à l'expression d'un variant amyloïdogène d'une protéine normale du fait d'une mutation

ponctuelle du gène correspondant.

Plus d'une vingtaine de protéines peuvent être des précurseurs d'amyloses (cf. tableau 1.1). En ce qui concerne les amyloses héréditaires, les mutations du gène de la transthyrétine (TTR), à l'origine de la polyneuropathie amyloïde familiale (FAP), sont les plus fréquentes [4].

Protéine amyloïde	Précurseur	Diffusion	Syndromes ou tissus atteints
AL	chaîne légère d'Ig (κ,λ)	G, L	(primitive) isolée ou associée au myélome ou à la maladie de Waldenström
AH	chaîne lourde d'IgG (γ)	G, L	Isolée
AA	apoSAA	G, L	(secondaire) infections, inflammations chroniques, tumeurs, TRAPS, FMF, syndrome de Muckle et Wells
ATTR	transthyrétine mutée	G	héréditaire sénile
	transthyrétine normale	G	
Aβ2M rénale chronique	β2-microglobuline	G	associée à l'insuffisance terminale
AApoA1	apolipoprotéine A1	G	héréditaire aortique (intima)
		L	
AApoA2	apolipoprotéine A2	G	héréditaire
AGel	gelsoline	G	héréditaire
ALys	lysosyme	G	héréditaire
AFib	fibrinogène	G	héréditaire
ACys	cystatine C	L	hémorragie cérébrale héréditaire
Aβ	précurseur de la protéine Aβ (AβPP)	L	maladie d'Alzheimer trisomie 21 angiopathie amyloïde cérébrale héréditaire ou sporadique
APrPsc	précurseur de la protéine prion	L	encéphalopathies spongiformes
ACal	procalcitonine	L	cancer médullaire de la thyroïde
AANF	facteur atrial natriurétique	L	amylose auriculaire isolée
AIAPP	amyline	L	îlots de Langerhans du diabète de type 2, insulinome
AIns*	insuline	L	latrogénique
APro*	prolactine	L	prolactinome, hypophyse sénile
AKep*	kératoépthéline	L	dystrophies cornéennes grillagées
ABri*	BRI-L	L	démence héréditaire britannique
ALact*	lactoferrine	L	vésicule séminale
Amed*	lactadhérine	L	aortique (média)

FMF : fièvre méditerranéenne familiale ; TRAPS : *tumor necrosis factor (TNF) receptor-associated periodic syndrome* ; Ig : immunoglobuline ; G : amylose généralisée ; L : amylose localisée ; * : nomenclature non officielle.

Table 1.1 – Nomenclature et classification des amyloses [1]

Formation des fibrilles

Les fibrilles amyloïdes (cf. figure 1.1) sont des agrégats de protéines très bien organisés en feuillets bêta-plissés avec une grande variété de structures et de fonctions [5]. Différentes techniques, sont utilisées afin d'étudier ces fibrilles amyloïdes comme notamment la microscopie électronique en transmission (TEM), la spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier (FTIR) ou encore la diffraction à rayons X [6, 7]. Ces fibrilles font entre 7 et 10 nm de diamètre, et sont visibles en microscopie électronique sous forme d'épingles [8]. Le rouge Congo

est généralement utilisé comme marqueur afin de les détecter en microscopie [9].

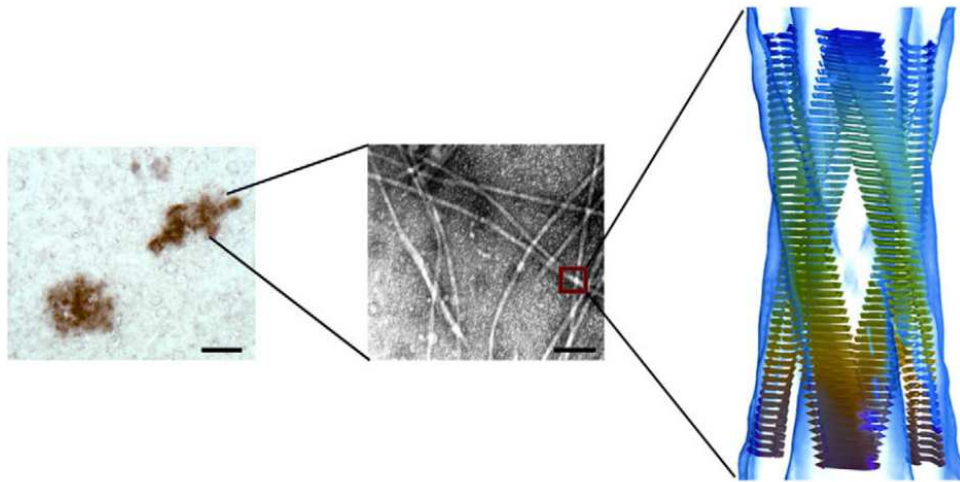


Figure 1.1 – Organisation structurale des fibrilles amyloïdes. Plaque amyloïde (gauche), électromyographe de fibrilles (milieu) et feuillets bêta (droite)
[10]

La présence d'un précurseur protéique est une condition nécessaire à la formation et au dépôt des fibrilles amyloïdes. La conversion de la structure native du précurseur en une structure secondaire bêtaplissée antiparallèle est un processus pathologique proche du repliement physiologique des protéines. Il apparaît pour des protéines ayant une propension naturelle à adopter une conformation anormale devenant apparente avec l'âge. Le remplacement d'un ou de plusieurs acide aminés d'une protéine normalement pas ou peu amyloïdogène peut également être à l'origine de la formation de fibrilles. Enfin, le clivage d'un précurseur protéique peut également favoriser la formation des fibrilles. Les fibrilles elles-mêmes sont susceptibles de favoriser la modification conformationnelle des précurseurs protéiques solubles [1].

II Les amyloses à transthyrétine

Deux formes d'amyloses à TTR existent : une forme commune où le précurseur est la TTR non mutante, il s'agit de l'amylose sénile cette dernière touche jusqu'à 25% de la population âgée de plus de quatre vingt ans [11] et une forme plus rare, où le précurseur est la TTR mutante.

II.1 La transthyrétine (TTR)

La TTR a été fortuitement découverte pour la première fois, par Kabat, dans le liquide céphalo-rachidien (LCR) en 1942 [12], elle a ensuite été identifiée dans le sérum, par Schultze en 1956 [13]. A l'origine, le rôle fonctionnel de la TTR était inconnu, il a fallu près d'une quarantaine d'années de travaux afin d'identifier les propriétés physico-chimiques ainsi que le rôle physiologique de la TTR et pour que son nom lui soit donné. En effet, en 1974, la séquence de la TTR fut publiée (cf. figure 1.2) [14]. Elle fut tout d'abord appelée préalbumine. Ce nom lui vient de sa tendance à migrer avant l'albumine sur un gel d'électrophorèse, en milieu basique. Ensuite, après la découverte de sa propriété de transport de la thyroxine, elle fut appelée TBPA (thyroxine binding prealbumine). Finalement, le nom transthyrétine fut adopté en 1981 afin d'éviter les confusions avec la proalbumine [15].

NH₂-Gly-Pro-Thr-Gly-Thr-Gly-Glu-Ser-Lys-Cys- Pro-Leu-Met-Val-Lys-Val- Leu
 - Asp -Ala - Val - Arg - Gly - Ser
 -Pro-Ala-Ile-Asn-Val-Ala-Val-His-Val-Phe-Arg-Lys -Ala-Ala
 -Asp-Asp-Thr-Trp-Glu-Pro-Phe- Ala - Ser - Gly - Lys - Thr - Ser
 -Glu-Ser-Gly-Glu-Leu-His-Gly-Leu- Thr - Thr - Glx - Glx - Gln
 -Phe-Val-Glu-Gly-Ile-Tyr-Lys-Val-Glu-Ile-Asp-Thr-Lys - Ser
 -Tyr-Trp-Lys-Ala-Leu- Gly - Ile - Ser - Pro - Phe -His - Glu - His
 -Ala-Glu-Val-Val-Phe-Thr-Ala-Asn-Asp-Ser-Gly-Pro-Arg-Arg-Tyr-Thr-Ile -Ala
 -Ala - Leu - Leu - Ser - Pro - Tyr - Ser - Tyr
 -Ser-Thr-Thr-Ala-Val-Val-Thr-Asn-Pro-Lys-Glu-COOH.

Figure 1.2 – Séquence de la transthyrétine
[14]

La TTR est une holoprotéine de 127 acides aminés, codée par un gène localisé sur le chromosome 18 (18q23) [16]. Elle est essentiellement synthétisée par le foie, mais elle peut aussi être synthétisée dans le plexus choroïde et la rétine. Il s'agit d'une protéine tétramérique de 55 kDa (voir figure 1.3). Elle porte latéralement sur l'un des monomères la protéine de transport du rétinol (*retinol binding protein*) (RBP), seul vecteur sanguin du rétinol (forme alcoolique de la vitamine A) [17]. La TTR assure également, dans le sang et le LCR, le transport de la thyroxine (T₄), hormone thyroïdienne [18]. Sa concentration plasmatique est influencée par plusieurs facteurs physiologiques comme l'âge et le sexe à la suite de modifications de syn-

thèse hépatique liées aux œstrogènes et aux androgènes [19]. Elle atteint des concentrations variant entre 0,2 et 0,4 g/L [20]. La concentration de la TTR dans le LCR est moindre, de l'ordre du dixième de milligramme par litre [21, 22].

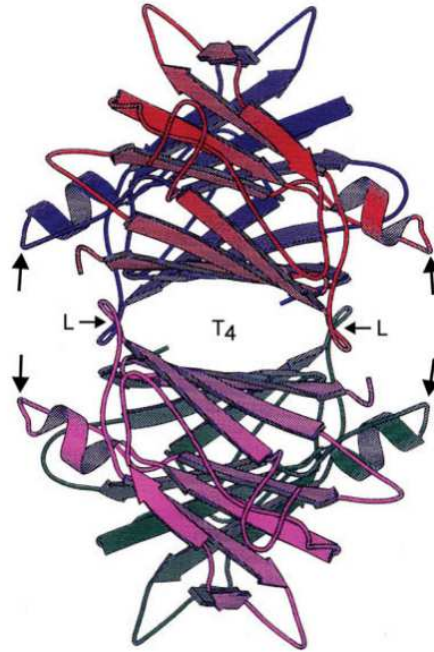


Figure 1.3 – Représentation tridimensionnelle du tétramère de la TTR. Chaque monomère est représenté en une couleur différente. Les flèches en gras représentent les sites de fixation de la RBP/vitamine A

[23]

II.2 Amylose à TTR non mutante

La TTR présentant une structure en feuillets bêta-plissés, cette protéine a une tendance naturelle à former des fibrilles amyloïdes. Cependant, l'amylose à TTR non mutante apparaît tardivement dans la vie, d'où le nom d'amylose sénile. Elle est le plus souvent asymptomatique et découverte fortuitement lors d'autopsies, sauf dans le cas où les dépôts amyloïdes se font sur le muscle cardiaque, dans ce cas (25% des cas), elle est beaucoup plus grave puisqu'elle entraîne une insuffisance cardiaque quelquefois fatale [24].

II.3 Amylose à TTR mutante

L'amylose à TTR mutante est plus rare que l'amylose sénile, elle apparaît plus tôt dans la vie. En 2003, Connors a dressé une liste répertoriant une centaine de mutations du gène de

la TTR [25]. En 2012, cette liste a été actualisée, 113 mutations du gène de la TTR ont été ainsi reportées [20]. Il peut s'agir de mutations simples, doubles ou même de délétions. Dans la plupart des cas, elles ont pour conséquence la déstabilisation du tétramère de la TTR, sa dissociation conduisant à des espèces partiellement dépliées susceptibles de s'auto-assembler en fibrilles amyloïdes (cf. figure 1.4).

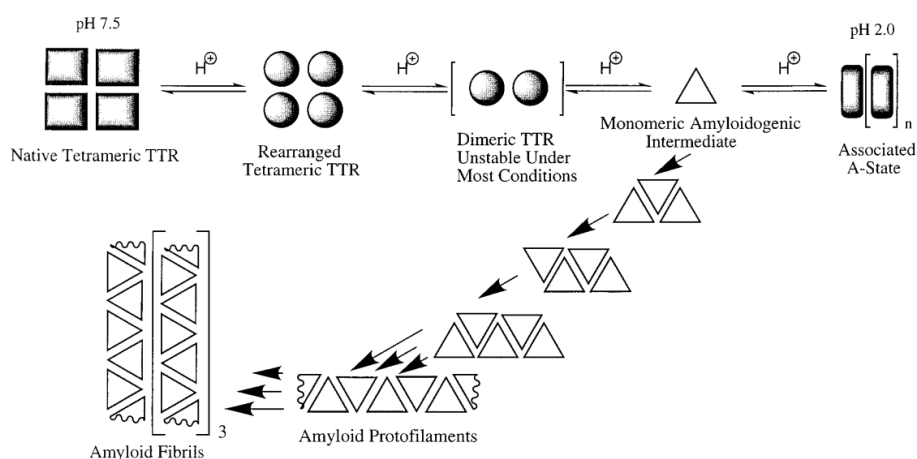


Figure 1.4 – Mécanisme de formation des fibrilles amyloïdes de la TTR [26]

Selon la (les) mutation(s) du gène, les tissus et organes principalement touchés par ces dépôts de substance amyloïde sont les nerfs périphériques, les tissus du système nerveux autonome et certains organes tels que le cœur et plus rarement l'œil, le rein et les méninges. Certaines mutations seront ainsi à l'origine de formes d'amyloses agressives tandis que d'autres conduiront à une atteinte moins sévère. L'amylose à TTR mutante, dénommée polyneuropathie amyloïde familiale à TTR (FAP à TTR), est une maladie héréditaire à transmission autosomique dominante. Cette maladie a été décrite pour la première fois au Portugal par Andrade en 1952 [27]. Par la suite, elle a été décrite au Japon [28] et en Suède [29]. Pendant longtemps, ces trois zones ont été considérées comme des zones endémiques. Mais la FAP à TTR a été découverte par la suite un peu partout dans le monde notamment en France, en Italie ainsi qu'aux Etats-Unis. La FAP à TTR est actuellement détectée dans le monde chez environ 700 familles. En France, plus de 300 cas ont été diagnostiqués et sont associés à une quinzaine de variants de TTR, les principaux étant : TTR Val30Met (le plus fréquent), TTR Thr49Ala, TTR Ser77Tyr et TTR Ile107Val.

II.3.1 Manifestations cliniques des FAP à TTR

Généralement, la FAP à TTR est une affection qui évolue lentement, elle conduit à un handicap croissant. Ses manifestations révélatrices sont variées. Elles peuvent être neurologiques, dues à l'accumulation des fibrilles amyloïdes sur les nerfs périphériques, et extra-neurologiques dues à l'accumulation de ces fibrilles sur d'autres organes comme l'œil, le cœur, etc.

Les manifestations neurologiques traduisent des dérèglements des nerfs périphériques. Ces dérèglements peuvent être sensitifs ou moteurs. Aux premiers stades, les patients parlent de douleurs intenses (type brûlure) et spontanées, de sensations désagréables type fourmillement ou engourdissement dans les mains et/ou les pieds, de perte progressive de la sensibilité des pieds et des mains, notamment les patients parleront de blessures ou de brûlures qu'ils n'ont pas subies. A un stade plus avancé, des faiblesses dans les membres apparaissent ce qui gêne progressivement la marche ou l'accomplissement de gestes précis [30].

Les manifestations extra-neurologiques peuvent aussi survenir seules ou en accompagnement des manifestations neurologiques. Parmi elles, les manifestations cardiaques sont les plus répertoriées (80% des cas de FAP à TTR) et aussi les plus graves. En effet, le dépôt amyloïde sur le muscle cardiaque peut induire une cardiomyopathie restrictive, des épisodes d'arythmie et de troubles graves de la conduction, ce qui conduit à des malaises, syncopes ou même à la mort subite [31]. Des manifestations oculaires ont aussi été répertoriées dans 10% des cas de FAP à TTR. Elles induisent une opacité vitreuse qui conduit à une perte progressive de la vue, ou encore une obstruction trabéculaire (obstruction du canal d'humeur aqueuse qui gère la pression intraoculaire) ce qui cause des glaucomes. Les autres manifestations extra-neurologiques peuvent concerner les reins, causant des insuffisances rénales. Par ailleurs, une perte excédant 10% du poids du corps et la cachexie sont des manifestations inévitables de la maladie [11, 30].

II.3.2 Diagnostic des FAP à TTR

Le diagnostic de la FAP se fait sur plusieurs étapes. Tout d'abord, un examen médical clinique, reposant sur un questionnaire permettant de recueillir les éléments évocateurs de la maladie cités ci-dessus et aussi de l'historique familial. Cet examen permet entre autres d'éva-

luer la perte de sensibilité des pieds ainsi que les réflexes. Des tests d'évaluation des atteintes extra-neurologiques sont aussi faits, notamment des examens cardiaques incluant des électrocardiogrammes afin de détecter une éventuelle hypertrophie cardiaque causée par les dépôts amyloïdes. Des examens oculaires et rénaux sont également faits de manière périodiques. Le recueil des symptômes cliniques permet la suspicion du diagnostic. Il est confirmé ensuite en ayant recours à plusieurs approches complémentaires : l'histopathologie, la génomique et la protéomique.

Une biopsie de tissus (nerf sensitif, glandes salivaires, etc.) est ainsi effectuée afin de vérifier la présence de dépôts amyloïdes. Cette confirmation se fait principalement par des tests d'affinité avec le rouge Congo. Afin d'identifier le type de fibrilles amyloïdes présent, des analyses par immunohistochimie reposant sur l'utilisation d'anticorps dirigés contre les protéines formant le dépôt amyloïde peuvent être réalisées [32, 33]. Cette méthode ne permet pas de faire la différence entre une amylose à TTR mutante et une amylose sénile.

L'approche génomique repose quant à elle sur un test ADN réalisé à partir d'un échantillon sanguin, un frottis salivaire ou du tissu prélevé [34], et permet de préciser la ou les mutations du gène de la TTR à l'origine de la pathologie.

Enfin la détection et la caractérisation des variants de la TTR peuvent être atteintes en ayant recours à différentes techniques d'analyse couramment utilisées en analyse protéomique : l'électrophorèse sur gel [35], la chromatographie liquide [36] et la spectrométrie de masse [37, 38, 39, 40]. L'efficacité de ces méthodes de screening et le choix des méthodologies à mettre en œuvre dans la caractérisation des variants de TTR dépend des données cliniques et de l'histoire de famille disponibles.

Ainsi, la focalisation isoélectrique sur gel est simple à mettre en œuvre et rentable mais n'est pas capable de distinguer par exemple la TTR sauvage du variant TTR Val30Met parce qu'il n'y a pas de changement dans le point isoélectrique de la protéine. La spectrométrie de masse est devenue une approche quasi incontournable dans l'étude et la caractérisation des biomolécules, notamment pour l'étude structurale des peptides et des protéines. Le potentiel des différentes techniques de spectrométrie de masse telles que l'ESI-MS/MS et le MALDI-TOF MS a été exploité pour l'analyse des variants de la TTR puisque la substitution d'un

acide aminé entraînent un changement de masse de la protéine. La plupart des études réalisées à ce jour pour la détection de la présence de la TTR mutante repose sur la méthodologie suivante : après extraction de la TTR du sérum, l'identification par spectrométrie de masse des variants de la TTR est réalisée soit directement sur les formes entières de la protéine en mesurant la différence de masse entre la protéine native et mutante, soit sur les peptides générés par hydrolyse chimique ou enzymatique de la protéine. En effet, la cartographie par mesure des masses moléculaires de mélanges peptidiques obtenus par digestion enzymatique est une méthode performante permettant d'identifier une protéine. Il est possible de mettre ainsi en évidence des différences de masse moléculaire correspondant à la présence de modifications post-traductionnelles ou à des modifications de la séquence primaire en acides aminés, par comparaison entre la masse théorique attendue et la masse expérimentale mesurée pour chaque peptide.

Pour l'étape d'isolement et de purification de la TTR du sérum, deux techniques ont été principalement décrites dans la littérature : l'immuno-affinité [41, 39, 42, 43] et l'électrophorèse sur un gel de polyacrylamide en présence de SDS (PAGE-SDS) [39, 42, 43, 44]. L'immuno-affinité est une technique qui emploie des anticorps spécifiques de la protéine d'intérêt pour complexer celle-ci. Dans le cadre de l'extraction de la TTR, des anticorps de lapin anti-TTR humain sont généralement utilisés, l'élution de la protéine se faisant par un tampon de L-glycine pH 2,8 [41]. L'électrophorèse PAGE-SDS permet la séparation des protéines selon leurs masses moléculaires. En présence de SDS toutes les protéines sont chargées négativement et migrent dans un champ électrique à une vitesse inversement proportionnelle à leurs masses moléculaires pour former des bandes de séparation sur le gel où chaque bande correspond aux protéines de même masse moléculaire (bande de 13,8kD pour la TTR).

II.3.3 Traitement des FAP

Le traitement des FAP à TTR est complexe et nécessite souvent une prise en charge pluridisciplinaire en premier lieu neurologique et cardiologique. Ce traitement va donc consister d'abord en un traitement symptomatique des manifestations nerveuses périphériques et végétatives (digestive, urinaire...) ainsi que celui des organes touchés par l'amylose (cœur, yeux...) [45]. Ensuite, le traitement des causes de la maladie est envisagé et pour cela différentes stratégies peuvent être utilisées : les greffes et/ou les traitements pharmacologiques.

a) Traitements des FAP par la transplantation

La TTR mutante étant principalement produite par le foie (plus de 90%), le premier traitement qui a été mis en place pour les FAP à TTR est la transplantation hépatique. La toute première greffe hépatique a été faite en Suède en 1990 [46]. En raison des résultats prometteurs de cette méthode, elle a été très vite employée dans d'autres pays. Un total de 54 centres médicaux dans 16 pays différents la pratique [47]. Pendant les vingt dernières années, plus de 2000 patients atteints de FAP à TTR ont subi une transplantation hépatique [48]. Pour ces patients, ce traitement s'est montré très efficace vu qu'il permet de stopper, dans les 2/3 des cas, la progression de la maladie. Cette efficacité est d'autant plus importante que le traitement est mis en place de façon précoce [49]. Cependant, ces résultats sont issus d'études ayant été surtout menées sur des personnes ayant le variant le plus retrouvé dans les FAP : Val30Met [50]. En effet, pour les autres variants non Val30Met, l'évolution de la maladie après la transplantation est très variable [30].

Comme nous l'avons décrit précédemment, les neuropathies chez les patients atteints de FAP à TTR peuvent être associées à d'autres manifestations. Ces manifestations peuvent être cardiaques, rénales, digestives, oculaires, etc. Dans ces cas, le traitement symptomatique de ces complications est appliqué. Par exemple, dans le cas d'une défaillance cardiaque, plusieurs scénarios peuvent être envisagés, la pose d'un pacemaker, un traitement par diurétiques ou encore une transplantation cardiaque associée à la transplantation hépatique [51]. Dans le cas d'une défaillance rénale, une dialyse ou une transplantation rénale associée à la transplantation hépatique peuvent être envisagés. Dans ce sens, tout un arsenal de traitements de toutes les

manifestations est employé afin d'améliorer la qualité de vie des patients [52].

b) Traitements pharmacologiques

Pour les patients non candidats à la greffe hépatique (patients âgés de plus de 70 ans, etc.) plusieurs stratégies ont été élaborées afin de traiter les FAP à TTR. Une des stratégies thérapeutiques envisagées est l'utilisation de petites molécules qui stabilisent le tétramère de TTR en vue d'inhiber la formation de fibrilles amyloïdes.

Nous avons parlé précédemment du rôle de la TTR qui était, entre autre, le transport de la thyroxine T4. Il a été démontré lors d'une étude que la thyroxine T4 était un stabilisateur de la TTR et donc un inhibiteur de la formation de fibrilles [53]. Des molécules analogues à la thyroxine ont donc été évaluées pour voir le pouvoir stabilisant sur la TTR, et certaines ont été retenues comme l'acide flufenamic [54].

D'autres études ont aussi été menées sur les phénols naturels qui peuvent inhiber différentes étapes dans la formation des fibrilles amyloïdes de TTR. Suite à cela, certaines molécules comme la curcumine (curcuma) ou l'acide nordihydroguaiarétique (NDGA) (arbre à créosote) ou l'epigallocatechine gallate (EGCG) (thé vert), se sont montrées prometteuses *in vitro* sur l'inhibition de la formation des fibrilles [55, 56, 57].

Après plusieurs années d'études, plusieurs molécules ont été retenues afin de faire des tests cliniques. En 2004, le diflunisal (commercialisé par Merck sous le nom de Dolobid), un anti-inflammatoire non stéroïdien a été proposé pour le traitement des FAP à TTR. En effet, cette molécule se lie aux sites de fixation de la T4 et stabilise ainsi le tétramère de la TTR empêchant la formation des fibrilles amyloïdes [58]. Cependant, comme la plupart des anti-inflammatoires, le diflunisal a un certain nombre d'effets secondaires, notamment sur le système digestif (problèmes gastriques, ulcères, etc.). Il pourrait donc aggraver certains symptômes des FAP. Une autre molécule a aussi été commercialisée pour le traitement des FAP : le tafamidis (cf. figure 1.5) (commercialisée par Pfizer sous le nom de Vyndaqel). Cette molécule agit aussi en stabilisant la TTR circulant dans le sang, la rendant moins amyloïdogène. Cette molécule fut une avancée majeure dans le cadre de l'élaboration de traitement des FAP, cependant, il a été démontré que son efficacité était bonne pour les variants Val30Met mais

médiocre pour les autres variants. C'est pour cette raison que les études se poursuivent afin de trouver d'autres molécules qui seront plus efficaces pour les autres variants de FAP à TTR.

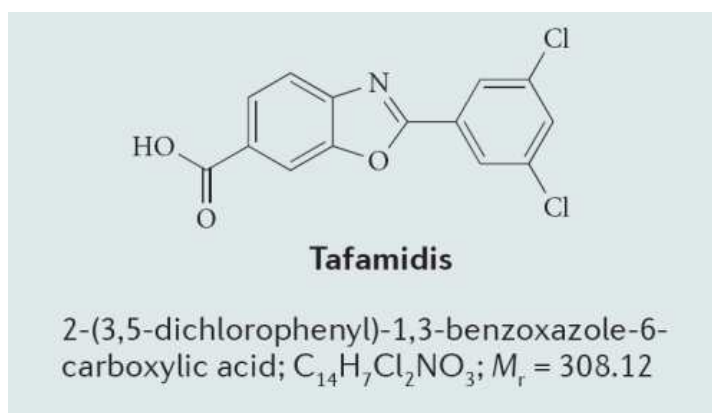


Figure 1.5 – Formule brute et développée du tafamidis [59]

D'autres perspectives thérapeutiques reposant sur la thérapie génique sont envisagées. Il s'agit du silençage génique (cf. figure 1.6). Il implique l'utilisation d'oligonucléotides antisens et d'ARN interférents qui réduisent la production de la TTR en empêchant la lecture des ARN messagers par les cellules. Ce traitement a été testé sur les souris avec de très bons résultats obtenus [60] et est en cours d'essais cliniques [61].

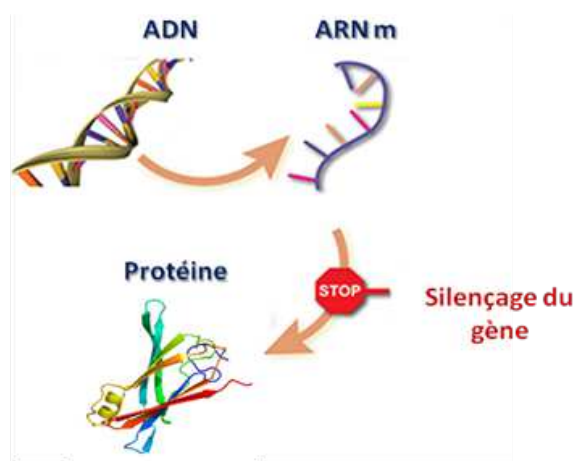


Figure 1.6 – Schéma de principe du silençage génique

Les différentes approches thérapeutiques actuelles et en cours de développement que nous venons de présenter sont regroupées sur les figures 1.7 et 1.8.

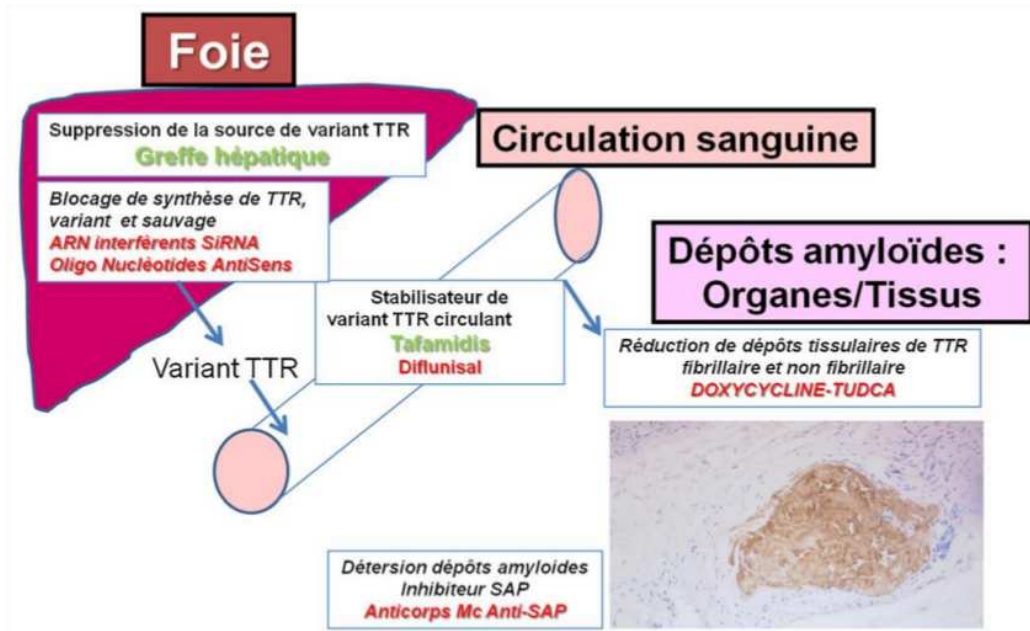


Figure 1.7 – Différentes stratégies thérapeutiques en cours de développement pour le traitement des neuropathies amyloïdes familiales à TTR [45]

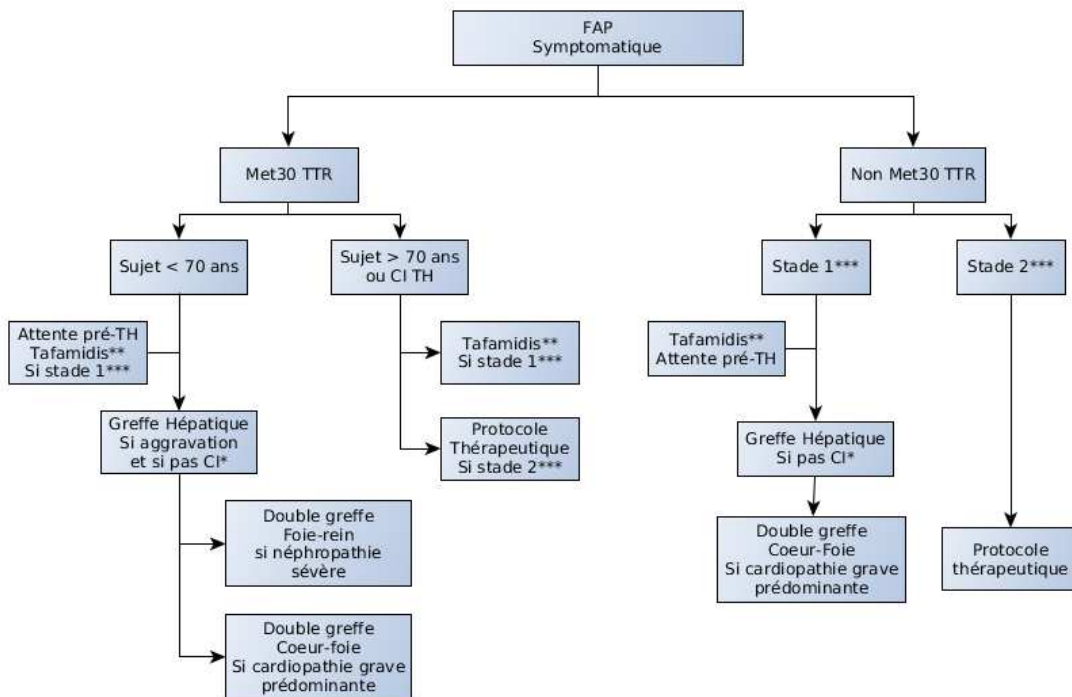


Figure 1.8 – Recommandations thérapeutiques des neuropathies amyloïdes héréditaires [45]

B Electrophorèse capillaire et spectrométrie de masse pour l'analyse des peptides et des protéines

Comme nous venons de le voir, l'approche protéomique actuellement mise en œuvre pour la détection des variants de la TTR chez les patients atteints de FAP à TTR repose essentiellement sur le potentiel de la spectrométrie de masse couplée ou non à la séparation chromatographique des formes sauvage et mutante de la protéine. Cette technique, que nous avons utilisée au cours de nos travaux et dont le principe sera brièvement présenté dans la dernière partie de ce chapitre introductif, est un outil puissant pour l'analyse des peptides et protéines. Mes travaux de thèse ont consisté à développer une technique alternative, jusqu'alors non exploitée pour l'étude des variants de la TTR, reposant sur la séparation électrocinétique en veine liquide de fragments d'intérêt de la protéine. Dans cette partie, les principales caractéristiques de l'électrophorèse capillaire, méthode de choix pour la séparation des peptides et protéines, seront présentées.

I L'électrophorèse capillaire (EC)

L'électrophorèse capillaire a été développée dans les années 1980. Elle permet la séparation d'un grand nombre de molécules (petits ions inorganiques, peptides, protéines, polysaccharides, etc.). Elle regroupe plusieurs modes de séparation, selon la nature de l'électrolyte de séparation et du capillaire utilisé (électrophorèse de zone, électrophorèse micellaire, électrophorèse sur gel, isoélectrofocalisation, électrochromatographie). L'EC est une méthode d'analyse désormais reconnue en raison de ses qualités intrinsèques : efficacité et résolution élevées, rapidité et automatisation des séparations, faible consommation d'échantillons et de tampons de séparation (en général dénués de solvants organiques), compatibilité avec de nombreux détecteurs [62].

I.1 Les phénomènes de transport en EC

En électrophorèse capillaire, le transport des espèces chargées se fait grâce à deux phénomènes : la mobilité électroosmotique et la mobilité électrophorétique.

I.1.1 Mobilité électroosmotique

Lorsqu'un capillaire de silice vierge est rempli d'un électrolyte, les cations présents dans l'électrolyte sont attirés vers les charges négatives de la surface du capillaire (liées à l'ionisation des groupements silanols) formant ainsi une double couche électrique. Cette double couche est formée d'une couche statique (couche de Stern) et une couche diffuse (couche de Gouy-Chapman) (cf. figure 1.9). Cette double couche est caractérisée par une différence de potentiel appelée potentiel zéta (ζ). Le potentiel ζ (V) dépend de l'épaisseur de la double couche et de la densité des charges et est exprimé comme suit :

$$\zeta = \frac{\delta\sigma}{\varepsilon_0\varepsilon_r} \quad (1.1)$$

Avec :

σ = densité de charges par unité de surface ($C.m^{-2}$)

ε_0 = permittivité du vide ($C.V^{-1}.m^{-1}$)

ε_r = constante diélectrique du milieu (permittivité relative)

δ = épaisseur de la double couche (m)

L'épaisseur de la double couche (δ) étant définie par :

$$\delta = \sqrt{\frac{\varepsilon_0\varepsilon_rRT}{2IF^2}} \quad (1.2)$$

Avec :

R = la constante des gaz parfaits ($8,32 J.mol^{-1}.K^{-1}$)

T = Température absolue (K)

I = Force ionique du milieu ($mol.L^{-1}$)

F = La constante de Faraday 96485 ($C.mol^{-1}$)

Lors de l'établissement d'un champ électrique tangentiel à cette interface, les cations présents dans la couche diffuse migrent vers la cathode, provoquant ainsi un flux appelé flux électroosmotique. La vitesse linéaire de ce flux V_{eo} ($m.s^{-1}$) est proportionnelle à l'intensité du champ électrique appliqué E ($V.m^{-1}$) et à la mobilité électroosmotique μ_{eo} ($m^2.V^{-1}.s^{-1}$) et

est exprimée par :

$$V_{eo} = \mu_{eo}E = \frac{-\delta\sigma}{\eta}E \quad (1.3)$$

Avec η (Pa.s) la viscosité du liquide dans la couche de diffusion.

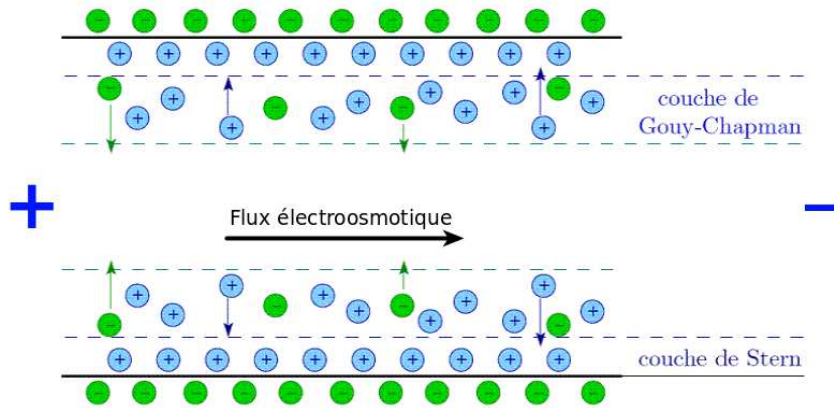


Figure 1.9 – Schéma représentant la double couche et le flux électro-osmotique au sein d'un capillaire de silice vierge

Il est important, afin de réussir des séparations efficaces et répétables en électrophorèse capillaire de contrôler le flux électroosmotique. Ceci nécessite de contrôler les différents paramètres dont dépend V_{eo} : composition de l'électrolyte (viscosité, pH, force ionique, nature, etc.), nature et dimensions du capillaire, champs électrique appliqué, température.

I.1.2 La mobilité électrophorétique

La mobilité électrophorétique d'un ion est fonction de sa charge électrique et de son rayon hydrodynamique. La vitesse linéaire constante appelée vitesse électrophorétique qu'atteint un analyte chargé soumis à un champ électrique obéit à la relation suivante :

$$V_{ep} = \mu_{ep}E = \frac{q}{6\pi\eta r}E \quad (1.4)$$

Avec V_{ep} la vitesse électrophorétique de la molécule chargée ($m.s^{-1}$), μ_{ep} sa mobilité électrophorétique effective ($m^2.V^{-1}.s^{-1}$), E le champ électrique ($V.m^{-1}$), q la charge de l'analyte (C) et r le rayon de Stokes (m), η la viscosité du milieu (Pa.s).

Dans le cas où le pH du tampon est supérieur au point isoélectrique (pI) des protéines et

peptides, ces molécules présentent une charge nette négative et migrent donc vers l'anode. A l'inverse, les protéines et peptides possédant un pI supérieur au pH du tampon sont chargés positivement, leur migration s'effectue alors vers la cathode. Le pH du tampon joue donc un rôle prépondérant puisqu'il détermine l'état d'ionisation des protéines mais aussi influence le flux électroosmotique. Plus le rapport charge/rayon hydrodynamique des protéines est grand, plus elles migreront vite, minimisant leur diffusion et améliorant leur séparation. Pour l'étude des protéines, un tampon de pH assez éloigné de leur pI doit être choisi afin d'éviter tout phénomène de précipitation. L'analyse d'un échantillon contenant à la fois des analytes chargés positivement et négativement sera généralement possible grâce à la présence du flux électroosmotique, la vitesse de migration V_M d'une espèce étant définie selon la relation :

$$V_M = \mu_{app} E \quad (1.5)$$

Avec

$$\mu_{app} = \mu_{eo} + \mu_{ep} \quad (1.6)$$

1.2 Efficacité et résolution

L'efficacité d'un pic est traduite par le nombre de plateaux théoriques qui est exprimé par la relation suivante :

$$N = \frac{\mu_{app} V}{2D_m} = \left(\frac{L_{eff}}{\sigma l}\right)^2 = \frac{(\mu_{eo} + \mu_{ep}) L_{eff} V}{2D_m L} \quad (1.7)$$

Avec μ_{app} la mobilité apparente ($m^2.V^{-1}.s^{-1}$), V la tension appliquée (V), D_m le coefficient de diffusion du composé ($m^2.s^{-1}$), L la longueur totale du capillaire (m) et L_{eff} la longueur effective du capillaire (m).

En électrophorèse capillaire, des grandes efficacités de pics sont généralement obtenues. Ces dernières proviennent du profil d'écoulement plat du flux électroosmotique (figure 1.10) et d'une réduction importante du nombre de mécanismes de dispersion de bandes comme l'anisotropie d'écoulement ou encore la résistance au transfert de masse dans la phase stationnaire, couramment retrouvés en HPLC.

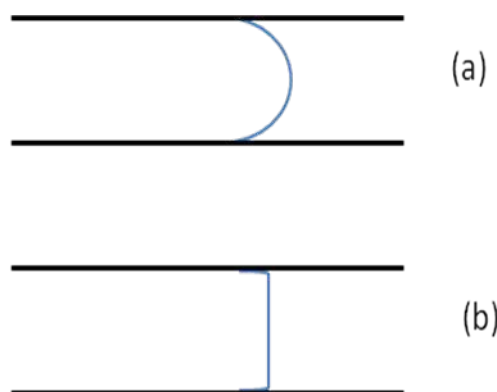


Figure 1.10 – Profil d'écoulement (a) parabolique en HPLC, (b) plat en EC

Nous pouvons aussi voir selon l'équation 1.7 que l'augmentation de la tension améliore l'efficacité. Ceci est dû au fait que l'augmentation de la tension accélère la migration des analytes qui ont donc moins le temps de diffuser. Cependant, une augmentation trop importante de la tension, peut en contrepartie induire un échauffement de l'électrolyte au sein du capillaire par effet Joule. Il faut donc, lors de l'optimisation d'une méthode, trouver une valeur adéquate pour la tension appliquée de façon à obtenir une efficacité élevée.

La résolution (R_s) entre deux pics successifs en EC peut être exprimée :

$$R_s = \frac{(\mu_{ep2} - \mu_{ep1})\sqrt{N}}{4(\mu_{eo} + \mu_{epmoy})} = \frac{\mu_{ep2} - \mu_{ep1}}{4\sqrt{2}} \sqrt{\frac{V L_{eff}}{D_m(\mu_{eo} + \mu_{epmoy})L}} \quad (1.8)$$

Avec : μ_{epi} la mobilité électrophorétique de l'espèce i , μ_{eo} la mobilité électroosmotique et μ_{epmoy} la moyenne des mobilités électrophorétiques, N le nombre de plateaux théorique, V la tension appliquée (V), D_m le coefficient de diffusion du composé ($m^2.s^{-1}$), L la longueur totale du capillaire (m) et L_{eff} la longueur effective du capillaire (m).

De cette équation, nous constatons qu'afin d'augmenter R_s , il faut jouer sur les mobilités des espèces et donc sur le pH et la composition de l'électrolyte support. Ainsi, la résolution peut être améliorée en réalisant la séparation en mode contre-électroosmotique, condition pour laquelle la valeur de la somme algébrique ($\mu_{eo} + \mu_{epmoy}$) est minimale.

I.3 Limitations de l'EC

I.3.1 L'effet Joule

L'application d'une différence de potentiel aux extrémités du capillaire de séparation préalablement rempli d'un électrolyte génère un échauffement de l'électrolyte par effet Joule. Cet effet, lié à la production de la chaleur créée par passage du courant dans le capillaire, compte parmi un des effets limitant des performances en EC. Tout d'abord, parce qu'il peut générer une température suffisamment élevée au sein du capillaire et alors causer la dénaturation des échantillons biologiques [63]. D'autre part, cette augmentation de la température ne se répartie pas uniformément dans le capillaire et pourra être à l'origine d'un gradient radial de température et d'un profil parabolique à l'origine d'une perte d'efficacité et de résolution. La température ayant une influence directe sur différents paramètres telles que la viscosité, la permittivité diélectrique de l'électrolyte ou encore la constante de diffusion de l'analyte, une élévation de température peut avoir des répercussions sur la qualité de la séparation si elle n'est pas correctement dissipée par un système de thermostatage efficace du capillaire. Une autre répercussion est la formation de bulles dans l'électrolyte en surchauffe [64].

Afin de limiter l'effet Joule, plusieurs techniques peuvent être utilisées. La conductivité de l'électrolyte peut être limitée en diminuant la force ionique du tampon de séparation aqueux [64], en réalisant la séparation avec des tampons isoélectriques [65], ou en présence de solvants organiques [66]. La diminution du diamètre interne du capillaire permet également de limiter l'effet Joule.

I.3.2 Le phénomène d'adsorption

L'EC est une technique particulièrement bien adaptée à l'analyse des peptides et protéines. Cependant, la qualité des séparations est souvent altérée par leur tendance à s'adsorber de façon plus ou moins réversible sur la silice fondue généralement utilisée comme capillaire de séparation. L'adsorption est un phénomène dû aux différentes interactions (électrostatiques, hydrophobes, etc.) entre les protéines et les parois du capillaire [67, 68, 69], provoquant une perte d'efficacité, de résolution et de reproductibilité préjudiciable aux analyses. Elle dépend de plusieurs paramètres tels que le pH, la force ionique de l'électrolyte, l'état de surface du

capillaire, ainsi que des caractéristiques de la protéine considérée (pI, structure, hydrophobie).

Afin de lutter contre le phénomène d'adsorption des analytes, différentes stratégies peuvent être mises en place. La plus simple consiste à jouer sur le pH et/ou la force ionique de l'électrolyte [70]. Le pH de l'électrolyte peut être suffisamment bas pour éviter l'ionisation des groupements silanols de la silice ou au contraire très élevé de façon à conférer aux peptides et protéines une charge globale négative afin qu'il y ait répulsion vis-à-vis de la paroi du capillaire. Les interactions protéine/capillaire peuvent également être atténuées en utilisant un tampon de force ionique élevé, les ions de l'électrolyte rentrant alors en compétition avec les protéines vis-à-vis des sites d'interaction de la silice. Il est également possible de réaliser un simple rinçage du capillaire par des solutions adaptées (base ou acide fort, tensioactif, solvant organique, etc.) entre chaque analyse. Enfin, la dernière stratégie envisageable consiste à la modifier la surface du capillaire par des agents de revêtements (amines, tensioactifs, polymère, etc.) [71]. Ces revêtements peuvent être dynamiques (réversibles) ou statiques (permanents). Dans le premier cas, l'agent de revêtement est incorporé dans l'électrolyte et tapisse la surface du capillaire au cours de la séparation. Dans le second cas, il est immobilisé sur la paroi du capillaire [72]. Les revêtements statiques sont obtenus soit par greffage covalent ou par adsorption physique d'un polymère naturel ou synthétique sur les parois du capillaire [72, 67, 73, 74, 75].

I.4 Les principaux modes de séparation en EC

I.4.1 L'électrophorèse capillaire de zone

L'ECZ est le mode de séparation le plus simple à mettre en œuvre et le plus utilisé. Sous l'effet d'un champ électrique constant, les analytes se déplacent dans le capillaire de séparation rempli d'un tampon (aqueux, hydroorganique ou organique) de pH et de force ionique fixés, en fonction de leur mobilité électrophorétique (dépendant du rapport charge électrique/volume hydrodynamique) et de l'amplitude du flux électroosmotique. Le mécanisme de séparation repose sur les différences de mobilité électrophorétique existant entre les analytes à séparer, ce qui doit se traduire par des vitesses de migration différentes dans le tampon d'électrophorèse à l'intérieur du capillaire.

I.4.2 La chromatographie électrocinétique micellaire

En EC, la séparation des molécules neutres est restée un problème jusqu'à l'introduction de la chromatographie électrocinétique micellaire par Terabe et al. en 1984 [76]. Bien qu'il s'agisse de séparations électrocinétiques, la dénomination « chromatographie » vient du principe de ce mode. En effet, il est fondé sur le partage du soluté entre la phase micellaire et la solution. Un tensioactif anionique ou cationique est ajouté au tampon de séparation à une concentration supérieure à sa concentration micellaire critique. La vitesse de migration d'un composé est fonction de son coefficient de partage entre le cœur hydrophobe des micelles et la phase aqueuse ionique. Bien que cette technique ait été développée à l'origine pour la séparation des composés neutres, la chromatographie électrocinétique micellaire représente aussi un moyen de séparer des composés chargés qui ont des mobilités électrophorétiques voisines en utilisant des tensioactifs chargés, neutres ou amphotères. La séparation des analytes dépend d'une combinaison de facteurs : le rapport charge/masse, l'hydrophobicité et les interactions de charges à la surface des micelles chargées.

I.4.3 La focalisation isoélectrique capillaire

La focalisation isoélectrique capillaire (CIEF), introduite en 1985 par Hjertén et Zhu [77], permet de séparer les protéines en fonction de leur point isoélectrique (pI) dans un gradient de pH généré par des ampholytes soumis à un champ électrique. Une séparation en CIEF se déroule en plusieurs étapes : les analytes sont d'abord focalisés dans un gradient de pH puis, lorsque l'état d'équilibre est atteint, une étape de mobilisation de ces analytes vers le détecteur est mise en place. Les extrémités du capillaire, préalablement rempli d'échantillon contenant les protéines et les ampholytes, plongent dans un catholyte (solution alcaline) et un anolyte (solution acide). Sous l'action du champ électrique, les ampholytes migrent jusqu'à atteindre une zone où ils ne possèdent plus de charge nette créant ainsi au sein du capillaire un gradient de pH. Ils tamponnent la région où ils se focalisent. De la même façon, les protéines vont migrer et se focaliser dans une zone de pH correspondant à leur point isoélectrique (pI), c'est-à-dire où leur charge nette est nulle pour former des zones focalisées étroites.

I.4.4 L'électrophorèse capillaire en gel

Cette méthode est inspirée de l'électrophorèse sur gel conventionnel. Une matrice permettant un tamisage moléculaire est présente dans le capillaire et de façon à conférer à toutes les protéines une charge négative et une mobilité électrophorétique identique, les séparations sont réalisées en présence de SDS. Le mécanisme principal de séparation est fondé sur les différences de taille des protéines quand celles-ci migrent à travers les pores du gel. Les gels utilisés sont généralement constitués de copolymères acrylamide-bisacrylamide. Leur préparation nécessite un traitement avec un silane di-fonctionnel qui polymérise in situ les monomères à l'intérieur des capillaires, les gels ainsi formés se greffent à la paroi et sont capables de résister aux écoulements électroosmotiques. Actuellement l'agarose ou les polymères linéaires hydrosolubles dits « remplaçables » sont utilisés pour la séparation, ils permettent de créer des réseaux enchevêtrés qui peuvent être facilement éliminés par simple rinçage du capillaire [78].

I.4.5 L'électrochromatographie capillaire

Dans l'électrochromatographie capillaire, le capillaire est rempli avec un support chromatographique, ce qui fait de cette technologie une méthode hybride entre la chromatographie en phase liquide et l'électrophorèse capillaire. La phase mobile (tampon électrophorétique et solvant organique) est en contact avec la silice et avec les surfaces particulières, en conséquence, le courant d'électroendosmose se produit dans la double couche qui existe au niveau de toutes les interfaces solide-liquide. Ce courant d'électroendosmose est généré uniformément tout au long du capillaire et sa vitesse est indépendante du capillaire et du diamètre de la particule [79]. Le débit du solvant est lié au courant d'électroendosmose et est plus uniforme que celui que l'on peut obtenir en HPLC [80]. Les solutés se déplacent selon deux processus, l'un de migration électrophorétique, l'autre de rétention chromatographique.

I.5 Les principaux modes de détection en EC

I.5.1 La détection UV-Visible

La détection UV-visible s'effectue directement à partir du capillaire (20 à 100 μm de diamètre interne) dont une très faible section va servir de cellule de détection. Cette détection

est la plus utilisée car elle est la plus facile à mettre en œuvre. Elle permet de détecter les molécules qui absorbent dans l'UV et le visible. La réponse de ce type de détecteur est fondée sur la loi de Beer-Lambert :

$$A = -\log\left(\frac{I_T}{I_0}\right) = \varepsilon(\lambda)lC \quad (1.9)$$

Avec :

I_0 = intensité optique transmise

I_T = intensité optique de référence

$\varepsilon(\lambda)$ = coefficient d'extinction molaire du soluté à la longueur d'onde λ (mol L⁻¹ m⁻¹)

l = la longueur du trajet optique (m)

C = la concentration du soluté dans l'éluant (mol.L⁻¹)

Il existe plusieurs types de spectrophotomètres principalement utilisés actuellement :

- ▷ Les détecteurs à longueur d'onde fixe utilisant des lampes à mercure, deutérium, cadmium ou zinc avec sélection de la longueur d'onde par filtre.
- ▷ Les détecteurs à longueur d'onde variable avec des lampes à deutérium ou tungstène avec une sélection de longueur d'onde par un monochromateur.
- ▷ Les détecteur à barrettes de diodes.

I.5.2 La détection par fluorescence induite par laser (LIF)

a) Principe et instrumentation

La fluorescence induite par laser (LIF) est l'émission optique qui provient des molécules qui sont excitées par une absorption de radiations électromagnétiques (Figure 1.11). Ces radiations sont issues d'un laser. Le laser a la propriété d'émettre des radiations intenses et très focalisées ce qui permet d'atteindre des limites de détection très faibles.

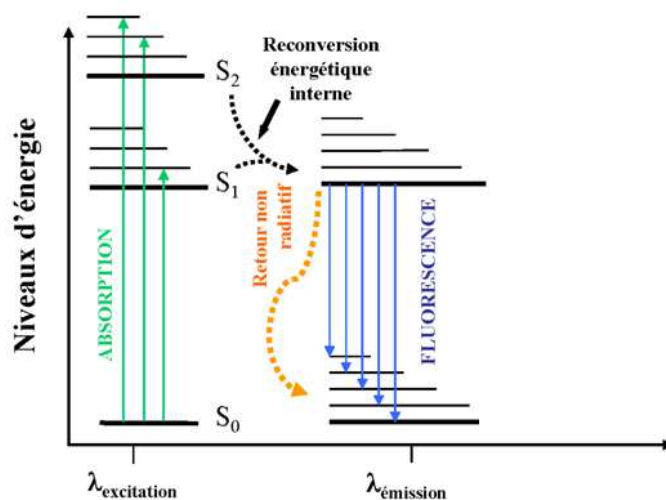


Figure 1.11 – Diagramme de Jablonski pour la fluorescence

Le couplage EC-LIF est simple à mettre en œuvre, la détection s'effectuant directement à travers le capillaire. Ce couplage confère une grande sensibilité de détection c'est pourquoi il est de plus en plus utilisé en analyse des biomolécules [81]. Des limites de détection de l'ordre du picomol ou femtomol ont déjà été décrites [82, 83]. Cependant, ce mode de détection nécessite la plupart du temps un marquage des peptides et des protéines par un fluorophore car la fluorescence native de certaines molécules biologiques n'est exploitable qu'en utilisant un laser UV ($\lambda_{\text{ex}} = 266\text{nm}$).

Le schéma de principe d'un détecteur LIF est présenté sur la figure 1.12. Tout d'abord, un rayon laser est produit par la source et se trouve dévié par un miroir dichroïque qui permet de réfléchir certaines longueurs d'onde et de laisser passer d'autres. Ce faisceau passe ensuite par un bloc de filtres contenant notamment un filtre coupe bande permettant de ne laisser passer, en excitation, que la longueur d'onde d'intérêt tout en atténuant l'intensité du laser. De ce bloc filtres, sort donc un faisceau laser atténué qui permet d'exciter les molécules fluorescentes à travers la fenêtre de détection du capillaire. Une fois ces molécules excitées, elles vont émettre une fluorescence à une longueur d'onde supérieure à celle d'excitation (cf. figure 1.11). Cette lumière émise, repasse par différents filtres (qui sélectionnent la bande d'émission choisie) avant d'arriver au photomultiplicateur. Ce dernier permet de faire une détection sensible des

photons émis.

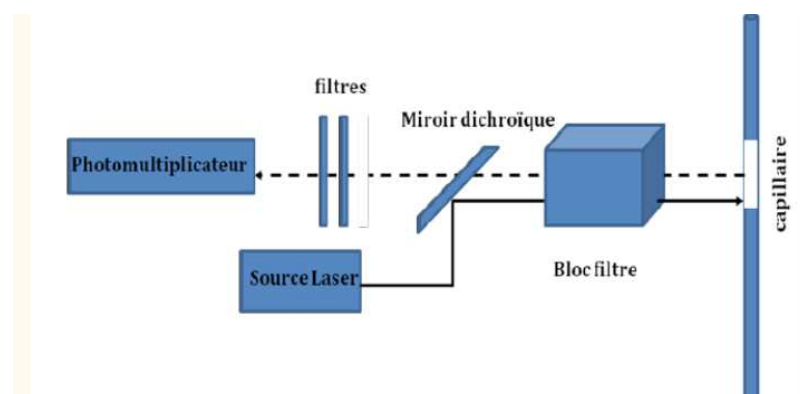


Figure 1.12 – schéma d'un détecteur LIF. Faisceau d'excitation (trait plein). Faisceau d'émission (tirets)

b) Marquage fluorescent des peptides et protéines

Le marquage par fluorescence est une modification des analytes, obtenue en associant de façon covalente ou non covalente l'analyte à un fluorophore susceptible d'être excité optiquement [84]. Cette modification est généralement réalisée de façon à permettre une détection plus sensible et/ou une amélioration de la sélectivité de la séparation.

Si quelques travaux font état de méthodologies de marquage non covalent pour l'analyse EC-LIF de peptides/protéines [85, 86], le marquage covalent, où l'agent fluorophore réagit sur la molécule à analyser et établit une liaison covalente avec celle-ci, est de loin le plus fréquemment employé. Les principales fonctions chimiques des peptides et protéines susceptibles de réagir avec ce type de marqueurs sont les amines, les carboxyles et les thiols, la dérivation des groupements amines étant la plus fréquemment réalisée en raison de la multitude de fluorophores commercialisés à cet effet [87]. Différents modes de marquage existent : le marquage pré-capillaire, le marquage intra-capillaire et le marquage post- capillaire.

Les modes de marquage

▷ Dérivation pré-capillaire

La dérivation pré-capillaire est de loin le type de marquage le plus utilisé. Il consiste à faire la réaction de marquage avant l'injection dans le capillaire. C'est un mode de marquage qui laisse une grande liberté de choix des réactifs fluorescents ou fluorogènes à

utiliser. Certaines réactions de dérivation peuvent nécessiter une haute température ou encore des temps de réaction longs. Par ailleurs, il est parfois nécessaire pour certaines applications de faire un traitement de l'échantillon avant analyse comme éliminer l'excès de réactif ou encore dessaler l'échantillon. La dérivation pré-capillaire permet de faire toutes ces étapes en amont de l'analyse.

▷ Dérivation intra-capillaire

Dans la dérivation intra-capillaire, la réaction de dérivation se fait dans le capillaire. Cette dérivation peut se faire au début (at inlet), au milieu (zone-passing), ou dans tout le capillaire (throughout-capillary). Ces marquages sont généralement utilisés lors de la dérivation d'échantillons de faible volume car il permet d'éviter les pertes par dilution ou évaporation [88]. Deux modes d'injection existent, le mode tandem, où l'échantillon et le réactif sont injectés successivement et le mode sandwich, où on injecte le réactif puis l'analyte puis le réactif. Vu le faible temps de mélange entre le réactif et l'échantillon à dériver, il est important de choisir des réactifs ayant une bonne réactivité et des conditions où le rendement de la réaction est important.

▷ Dérivation post-capillaire

C'est lorsque la réaction de dérivation a lieu après la séparation. Il est généralement utilisé lorsque les dérivés sont instables [89]. Ce mode de dérivation permet d'éviter les interférences causées par les produits secondaires issus de la réaction ainsi que l'éventuel élargissement des pics causé par la dérivation. En revanche, cette méthode a des inconvénients tels qu'un effet négatif sur l'efficacité de pics, perte d'analyte, des réactions de marquage incomplètes ainsi qu'un bruit de fond élevé [88].

Différents fluorophores

Le choix d'un bon marqueur est une tâche importante, orientant toute la suite du développement analytique. Une multitude de marqueurs covalents a été développée pour la dérivation des peptides et des protéines. La plupart d'entre eux peuvent réagir avec les amines primaires

ou secondaires des acides aminés, d'autres réagissent avec les groupements thiols des résidus cystéine [87, 90] et d'autres encore, bien moins fréquemment utilisés, réagissent avec les acides carboxyliques. Ces agents de dérivation, peuvent par ailleurs être fluorescents ou fluorogènes. Les réactifs fluorescents possèdent des propriétés de fluorescence avant et après la réaction de marquage, tandis que les réactifs fluorogènes, qui ne sont pas initialement fluorescents, ne présentent une émission de fluorescence qu'après avoir réagi.

Un dérivé fluorescent est caractérisé par une longueur d'onde d'excitation maximale et une longueur d'onde d'émission maximale. Pour obtenir la meilleure sensibilité possible, l'agent fluorophore doit posséder les caractéristiques suivantes : i) le dérivé fluorescent formé doit avoir un quantum de fluorescence élevé ii) le marqueur devra fluorescer le moins possible à la longueur d'onde d'émission du dérivé fluorescent afin de ne pas interférer au niveau de la détection des dérivés iii) l'agent fluorophore devra être le plus spécifique possible afin d'éliminer les risques d'interférences.

Nous ne décrivons ci-dessous que les principaux agents réagissant sur les groupements amines, ces marqueurs étant de loin les plus fréquemment utilisés pour le marquage de peptides et protéines. Les marqueurs fluorescents comme la fluorescéine et ses dérivés tels que le FITC [91, 92], le NHS-Fluorescéine [93] ou encore le Fluoprobe 488 [94, 95], sont largement utilisés pour le marquage des peptides et des protéines. Ces dérivés peuvent généralement être excités avec le laser 488 nm, classiquement associé aux appareils d'électrophorèse capillaire commercialisés. De nombreux travaux décrivent également l'utilisation de la rhodamine et ses dérivés comme, pour les plus connus, la Rhodamine B [96, 97], la Rhodamine 110 [97], le TAMRA [98] ou encore le TAMRA-SE [99, 100, 101]. Ces marqueurs fluorescents offrent plusieurs avantages tels que la stabilité dans le temps et une bonne résistance au photoblanchiment. Le marquage des peptides et des protéines par ces agents fluorescents et leur détection en LIF avec des LOD de l'ordre du nanomolaire sont reportés dans ces différentes études. Par ailleurs, des réactifs fluorogènes sont également disponibles pour l'analyse des peptides et protéines. Nous citerons le CBQCA[102], le FQ [103, 104, 105] ainsi que le NDA [106]. Ces trois réactifs présentent des structures proches, des limites de détections allant du μM au pM ont été reportées [107, 108, 104]. Hormis ces réactifs, le NBD-F ainsi que le NBD-Cl sont

également des réactifs fluorogènes très populaires réagissant en quelques minutes dans des conditions douces avec des groupes fonctionnels amines [109, 110, 111].

I.5.3 La détection par spectrométrie de masse

Le couplage de l'électrophorèse capillaire avec la détection par spectrométrie de masse a été introduit en 1987 par Olivares [112]. L'ECZ est bien adaptée au couplage avec la MS en raison de l'utilisation de capillaire de silice et de l'existence du flux électroosmotique. Le mode d'ionisation des échantillons les plus fréquent est l'électronébulisation (ESI) avec interface à débit coaxial permettant d'adapter les débits sortant des capillaires d'EC à ceux compatibles avec les interfaces d'ionisation par électronébulisation. Bien que la majorité des couplages décrits dans la littérature le sont avec une source ESI, d'autres types de sources peuvent être couplés à l'ECZ [113]. A titre d'exemple, des couplages avec des interfaces d'ionisation MALDI ont été décrites. Ces couplages peuvent être faits hors ligne [114] ou en ligne [115], même si cette dernière méthode reste marginale. La sensibilité de détection obtenue en EC-MS est élevée, les limites de détection étant environ 100 fois inférieures à celles obtenues en utilisant la détection absorptiométrique dans l'UV [116]. La principale limitation concerne la compatibilité des tampons de séparation avec la source d'ionisation, la sélection de tampons volatils étant nécessaire.

II La spectrométrie de masse (MS)

La spectrométrie de masse (MS) est un outil analytique puissant très largement utilisé en analyse protéomique. L'échantillon protéique peut être analysé directement par MS ou après avoir subi une étape de séparation par chromatographie liquide (couplage LC-MS, nanoLC-MS) ou, par électrophorèse capillaire (EC-MS), comme nous venons de le décrire.

La spectrométrie de masse (MS) est une technique sensible donnant accès à des informations structurales sur des molécules contenues dans un échantillon. La MS mesure les rapports masse/charge (m/z) de molécules ionisées et permet d'obtenir des données sur la masse moléculaire (ion moléculaire ou pseudomoléculaire), la structure (mesure de la masse des fragments de cette molécule) ou encore effectuer une mesure quantitative des différents

analytes (intensité des différents ions).

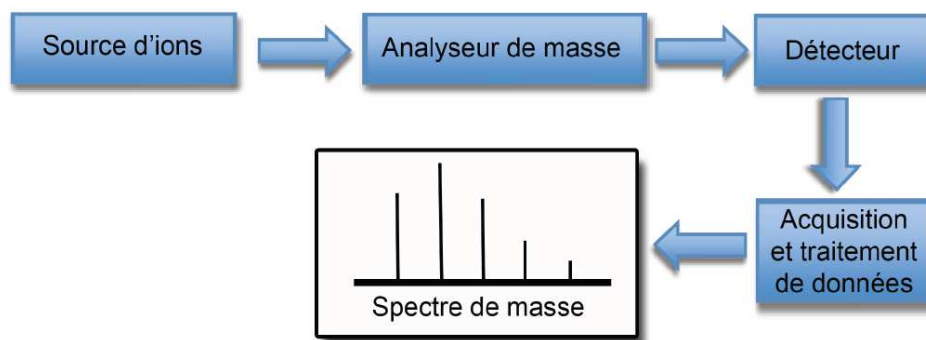


Figure 1.13 – Représentation schématique d'une analyse par spectrométrie de masse

Un spectromètre de masse (cf. figure 1.13) se compose de trois parties principales :

- ▷ La source d'ionisation qui permet de volatiliser les molécules de l'échantillon et de les transformer en ions. Elle permet d'effectuer l'ionisation, et le cas échéant la désorption (dans le cas d'un dépôt sur une surface), pour obtenir des ions en phase gazeuse.
- ▷ Un ou plusieurs analyseurs qui séparent les ions selon leur rapport masse sur charge (m/z). Il y règne un vide très poussée (10^{-5} mbar) et des champs électrostatiques sont appliqués pour guider et déplacer les ions dans l'appareil.
- ▷ Le détecteur qui permet la conversion d'un courant ionique (détection des ions) en courant électrique exploitable.

Diverses sources d'ionisation et analyseurs sont disponibles commercialement. Dans la partie suivante, nous allons nous intéresser aux modes d'ionisation par désorption/ionisation laser assistée par matrice (MALDI) et par électronebulisation (ESI) qui sont les deux modes employés au cours de cette thèse. Dans un second temps nous présenterons les analyseurs de type temps de vol (TOF) et piège à ions hybride linéaire/orbitale (LTQ-Orbitrap), eux aussi utilisés pour les analyses MS présentées dans ce travail de thèse.

II.1 Les sources d'ionisation

II.1.1 La désorption/ionisation laser assistée par matrice (MALDI)

A la fin des années 1980 cette méthode a été introduite suite aux travaux de Karas Hillenkamp et exploité par Tanaka pour les protéines de masses moléculaires élevées [117, 118, 119].

Avant cela la désorption des analytes intacts se faisait directement sur des échantillons solides, et ne permettait pas de voir les molécules dont le poids moléculaire était supérieur à 1000 Da. Afin de protéger l'analyte, un composé organique de faible masse (généralement $<500 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$) appelé matrice a été ajouté lors de la préparation de l'échantillon pour l'analyse.

Lors d'une ionisation par MALDI, un mélange analyte-matrice est déposé sur une cible, puis irradié par un faisceau laser pulsé à pression réduite. La matrice possède la particularité d'absorber les photons à la longueur d'onde du laser. Les ions produits se retrouvent en phase gazeuse sous l'effet de nombreux mécanismes physico-chimiques consécutifs à l'impulsion laser, puis sont entraînés vers l'analyseur en appliquant un champ électrique important (cf. figure 1.14).

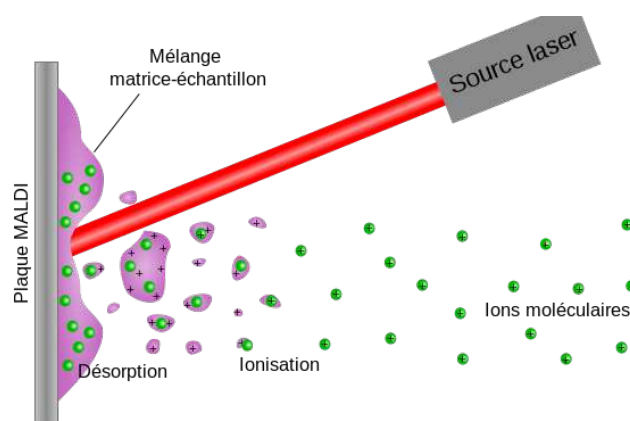


Figure 1.14 – Représentation du processus de désorption/ionisation par MALDI

Aujourd'hui, l'ionisation MALDI est devenue la technique d'ionisation de choix pour l'étude de molécules de haut poids moléculaire telles que les protéines. Elle permet une analyse rapide pour l'étude des échantillons biologiques. Les spectres obtenus sont très souvent composés d'ions monochargés qui simplifient l'interprétation lors de l'analyse de mélanges complexes. En outre, le MALDI présente l'avantage de posséder une relative tolérance aux sels et aux tampons, ainsi qu'à certains détergents.

II.1.2 Ionisation par électronébulisation

Lors d'une ionisation par électronébulisation (ESI), (cf. figure 1.15) une solution d'échantillon est introduite dans un capillaire, soumis à une tension de quelques kV. Le champ élec-

trique intense appliqué à la sortie de ce capillaire provoque la formation d'un nuage de gouttelettes chargées, de quelques micromètres de diamètre, qui traversent simultanément un gradient de champ électrique et un gradient de pression dans la direction de l'analyseur. Pendant ce transport, il y a une réduction de la taille des gouttelettes par évaporation, puis fission de la gouttelette par explosions coulombiennes lorsque elle atteint la limite de Rayleigh (divisions spontanées de la gouttelette chargée en gouttelettes plus petites, provoquées par une charge surfacique très élevée pour conduire finalement à la formation d'ions).

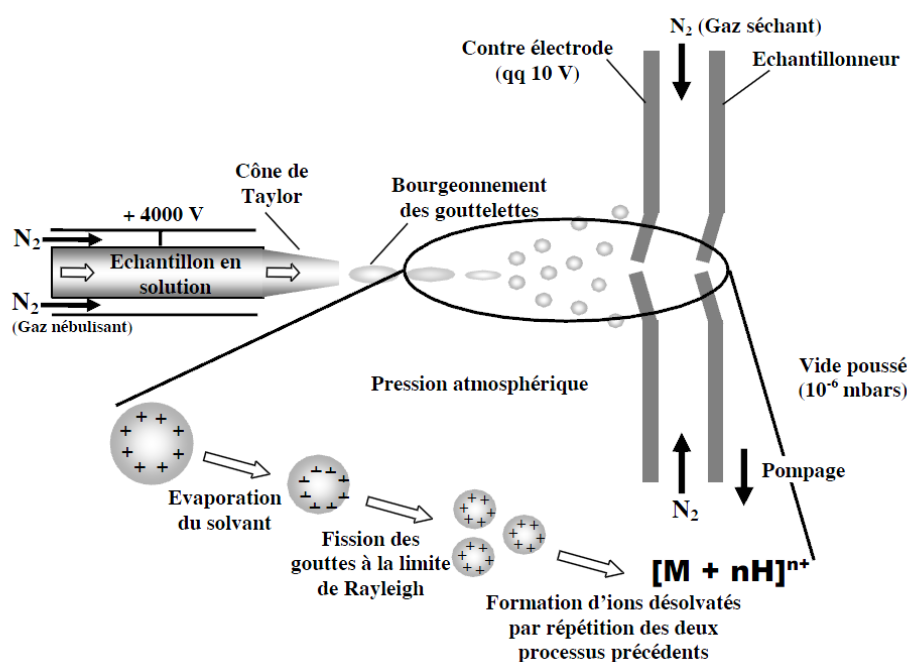


Figure 1.15 – Représentation du principe de l'électronébulisation

L'application d'une pression à l'entrée du capillaire peut faciliter la nébulisation, suivant le débit utilisé et la composition du solvant. De plus, un flux de gaz nébulisant (généralement de l'azote) est appliqué à l'interface, parallèlement à la solution d'échantillon, pour aider à l'évaporation du solvant. Un gaz séchant circulant, soit perpendiculairement soit à contre flux, à l'entrée de l'analyseur du spectromètre de masse, permet de parfaire le processus d'ionisation. Ce processus d'ionisation des espèces sous pression atmosphérique, permet le transfert des espèces chargées d'une phase liquide à une phase gazeuse, avec un très bon rendement d'ionisation [120, 121].

II.2 Les analyseurs

II.2.1 Analyseur à temps de vol (TOF)

Dans les analyseurs à temps de vol (Time of Flight : TOF), les ions parcourent librement un tube, dit de vol, et sont séparés en fonction de leur vélocités. Ces analyseurs mesurent le temps que mettent les ions à franchir une distance fixe après avoir été accélérés par un champ électrique. Pour ces analyseurs, deux modes existent : le mode linéaire et le mode réflecteur.

Le mode linéaire, est le plus approprié pour les hautes masses car en théorie, un analyseur de type TOF ne présente pas de limites de masse. De plus, cet analyseur possède un très bon rapport de transmission (rapport entre le nombre d'ions arrivant au détecteur et le nombre d'ions produit dans la source). Cependant, il présente l'inconvénient d'être peu résolutif. Pour palier à cette limitation, il est possible d'utiliser le mode réflecteur (ou réflectron). En effet, en mode linéaire, deux ions semblables, pourront être pourvus d'une énergie cinétique légèrement différente, c'est-à-dire que leurs vélocités respectives ne sont pas identiques, mais ils ne pourront pas être différenciés. Les différences d'énergie cinétique d'un même ion, peuvent être compenser via un miroir électrostatique ou réflecteur (cf. figure 1.16). Ainsi les ions d'un même rapport m/z , mais avec des infimes différences d'énergies cinétiques vont être plus fortement ralentis et repoussés vers le détecteur, si leur énergie cinétique est importante, entraînant un gain important de résolution. Il est donc un mode adapté à l'analyse des peptides et des petites protéines (généralement ($<5000 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$)).

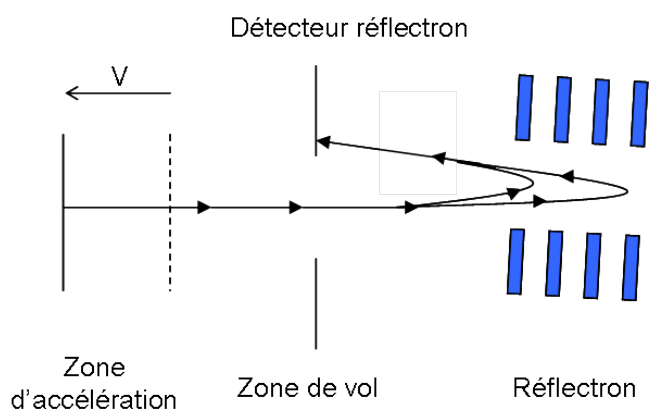


Figure 1.16 – Représentation d'une détection après analyse en temps de vol en mode réflecteur

II.2.2 Analyseurs à trappe ionique

La trappe ionique fonctionne comme un piège à ions qui accumule à l'intérieur de sa zone de champ tous les ions sélectionnés. La capacité de confinement des ions est liée à la formation d'un pseudo puits de potentiel. Les ions piégés sont ensuite libérés successivement suivant leur rapport m/z , suite à leur déstabilisation par des changements de fréquences [122].

Parmi les différents types de trappes, nous avons utilisé l'analyseur LTQ/Orbitrap qui est un analyseur hybride constitué d'un piège à ions linéaire (LTQ), couplée à un piège à ions orbitale. Le premier analyseur de masse est un piège à ion constitué d'un quadripôle hyperbolique segmenté en trois parties. Cette segmentation permet de garantir une parfaite homogénéité du champ électrique dans la zone de piégeage, limitant la perte d'ions une fois le piégeage réalisé. Le piège ionique linéaire possède plusieurs avantages notamment sa haute sensibilité due à une grande efficacité de piégeage par rapport aux pièges 3D, une gamme dynamique importante, et la possibilité d'effectuer de la fragmentation séquentielle (MS^n , avec $n \geq 2$). Le transfert des ions est assuré de façon axiale depuis le LTQ, par un octopole, qui guide les ions jusqu'à un piège intermédiaire, la C-trappe). La C-trappe est en réalité un répulseur électrostatique qui va ensuite introduire des ions par paquets dans l'analyseur Orbitrap.

L'Orbitrap (cf. figure 1.17) est un piège à champs électrostatique : il est constitué d'un piège d'ions traversé par une électrode chargée. Chaque ion entrant dans ce piège aura à la fois un mouvement de rotation autour de l'électrode, ainsi qu'un mouvement axial le long de cette électrode. Ce mouvement axial génère un courant induit qui est enregistré par deux électrodes.

Un calcul par la transformée de Fourier (FT) permet de calculer la fréquence axiale des ions (ω), elle-même dépendante du rapport m/z . Cette technologie utilisant la FT présente l'avantage de ne pas utiliser d'aimant supraconducteur comme en résonance cyclotronique ionique (ICR). La combinaison du LTQ et de l'Orbitrap permet d'atteindre des résolutions très élevées ($1-4,5 \times 10^5$ pour les appareils commerciaux), et une excellente précision de masse (< 5 ppm).

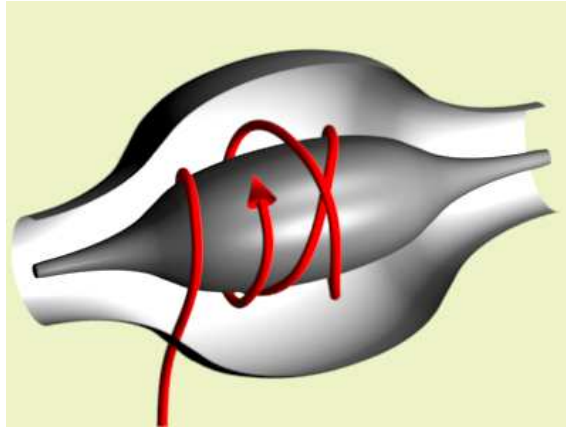


Figure 1.17 – Représentation de la trajectoire des ions (en rouge) dans un analyseur de type Orbitrap

Chapitre 2

Étude de la digestion enzymatique de la transthyrétine

L'objectif de notre projet de recherche a consisté à développer une méthode de séparation électrocinétique en veine liquide permettant de réaliser une analyse quantitative des formes sauvage et mutante de la TTR en se focalisant sur une mutation d'intérêt. La mutation étudiée se caractérise par la substitution du résidu thréonine en position 49 par l'alanine (TTR Thr49Ala). Elle est à l'origine de cas de polyneuropathies familiales à TTR retrouvés principalement en France et en Italie. Bien que l'efficacité et le pouvoir de résolution des séparations électrocinétiques soient élevés, la discrimination de la TTR sauvage et de la forme mutante à l'état de monomères n'est pas la démarche la plus prometteuse, ces deux formes, constituées chacune de 127 acides aminés, ne différant que par la nature de l'un d'entre eux. En conséquence, la méthodologie proposée consiste à réaliser la digestion enzymatique de la protéine extraite du sérum pour pouvoir ensuite effectuer la séparation des fragments peptidiques, cet objectif étant à priori plus simple à atteindre. Les travaux présentés dans ce chapitre décrivent dans une première partie le développement de la méthode de digestion de la TTR et son contrôle par spectrométrie de masse. Dans une deuxième partie, nous détaillerons la mise au point de la méthode de séparation des peptides synthétiques mimant les fragments peptidiques d'intérêt pour la mutation Thr49Ala développée par EC couplée à la détection par absorption dans l'UV. Dans la dernière partie, l'application de cette méthode à l'analyse du

digestat de la TTR sera présentée.

A Développement de la méthode de digestion enzymatique de la TTR et contrôle de son efficacité par MS

Parmi les enzymes protéolytiques capables de rompre les liaisons peptidiques d'une protéine, nous avons sélectionné la trypsine pour réaliser l'étude du variant TTR Thr49Ala. Cette protéase pancréatique, très fréquemment utilisée pour la cartographie peptidique, coupe les liaisons peptidiques d'une protéine au niveau de deux acides aminés : la lysine et l'arginine du côté C-terminal. Compte tenu de la séquence primaire de la TTR, la digestion tryptique de la protéine conduit théoriquement à l'obtention de dix fragments peptidiques dont les caractéristiques physico-chimiques sont présentées dans le tableau 2.1.

Peptide	Nombre d'acides aminés	Masse moléculaire (Da)	Point isoélectrique
GPTGTGESK	9	832,87	6,00
CPLMVK	6	689,93	8,22
VLD AVR	6	671,79	5,81
GSPAINVAVHVFR	13	1366,59	9,76
K	1	146,19	8,75
AADDTWEPFASGK	13	1394,46	4,03
TSESGELHGLTTEEEFVEGIYK *	22	2455,61	4,20
ASESGELHGLTTEEEFVEGIYK **	22	2425,14	4,20
VEIDTK	6	703,79	4,37
SYWK	4	582,66	8,31
ALGISPFHEHAEEVVFTANDSGPR	23	2451,68	5,28
R	1	174,2	9,75
YTIAALLSPYSYSTTAVVTNPK	22	2360,69	8,43

Table 2.1 – Caractéristiques des peptides obtenus théoriquement lors de la digestion tryptique de la TTR

(Informations obtenues à partir d'une analyse sur Peptide Cutter de la plateforme ExPASy)

** peptide issu de la TTR sauvage, dénommé PN dans ce mémoire*

*** peptide issu de la TTR mutante, dénommé PM*

Comme indiqué dans ce tableau, les peptides d'intérêt issus de l'hydrolyse de la TTR sauvage et de la forme mutante Thr49Ala, sont constitués chacun de 22 acides aminés, ils diffèrent l'un de l'autre par la nature du résidu situé à l'extrémité N-term : thréonine pour le peptide issu de la TTR sauvage (dénommé PN) et alanine pour le fragment issu de la TTR

mutante (dénommé PM). Compte tenu de la nature de la substitution (les résidus Thr et Ala ne présentent pas de chaîne latérale ionisée), le point isoélectrique théorique des deux peptides est égal à 4,2 et la différence de masse est de 30 Da. Il convient de noter que le nombre de peptides présents dans le digestat de TTR peut être supérieur aux 10 fragments présentés dans ce tableau, si l'on admet que certains clivages ne se produisent pas. Ainsi, la digestion de la TTR prédit l'obtention de 10 à 28 peptides suivant les conditions de « missed cleavage » (0, 1 ou 2) retenues.

Des travaux antérieurs, réalisés par Marylise Hébert et Hélène Mammeri au sein du service de biochimie-hormonologie de l'hôpital Antoine Bécclère, ont permis de mettre au point une procédure simple pour extraire et purifier la TTR du sérum. Cette procédure consiste à analyser un échantillon de sérum, préalablement déplété en albumine, immunoglobulines et autres protéines majoritaires du sérum, sur un gel de polyacrylamide en présence de dodécyl sulfate de sodium (SDS-PAGE). Deux stratégies de digestion de la TTR à la trypsine sont alors possibles. Une digestion en solution après extraction de la protéine du gel ou une digestion directement dans le gel. La seconde approche permettant d'éviter l'étape d'éluion de la protéine, qui limite le rendement global de la digestion, a été retenue pour notre étude (cf. figure 2.1). Les digestions en gel et les analyses de spectrométrie de masse présentées dans ce document ont été réalisées par Cédric Przybylski (Laboratoire Analyse et Modélisation pour la Biologie et l'Environnement, CNRS UMR 8587, université d'Évry Val d'Essonne).

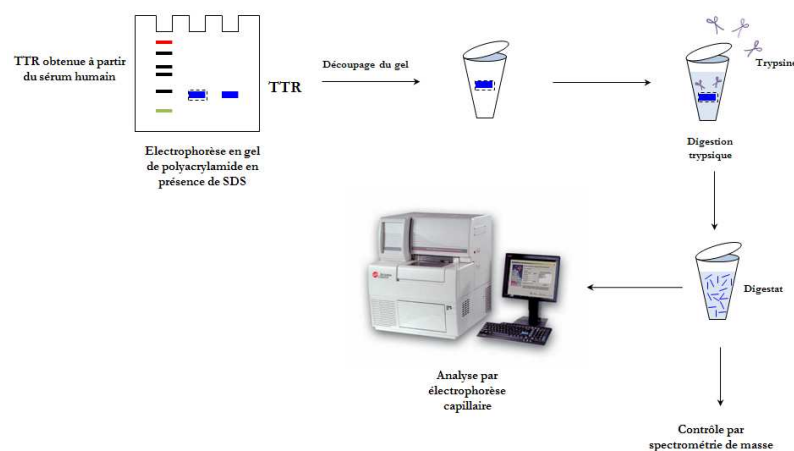


Figure 2.1 – Schéma représentant les étapes pour la préparation de l'échantillon de TTR avant analyse en EC-UV : extraction du sérum, digestion trypsique

Le premier essai a été effectué sur un échantillon de TTR humaine obtenue à partir du sérum d'un individu sain (service de biochimie-hormonologie de l'hôpital Antoine Bécclère). La concentration de la protéine a été déterminée à 0,433g/L par immunoturbidimétrie. Après les étapes de déplétion du sérum (kit Proteome Purify™ 12, RD Systems), filtration et concentration par centrifugation sur filtre Amicon 3 kD, trois dépôts de 15 µL chacun (contenant en théorie 4,9 µg de TTR) et un quatrième de 5 µL destiné à la coloration au bleu de Coomassie pour le repérage de la TTR, ont été soumis à une séparation par SDS-PAGE (4,5% et 15%, respectivement pour le gel de stacking et de migration, cf. procédure détaillée en annexe A.I).

Après migration, les 3 bandes non colorées correspondant à la TTR sous forme de monomère (13,8 kDa) ont été découpées et incubées une nuit à 37°C en tampon bicarbonate d'ammonium 0,1 M pH 8,5 en présence de trypsine avec un rapport enzyme/substrat de 1/10 m/m (voir procédure en annexe A.II). L'extraction des peptides tryptiques issus de la TTR a été réalisée par une solution acétonitrile/eau 70/30 v/v contenant 0,1% d'acide formique. L'échantillon a été analysé au LAMBE par spectrométrie de masse MALDI-TOF et ESI-LTQ-Orbitrap en utilisant dans le dernier cas le mode d'infusion directe et le couplage en ligne avec la nano- chromatographie liquide haute performance (nano-LC-MS/MS ESI-LTQ-Orbitrap).

Les analyses du digestat par spectrométrie de masse MALDI-TOF (Voyager-De Pro STR) ont été effectuées en testant deux matrices différentes : CHCA (fréquemment utilisé pour la détection des peptides neutres ou basiques) et ATB (utilisé quelquefois pour les oligonucléotides et pour la détection des peptides acides) en utilisant les deux modes d'ionisation positif et négatif. Avec cette technique, très peu de peptides ont été détectés, quelle que soit la matrice utilisée. En effet, seuls 8 peptides sur les 10 à 28 possibles ont été mis en évidence ce qui correspond à une couverture de séquence réduite, de l'ordre de 60 %. Le peptide d'intérêt PN n'a pas été mis en évidence. Plusieurs hypothèses peuvent être émises :

- ▷ l'ion correspondant serait dissimulé par le pic mono-isotopique à un rapport m/z 2451 (voir spectre figure 2.2) ;
- ▷ il ne serait pas produit lors de la digestion à la trypsine ;
- ▷ son efficacité d'ionisation serait trop faible ou réduite par la présence des autres pep-

tides lors de l'analyse par MALDI.

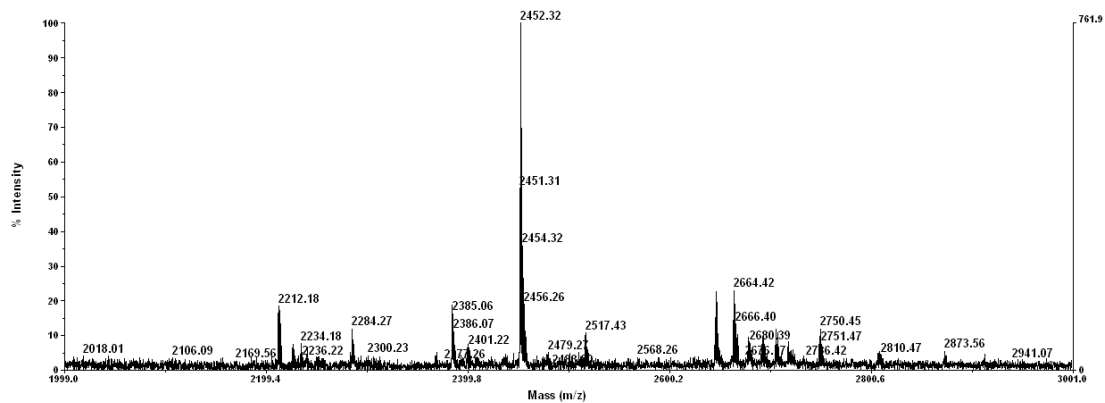


Figure 2.2 – Analyse par spectrométrie de masse MALDI-TOF en détection positive et matrice CHCA du digestat de la TTR mode réflectron

Pour vérifier l'hypothèse d'un faible rendement d'ionisation du peptide d'intérêt par MALDI, le digestat a été infusé à 3 μ L/min par ESI-LTQ-Orbitrap. Seuls 2 peptides sur les 10 à 28 possibles ont été mis en évidence indiquant une couverture de séquence réduite. Là encore, le peptide d'intérêt PN n'est pas détecté. Pour réduire la compétition de l'ionisation entre les différents peptides et le peptide d'intérêt, le digestat a été analysé par nanoLC-MS/MS ESI-LTQ-Orbitrap (cf. figure 2.3).

L'introduction d'une étape de séparation des peptides par chromatographie liquide, préalablement à l'analyse par ESI-MS et ESI-MS/MS a permis de mettre en évidence 12 peptides sur les 28 probables, ce qui représente une couverture de séquence de l'ordre de 65 %. La présence d'ions à des rapports m/z de 1228,5819 et de 819,3904 (cf. figure 2.3) est en bon accord avec les rapports m/z théoriques des ions di- et tri-chargés attendus pour PN. Ces résultats démontrent que le peptide d'intérêt est bien produit suite à la digestion trypsique.

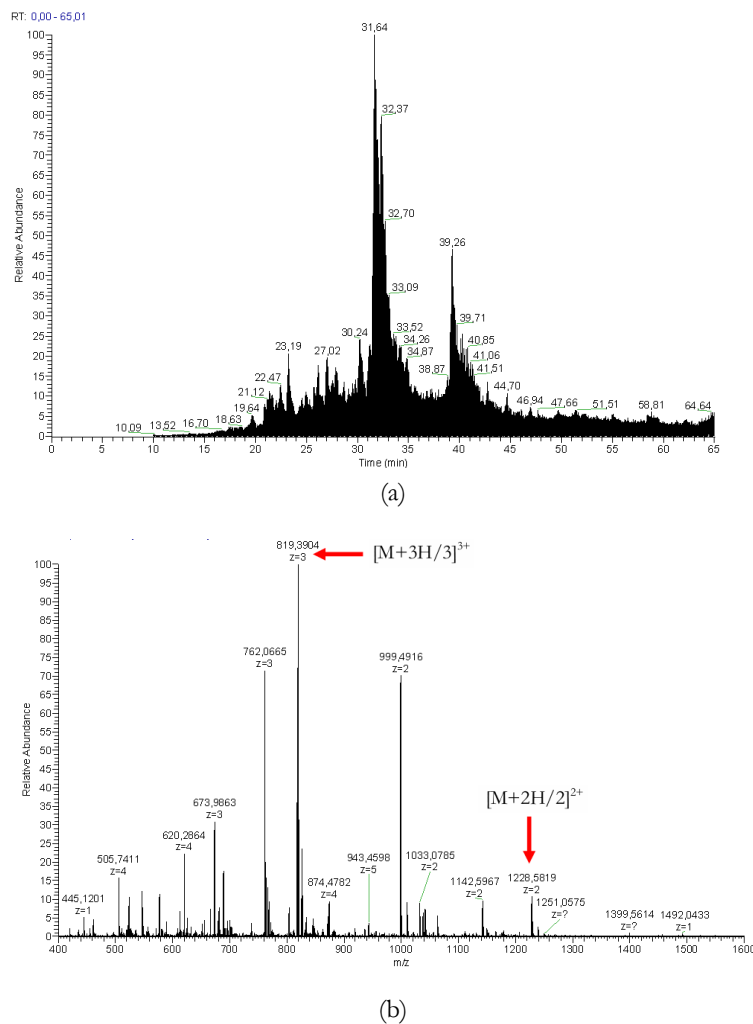


Figure 2.3 – Analyses nanoLC-ESI-MS/MS du digestat de la TTR (A) le courant ionique total comprenant (B) le spectre MS des ions $[M+2H/2]^{2+}$ et $[M+3H/3]^{3+}$ correspondant au peptide PN

Sur la figure 2.4, nous avons présenté l'identification obtenue par MASCOT après interrogation de la base de données Swiss-Prot. L'identification des ions di- et tri-chargés correspondant au peptide PN est confirmée (cf. tableau 2.2), avec des scores respectivement de 73 et 56 (dans le cas de cette recherche, le seuil de significativité est fixé à un score > 35). A noter cependant que la qualité de l'échantillon n'est pas satisfaisante comme le montre le courant ionique total (TIC) très intense pour un mélange censé ne contenir que des fragments de TTR et d'auto-digestion de la trypsine. Ce courant ionique total élevé a pu être attribué à la teneur excessive en kératines mises en évidence (cf. figure 2.4). Cette contamination pourrait en partie expliquer l'absence d'identification de notre peptide d'intérêt lors des analyses

réalisées par MALDI-TOF et ESI-LTQ-Orbitrap en infusion directe. Un tableau récapitulatif des différents résultats obtenus avec les différentes méthodes spectrométriques est présenté dans l'annexe A.II.

NCBI BLAST search of [TSESGELHGLTTEEEFVEGIYK](#)
(Parameters: blastp, nr protein database, expect=20000, no filter, PAM30)
Other BLAST [web gateways](#)

All matches to this query

Score	Mr(calc):	Delta	Sequence
73.3	2454.1438	0.0035	TSESGELHGLTTEEEFVEGIYK
3.9	2454.1407	0.0067	MVSSAQMGMFNLAALLEQLSQDE
0.3	2454.1494	-0.0021	HLVLLHGVCMAGDSTMVQEFVH

(a)

NCBI BLAST search of [TSESGELHGLTTEEEFVEGIYK](#)
(Parameters: blastp, nr protein database, expect=20000, no filter, PAM30)
Other BLAST [web gateways](#)

All matches to this query

Score	Mr(calc):	Delta	Sequence
56.0	2454.1438	0.0028	TSESGELHGLTTEEEFVEGIYK
4.6	2454.1353	0.0113	DHAWVVFVGSNGEQTAEVTVHWGK
3.1	2454.1460	0.0006	EMSSLFHAMYSGSRTPHIPYK
2.3	2454.1524	-0.0057	APPGQPAEPDAPRSSPGPGAREEGAG
1.6	2454.1485	-0.0019	CLHELKHEENRNVFEDSEE
1.6	2454.1460	0.0006	EMSSLFHAMYSGSRTPHIPYK
1.4	2454.1415	0.0051	AMVFMGAKGSTAAQMSQALCLYK
1.1	2454.1584	-0.0118	KDGVMVNVVSSLSVNEPEGATDK

(b)

Table 2.2 – Résultats MASCOT pour l'indentification de PN pour les ions 2+(A) et 3+(B)

```

Protein hits      : K2C1\_HUMAN Keratin, type II cytoskeletal 1 OS=Homo sapiens GN=KRT1 PE=1 SV=6
                   K2C1\_PANTR Keratin, type II cytoskeletal 1 OS=Pan troglodytes GN=KRT1 PE=2 SV=1
                   K1C9\_HUMAN Keratin, type I cytoskeletal 9 OS=Homo sapiens GN=KRT9 PE=1 SV=3
                   K22E\_HUMAN Keratin, type II cytoskeletal 2 epidermal OS=Homo sapiens GN=KRT2 PE=1 SV=2
                   K1C10\_HUMAN Keratin, type I cytoskeletal 10 OS=Homo sapiens GN=KRT10 PE=1 SV=6
                   TTHY\_HUMAN Transthyretin OS=Homo sapiens GN=TTR PE=1 SV=1
                   K1C10\_CANFA Keratin, type I cytoskeletal 10 OS=Canis familiaris GN=KRT10 PE=2 SV=1
                   K1C14\_HUMAN Keratin, type I cytoskeletal 14 OS=Homo sapiens GN=KRT14 PE=1 SV=4
                   K1C16\_HUMAN Keratin, type I cytoskeletal 16 OS=Homo sapiens GN=KRT16 PE=1 SV=4
                   TRYP\_PIG Trypsin OS=Sus scrofa PE=1 SV=1
    
```

Figure 2.4 – Identification MASCOT des différentes protéines présentes dans l'échantillon de digestat de la TTR

Le protocole de digestion trypsique de la TTR humaine extraite d'un second individu sain (service de biochimie-hormonologie de l'hôpital Béclère) a été répété en augmentant la quantité totale de TTR déposée le gel (63,4 µg théorique) et en prenant des précautions adaptées à l'analyse protéomique au cours des manipulations (gants et charlotte en plus de la blouse) afin de diminuer les sources de contamination potentielles de l'échantillon par des protéines humaines telles que les kératines. Les conditions de digestion en gel appliquées sont identiques aux précédentes (incubation une nuit à 37°C en tampon bicarbonate d'ammonium 0,1 M pH 8,5 avec un rapport enzyme/substrat de 1/10 m/m). Le digestat obtenu a été analysé au LAMBE par nanoLC-ESI-LTQ-Orbitrap. L'analyse révèle une absence de contamination par les kératines, permettant d'identifier la TTR comme protéine majoritaire. Parmi les peptides

formés, le peptide d'intérêt PN est élué à environ 29 minutes (cf. figure 2.5). L'extraction des ions (XIC) de ce peptide conduit à la détection d'un ion di-chargé et d'un ion tri-chargé respectivement à m/z 1128,0842 et m/z 819,0573 présentant des intensités relatives respectivement de 1/67 et 1/5 du maximum du signal total détecté. Les expériences de fragmentation MS/MS de ces 2 ions confirment sans ambiguïté la séquence du peptide d'intérêt.

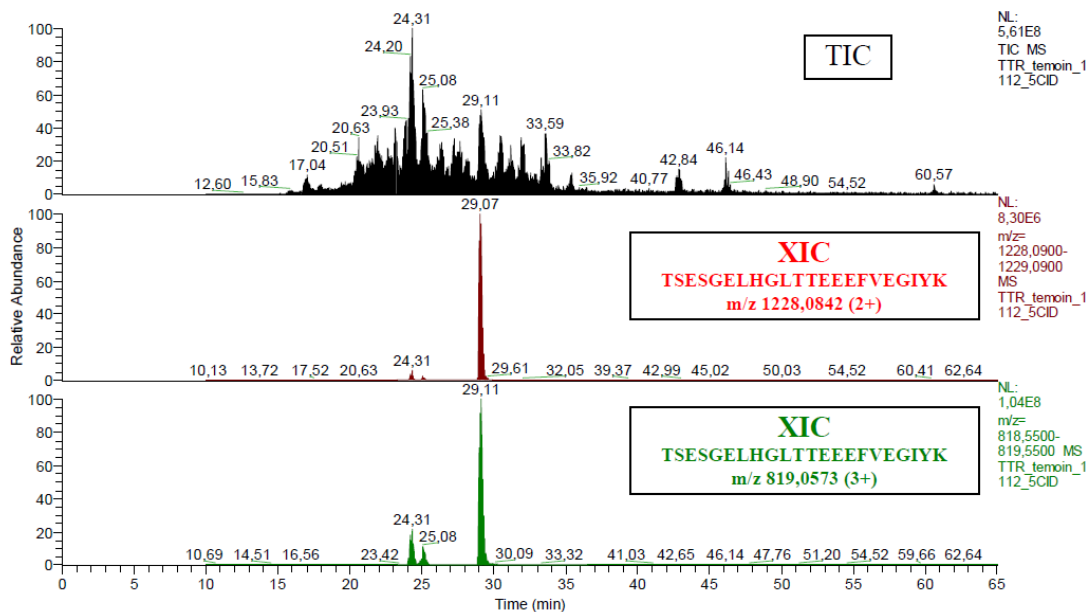


Figure 2.5 – Courant ionique total obtenu lors de l'analyse du digestat de TTR (noir). Extraction de l'ion (XIC) di- chargé (rouge) et tri-chargé (vert) du peptide PN

Pour ces deux expériences préliminaires, nous avons souhaité ne pas colorer par le bleu de Coomassie les bandes de TTR soumises à la digestion enzymatique de façon à faciliter l'interprétation des spectres de masse en cas de traces résiduelles de ce colorant susceptibles de masquer les pics d'intérêt de la TTR. Le repérage et la découpe des bandes de TTR sur le gel de polyacrylamide sans coloration n'étant pas simple à réaliser, une troisième expérience a été réalisée en procédant à une coloration du gel entier après migration et avant excision. Par ailleurs, de façon à connaître précisément la quantité de TTR déposée sur le gel, et à simplifier le protocole en éliminant les phases de déplétion et de filtration, ce troisième essai a été mené sur une TTR commercialisée sous forme de lyophilisat (Prealbumin from human plasma, Sigma Aldrich, France). Quatre dépôts de 10 μ L d'une solution aqueuse de TTR à la concentration de 7,143 μ g/ μ L (soit 71,43 μ g par puits) ont été soumis à l'analyse SDS-PAGE

selon le protocole décrit en annexe A.I.

Le gel obtenu après migration et coloration par le bleu de Coomassie est présenté sur la figure 2.6. Les bandes bien distinctes correspondant à la masse du monomère de la TTR (13,8 kDa) ont été digérées selon la méthode décrite dans l'annexe A.II. Les analyses en spectrométrie de masse (figures 2.7 et 2.8) ont confirmé à nouveau la présence dans le digestat du peptide PN. Par ailleurs, le profil chromatographique indique que le rendement de la réaction d'hydrolyse est élevé puisque peu de pics sont présents à la fin du gradient d'élution.

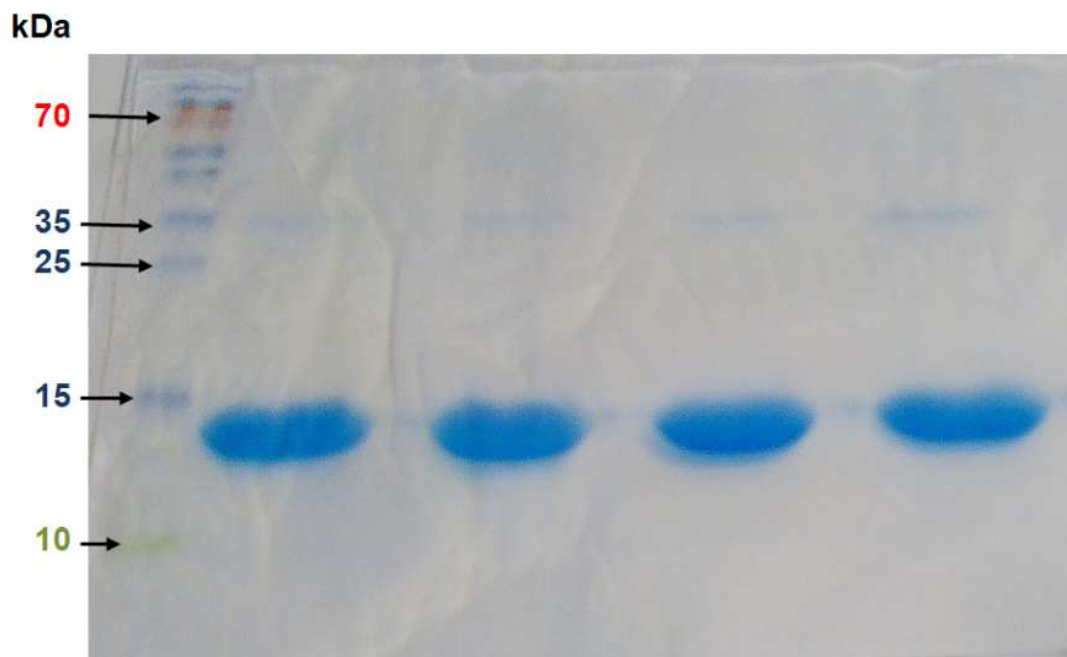
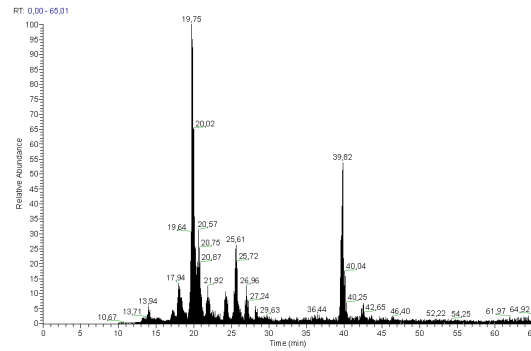
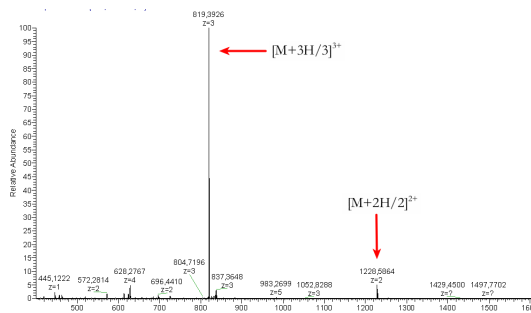


Figure 2.6 – Analyse PAGE-SDS de la TTR commerciale
(Conditions SDS-PAGE en annexe A.III)



(a)



(b)

Figure 2.7 – Analyses nano LC-ESI-MS/MS du digestat de la TTR (A) le courant ionique total comprenant (B) le spectre MS des ions $[M+2H/2]^{2+}$ et $[M+3H/3]^{3+}$ correspondant au peptide PN
(Conditions d'analyse en annexe A.IV)

Protein hits :

TTHY_HUMAN	Transthyretin OS=Homo sapiens GN=TTR PE=1 SV=1
ALBU_BOVIN	Serum albumin OS=Bos taurus GN=ALB PE=1 SV=4
TTHY_MACFA	Transthyretin OS=Macaca fascicularis GN=TTR PE=2 SV=2
TRY1_BOVIN	Cationic trypsin OS=Bos taurus PE=1 SV=3
K2C1_HUMAN	Keratin, type II cytoskeletal 1 OS=Homo sapiens GN=KRT1 PE=1 SV=6
CO3_HUMAN	Complement C3 OS=Homo sapiens GN=C3 PE=1 SV=2
ALBU_FELCA	Serum albumin OS=Felis catus GN=ALB PE=1 SV=1
CO3_CAVPO	Complement C3 OS=Cavia porcellus GN=C3 PE=1 SV=2
K2C7_BOVIN	Keratin, type II cytoskeletal 7 OS=Bos taurus GN=KRT7 PE=2 SV=1
ALBU_MESAU	Serum albumin OS=Mesocricetus auratus GN=ALB PE=1 SV=1
ALBU_MOUSE	Serum albumin OS=Mus musculus GN=Alb PE=1 SV=3
K1C9_HUMAN	Keratin, type I cytoskeletal 9 OS=Homo sapiens GN=KRT9 PE=1 SV=3
K2C73_MOUSE	Keratin, type II cytoskeletal 73 OS=Mus musculus GN=Krt73 PE=1 SV=1
GFAP_BOVIN	Glial fibrillary acidic protein OS=Bos taurus GN=GFAP PE=2 SV=2
TRY1_HUMAN	Trypsin-1 OS=Homo sapiens GN=PRSS1 PE=1 SV=1

(a)

Score	Mr(calc):	Delta	Sequence
57.8	2454.1438	0.0239	TSESGELHGLTIEEFVEGIYK

(b) Score MASCOT de la fragmentation MS/MS du pic 819.0631 m/z

Score	Mr(calc):	Delta	Sequence
47.9	2454.1438	0.0079	TSESGELHGLTIEEFVEGIYK

(c) Score MASCOT de la fragmentation MS/MS du pic 1228.0831 m/z

Figure 2.8 – Identification MASCOT des différentes protéines présentes dans l'échantillon de digestat de la TTR (A). Résultats MASCOT pour l'identification du PN pour les ions $^{2+}$ (B) et $^{3+}$ (C)

B Développement de la méthode d'analyse des fragments peptidiques de la TTR par EC couplée à la détection par absorption dans l'UV

I Étude préliminaire : séparation des peptides d'intérêt pour l'étude de la substitution TTR Thr49Ala

I.1 Optimisation de la séparation

La mise au point des conditions d'analyse par électrophorèse capillaire des fragments peptidiques d'intérêt pour l'étude du variant TTR Thr49Ala a été réalisée sur deux peptides synthétiques PN (GPS1344, Genepep, France) et PM (GPS1345, Genepep, France) dont la séquence peptidique mime respectivement celle des peptides obtenus par hydrolyse de la TTR sauvage et de la forme mutante (cf. tableau 2.3).

	Peptide natif (PN)	Peptide mutant (PM)
Séquence primaire	N-termTSESGELHGLTTEEEFVEGIYKC-term	N-termA S ESGELHGLTTEEEFVEGIYKC-term
Masse moléculaire (Da)	2455,6	2425,1
Point isoélectrique	4,2	4,2

Table 2.3 – Caractéristiques physico-chimiques des peptides d'intérêt pour l'étude du variant TTR Thr49Ala (informations obtenues avec l'outil ProtParam de la plateforme ExPASy)

La séparation des peptides a été effectuée selon le mode d'électrophorèse capillaire de zone en utilisant une détection par absorption dans l'UV. L'optimisation de la méthode d'analyse a porté sur la composition de l'électrolyte support, elle a été réalisée par Ibrahim Habib, stagiaire Master 2 [123]. Lors de ces travaux, l'analyse des peptides PN et PM (0,2 mg/mL dans l'eau) a été effectuée sur un capillaire de silice fondue (57 cm longueur totale, 50 cm longueur effective, 75 µm diamètre interne, Phymep, France) à 25°C sous une tension de 15 kV en utilisant une détection UV 214 nm réalisée du côté cathodique. Nous avons choisi de travailler avec un capillaire de 75 µm de diamètre car ce diamètre plutôt important nous permettrait, en théorie, d'augmenter la sensibilité de détection. Différents électrolytes sup-

ports présentant une force ionique constante de 40 mM et un pH variant sur une gamme allant de 2 à 10 ont été testés pour la séparation (cf. tableau 2.4).

pH acide	Tampon (force ionique 40 mM)	pH basique	Tampon (force ionique 40 mM)
2,0	Citrate de sodium	7,5	Phosphate de sodium
2,3	Phosphate de sodium	8,0	HEPES
2,5	Phosphate/citrate de sodium	8,5	HEPES/Tricine
3,0	Formate d'ammonium	8,8	Tricine
3,5	Formate d'ammonium	9,0	Tricine
4,0	Citrate de sodium	9,2	Tricine
4,5	Citrate de sodium	9,5	Borate de sodium
		10,0	Borate de sodium

Table 2.4 – Caractéristiques des différents électrolytes utilisés pour la séparation des peptides PN et PM par EC

Les analyses réalisées en milieu acide (pH 2,0 à 4,5) ont montré que le comportement électrophorétique des peptides PM et PN était strictement identique, conduisant à une co-migration des deux analytes s'accompagnant d'un temps d'analyse élevé et d'une efficacité de pic faible. En milieux neutre et alcalin, les peptides présentent une charge nette négative (pI 4,2) et sont entraînés vers la cathode grâce au flux électroosmotique dont l'amplitude est élevée dans cette gamme de pH. Une diminution du temps de migration des peptides et une augmentation de l'efficacité de pic est observée par rapport aux analyses réalisées en milieu acide. La résolution entre les pics caractéristiques de PN et PM en fonction du pH du tampon de séparation est présentée sur la figure 2.9.

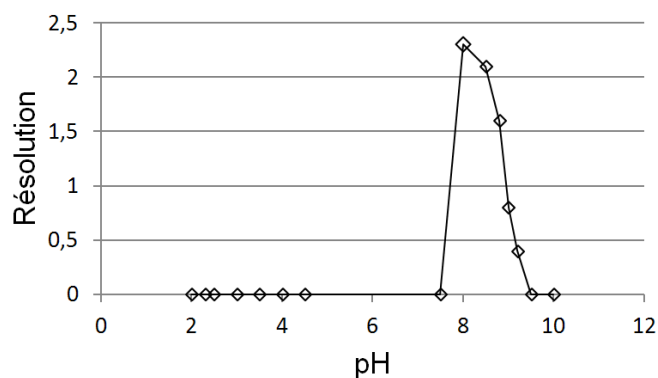


Figure 2.9 – Résolution entre les pics caractéristiques de PN et PM en fonction du pH du tampon de séparation (Rs calculée en utilisant le modèle gaussien de représentation des pics)

Une co-migration des peptides est observée en milieux de pH acide, neutre et supérieur à 9,2. En revanche, il apparaît une fenêtre de pH entre 8,0 et 9,2 pour laquelle la séparation des peptides est obtenue. L'amélioration de la résolution observée dans cette gamme étroite de pH, proche des valeurs de pKa caractéristiques de la fonction amine N-term, pourrait être liée à l'état d'ionisation légèrement différent pour PN et PM de l'amine primaire des résidus situés à l'extrémité N-term (thréonine pour PN et alanine pour PM). La résolution optimale (R_s 2,3) a été obtenue avec le tampon HEPES pH=8, 40mM. Comme le montre l'électrophérogramme de la figure 2.10, représentant l'analyse d'un mélange de PN et PM réalisée dans ces conditions optimales, le temps d'analyse est inférieur à 12 minutes et l'efficacité de la séparation, estimée en calculant le nombre de plateaux théoriques ($110500 < N < 110600$) est satisfaisante.

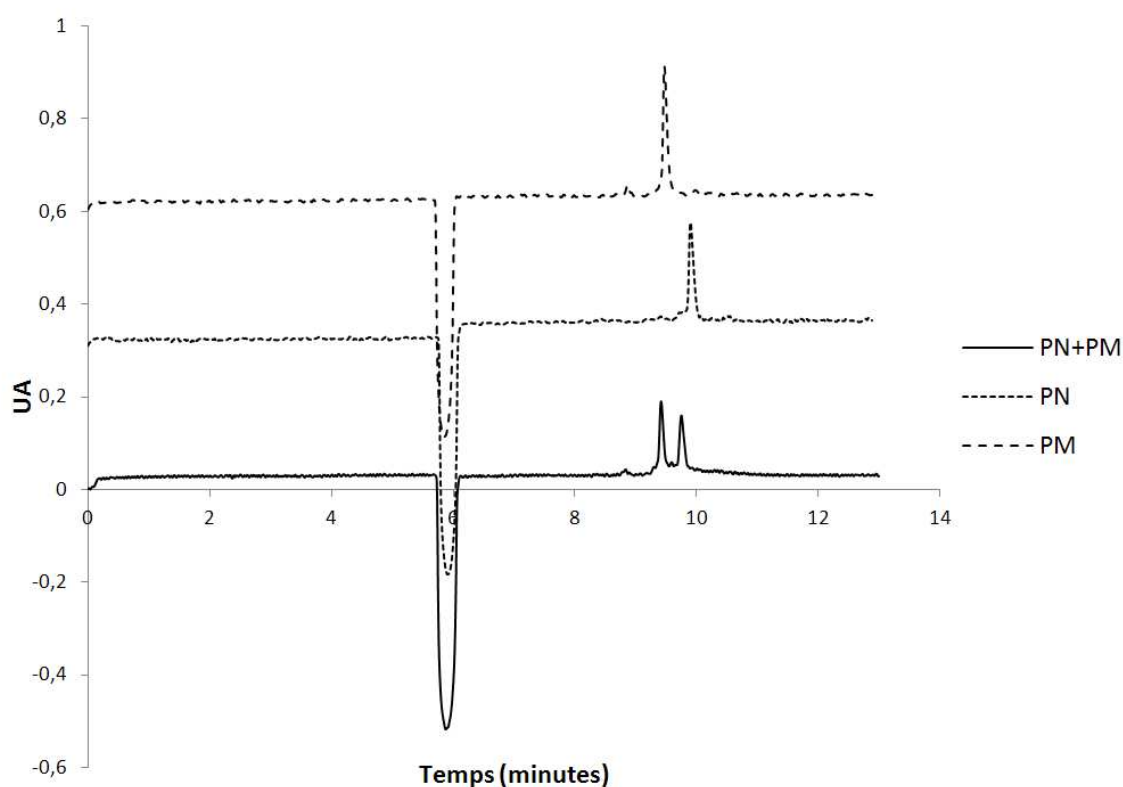


Figure 2.10 – Analyse en électrophorèse capillaire d'un mélange des peptides PN et PM
Conditions : électrolyte support, tampon HEPES 40 mM pH 8, capillaire silice vierge (60×50cm×75μm), voltage 15 kV, température 25°C, concentration des peptides (PN 0,2 mg/ mL, PM 0,2 mg/ mL), détection UV 214 nm.

I.2 Validation de la méthode

La validation de la méthode de séparation précédemment optimisée a été partiellement réalisée en étudiant les critères de linéarité, répétabilité, limites de détection et de quantification. L'étude de la linéarité a été menée en analysant une solution de PN et PM dans une gamme de concentrations variant de 1 à 10 μM . L'aire du pic correspondant à chacun des peptides a été reportée en fonction de la concentration du peptide (cf. figure 2.11).

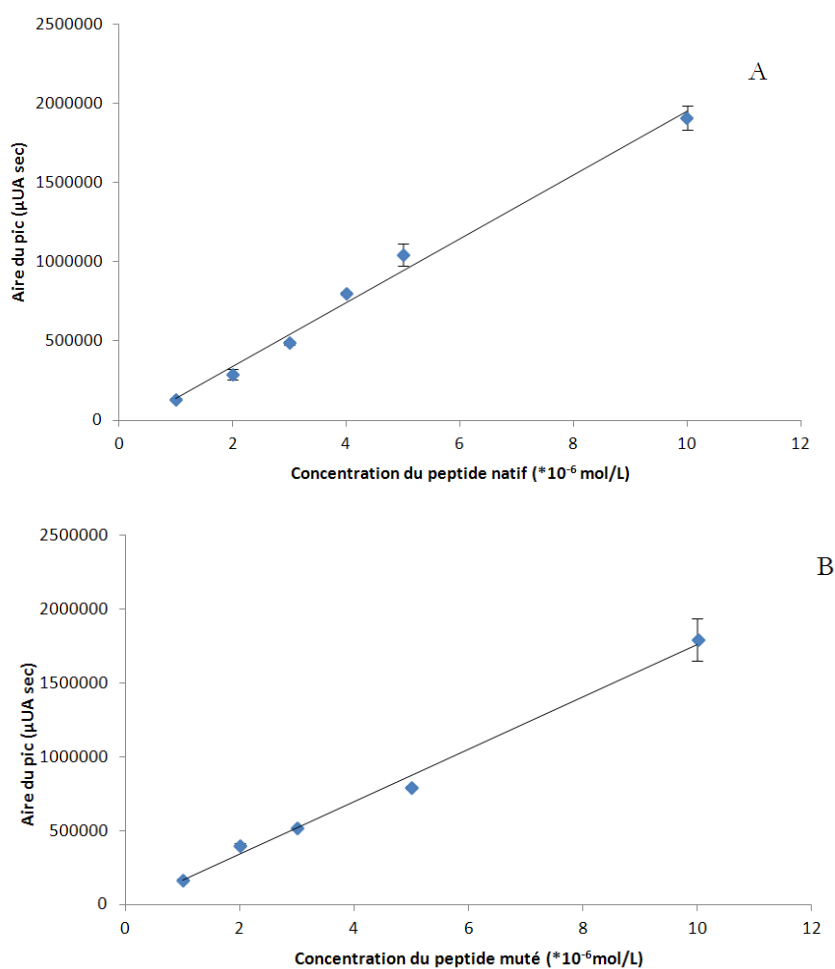


Figure 2.11 – Étude de la linéarité de la réponse aire de pic en fonction de la concentration (A) du peptide natif et (B) du peptide mutant

Dans les deux cas, les droites de régression d'équation $y = 2.10^{11} x - 62867$ (pour PN) et $y = 2.10^{11} x - 10014$ (pour PM), caractérisées par un coefficient de corrélation respectivement égal à 0,995 et 0,997, ont été établies prouvant la linéarité de la méthode sur la gamme de concentrations étudiée. La répétabilité de la méthode a été évaluée en calculant les coefficients

de variation (CV) de l'aire et du temps de migration des pics obtenus sur 3 analyses consécutives d'une solution de PN et PM à la concentration de 5 μM . Les valeurs de CV(%) calculées pour les 2 peptides (CV aire $\leq 1,1\%$ et CV Tm $\leq 0,1\%$) sont satisfaisantes et indiquent que le phénomène d'adsorption des analytes sur les parois du capillaire de séparation, susceptible d'être observé lors de l'analyse ECZ de peptides sur un capillaire de silice fondue, n'est pas mis en évidence dans les conditions de séparation retenues. La limite de détection (LOD) et la limite de quantification (LOQ) ont été déterminées en évaluant le rapport signal sur bruit (S/B), avec un rapport S/B calculé de 3 pour la LOD et de 10 pour la mesure de la LOQ. Les valeurs de LOD et LOQ ainsi calculées sont respectivement égales à 0,6 μM et 1 μM .

En conclusion, les résultats présentés dans cette partie montrent que la séparation électrocinétique sur capillaire des peptides PN et PM peut être obtenue en moins de 12 minutes avec une résolution entre les deux analytes tout à fait satisfaisante ($R_s = 2,3$). Par ailleurs, les résultats du début de la validation analytique montrent que la méthode développée répond aux critères de linéarité et répétabilité nécessaires pour effectuer dans de bonnes conditions l'analyse quantitative des peptides. La limite de quantification obtenue au moyen d'une détection par absorption dans l'UV (LOQ = 1 μM) pourrait être compatible avec l'analyse d'échantillons biologiques compte tenu de la concentration élevée de la TTR dans le sérum (14 - 29 μM).

II Carte peptidique de la TTR

L'électrophorèse capillaire est une technique puissante particulièrement bien adaptée pour l'étude de la cartographie peptidique des protéines en raison de la rapidité et de l'efficacité de la séparation et de la très faible consommation de l'échantillon. La carte peptidique établie constitue une empreinte de la protéine qui permet de mettre en évidence des différences mineures de la composition en acides aminés permettant la détection de variants [124]. Le mode de séparation fréquemment utilisé est l'électrophorèse capillaire de zone. Dans ces conditions, pour limiter les interactions peptides/paroi du capillaire de silice fondue susceptibles de limiter l'efficacité de la séparation, les analyses sont généralement réalisées en utilisant un électrolyte de pH très faible. C'est donc dans ces conditions expérimentales que nous avons

contrôlé dans un premier temps le digestat de la TTR par EC. Les analyses par MS ayant montré que les échantillons issus de l'hydrolyse de TTR extraite de sérum d'individus sains et de TTR humaine produite par Sigma-Aldrich contiennent tous deux le peptide d'intérêt PN, nous avons sélectionné pour cette étude l'échantillon commercial, de façon à maîtriser la concentration de protéine digérée dans l'échantillon analysé.

L'analyse du digestat de TTR à la concentration de 0,24 mmol/L (calculée sur la base de la masse de TTR déposée sur le gel de polyacrylamide puis digérée selon le protocole décrit dans la première partie de ce chapitre) a été réalisée sur un capillaire de silice fondue (50 cm longueur effective, 60 cm longueur totale, 75 μm diamètre interne, Phymep, France) en appliquant une tension de 15 kV et en utilisant comme électrolyte support un tampon phosphate de sodium pH=2, 40mM. Dans ces conditions de pH acide, tous les peptides issus de la digestion sont globalement chargés positivement (cf. tableau 2.1) et migrent vers le détecteur situé à l'extrémité cathodique. L'électrophérogramme correspondant à cette analyse est présenté sur la figure 2.12.

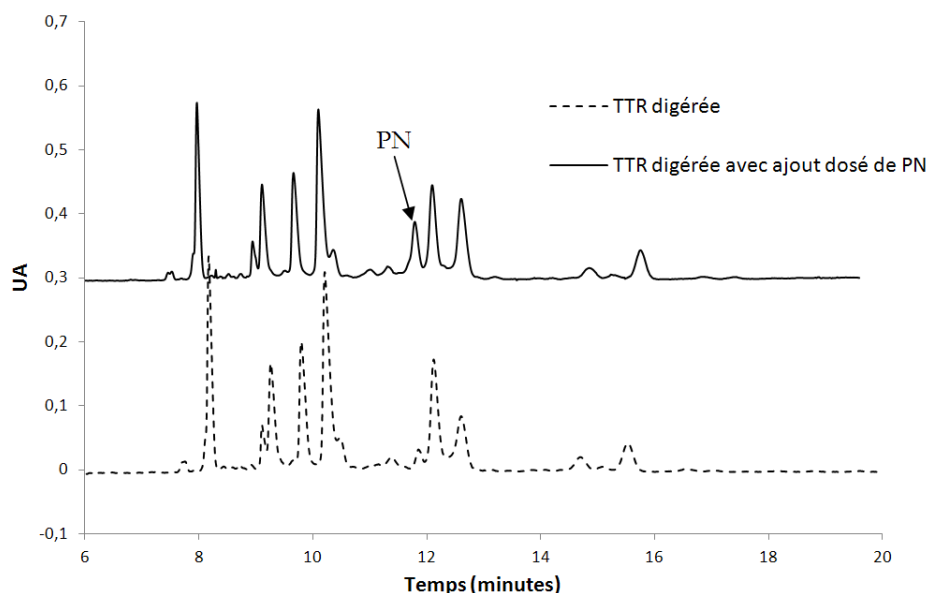


Figure 2.12 – Carte peptidique de la TTR établie par électrophorèse capillaire en tampon de séparation de pH acide

Échantillon de digestat repris dans l'eau (tirets) échantillon de digestat avec un ajout d'une solution du peptide synthétique PN (5 μM) (trait plein).

Conditions : capillaire silice vierge (60 \times 50 cm \times 75 μm), voltage 15 kV, température 25°C, détection UV 214 nm. Tampon phosphate de sodium pH2, 40mM

Compte tenu du nombre de fragments théoriques attendus (10 en supposant qu'il n'y a pas d'erreur de clivage, cf. tableau 2.1), la séparation obtenue dans ces conditions est satisfaisante puisqu'une dizaine de pics caractérisés par des temps de migration compris entre 7 et 16 minutes, et dans l'ensemble bien résolus les uns des autres, est observée sur la carte peptidique. Ces résultats confirment l'efficacité de la digestion de la TTR mise en évidence précédemment par spectrométrie de masse. Notre objectif étant d'identifier sur cette carte le peptide d'intérêt PN, une seconde analyse a été réalisée en effectuant un dopage de la solution de digestat par ajout d'une solution du peptide synthétique PN. Comme nous pouvons l'observer sur l'électrophérogramme de la solution dopée en PN (cf. figure 2.12), la hauteur du pic situé vers 11,7 minutes, et qui présente une résolution satisfaisante avec le pic adjacent situé vers 12,1 minutes, augmente. Là encore, ces résultats confirment que le protocole de digestion de la TTR développée permet de former le peptide d'intérêt PN mis en évidence par MS.

Les travaux préliminaires présentés dans la partie B.I.1, concernant l'optimisation de la séparation des peptides synthétiques PN et PM, ont montré qu'une résolution entre les deux peptides ne pouvait être obtenue qu'au moyen d'un électrolyte support de pH compris entre 8 et 9,2.

Nous avons donc analysé, dans un second temps, le digestat de la TTR en utilisant les tampons borate pH 9, 40 mM et HEPES pH 8, 40 mM comme électrolytes de séparation. L'électrophérogramme présenté sur la figure 2.13, montre que la séparation effectuée à pH 9 est dans l'ensemble moins favorable que celle décrite précédemment à pH 2, en particulier pour discriminer les premiers pics situés à des temps de migration compris entre 4 et 5 minutes. En revanche, cinq pics fins et bien résolus les uns des autres sont observés pour des temps de migration supérieurs à 5 minutes. L'analyse de la solution de digestat dopée par ajout d'une solution de PN montre que le pic caractéristique de ce peptide est situé dans le second groupe de pics, son temps de migration étant de 6,9 minutes (cf. figure 2.13). Il est bien séparé du pic adjacent observé sur l'électrophérogramme vers 7,1 minutes. L'analyse obtenue en réalisant la séparation du digestat de TTR en tampon HEPES pH 8 est également moins discriminante que celle obtenue en tampon pH 2 (cf. figure 2.14). Cependant, elle permet là encore d'identifier sans difficulté le pic caractéristique de PN observé sur l'électrophé-

gramme vers 6,9 minutes. Notre objectif étant de pouvoir discriminer les peptides PN et PM, nous avons analysé en dernier lieu une solution de digestat dopée à la fois en peptide PN et en peptide PM. Comme le montre l'électrophérogramme obtenu en utilisant comme électrolyte support le tampon HEPES pH 8 (cf. figure 2.14), le pic caractéristique de PM, situé vers 6,6 minutes, est observé dans une zone ne présentant aucun signal. Ces résultats confirment que les peptides PN et PM sont parfaitement bien séparés dans ces conditions d'analyse et qu'il n'y a aucune interférence liée à la présence des autres fragments peptidiques susceptible de compromettre la quantification de ces analytes.

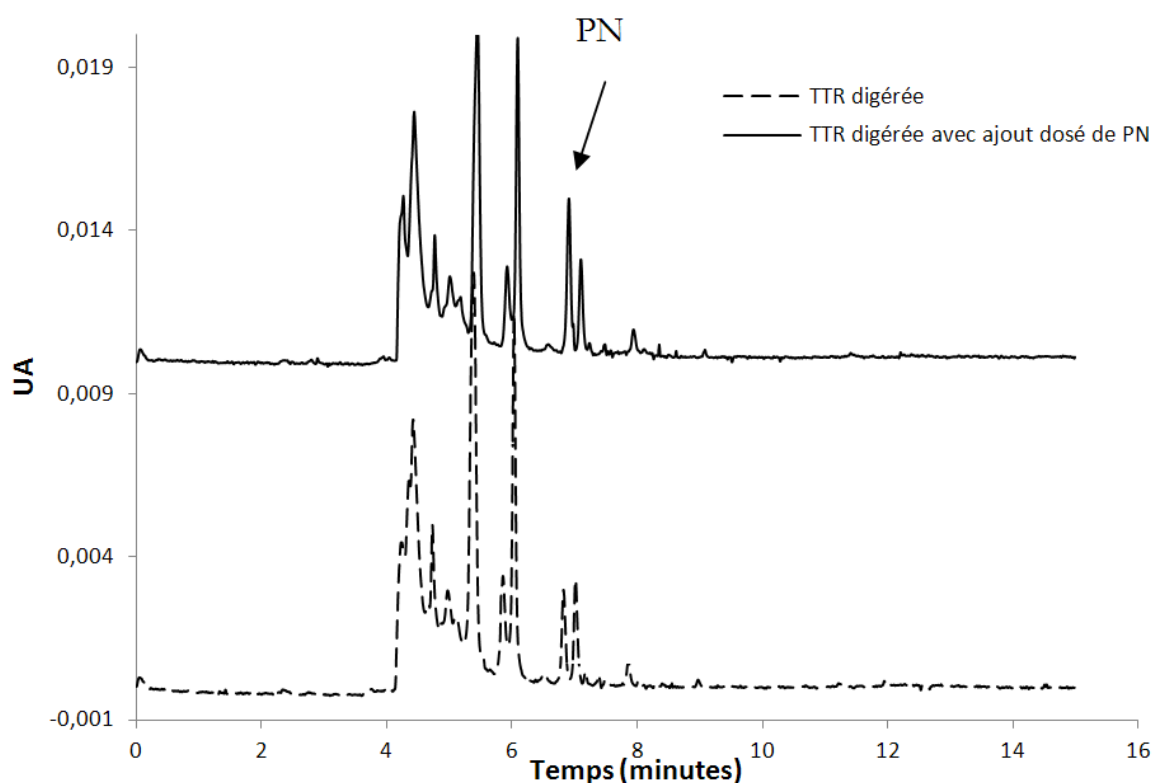


Figure 2.13 – Carte peptidique de la T^{*}TTR en milieu basique (tirets) avec un ajout dosé de peptide PN (5 μ M) (trait plein)

Conditions : capillaire silice vierge (60 \times 50 cm \times 75 μ m), voltage 15 kV, température 25°C, détection UV 214 nm. Tampon borate de sodium pH9, 40mM

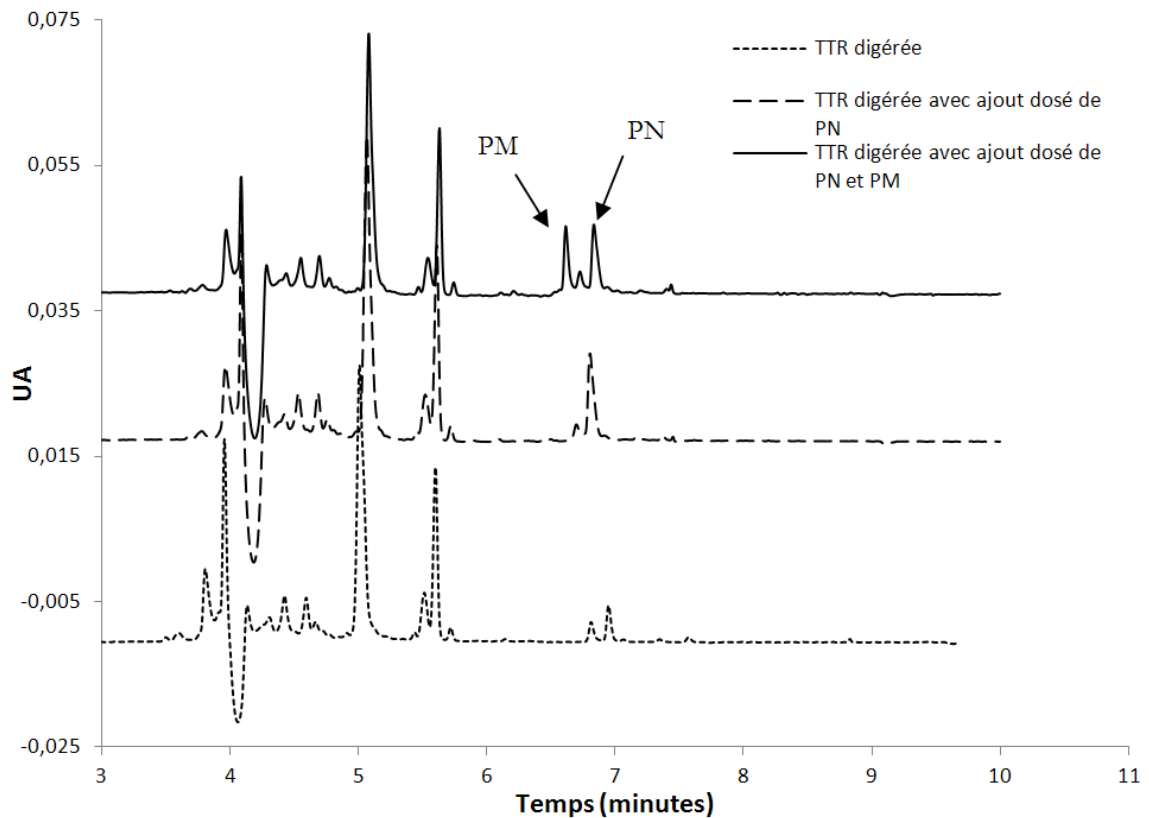


Figure 2.14 – Carte peptidique de la TTR en milieu basique (tirets) avec un ajout dosé de peptides PN et PM ($5\mu\text{M}$ chacun) (trait plein) et ajout dosé de PN ($5\mu\text{M}$) (grands tirets)
Conditions : capillaire silice vierge ($60\times 50\text{ cm}\times 75\text{ }\mu\text{m}$), voltage 15 kV, température 25°C , détection UV 214 nm. Tampon HEPES pH8, 40mM

C Conclusions

Les résultats présentés dans ce chapitre ont permis de montrer que le protocole de digestion sur gel de la TTR sauvage par la trypsine, développé au cours de nos travaux, permet d'obtenir un rendement de digestion élevé et conduit à la formation du peptide d'intérêt que nous avons sélectionné pour l'étude de la substitution TTR Thr49Ala. La méthodologie appliquée à 2 échantillons de TTR issue du sérum d'individus sains et un échantillon de TTR commerciale a permis d'obtenir de façon répétable ce peptide d'intérêt dont la structure a été confirmée par les analyses réalisées en spectrométrie de masse nanoLC-MS/MS.

Par ailleurs, l'étude du comportement électrocinétique des peptides synthétiques PN et PM, mimant les fragments peptidiques d'intérêt pour l'étude de la substitution Thr49Ala a

permis de sélectionner des conditions d'analyse ECZ permettant de séparer avec une résolution satisfaisante ($R_s = 2,3$) ces peptides en moins de 12 minutes. La validation analytique de la méthode montre qu'elle répond aux critères de linéarité et répétabilité nécessaires pour effectuer dans de bonnes conditions l'analyse quantitative des peptides. La limite de quantification obtenue au moyen d'une détection spectrométrique d'absorbance dans l'UV (LOQ = 1 μM) pourrait être compatible avec l'analyse d'échantillons biologiques compte tenu de la concentration élevée de la TTR dans le sérum (14 - 29 μM).

Enfin, les travaux menés ont permis d'établir par ECZ une cartographie peptidique performante de la TTR sauvage permettant de discriminer en moins de 16 minutes les principaux fragments peptidiques générés par hydrolyse trypsique de la protéine. La meilleure résolution de l'ensemble des pics est obtenue en analysant le digestat sur un capillaire de silice fondue en utilisant le tampon phosphate 40 mM pH 2 comme électrolyte support. Cette analyse permet d'identifier le pic caractéristique du peptide d'intérêt PN et de confirmer l'efficacité de la digestion de la TTR. Si les séparations électrocinétiques du digestat obtenues en milieu alcalin (pH 8 et 9) sont sensiblement moins performantes que celle réalisée au moyen d'un tampon de séparation de pH 2, l'identification du peptide PN a pu être également effectuée dans ces conditions. Nous avons par ailleurs montré que l'analyse du digestat de TTR sauvage additionné du peptide mutant PM, réalisée en utilisant le tampon HEPES 40 mM pH 8, permet d'identifier le pic caractéristique de PM sans aucune interférence liée à la présence des autres fragments peptidiques. Dans cette matrice complexe, comparable à celle qui pourrait être caractéristique d'un sérum de patient atteint de FAP à TTR Thr49Ala, la résolution entre PN et PM est satisfaisante et pourrait être exploitée pour réaliser la quantification des deux analytes.

Chapitre 3

Dérivation des peptides d'intérêt pour l'étude de la substitution TTR Thr49Ala

Dans le but de réduire la limite de quantification des peptides d'intérêt et de transposer la méthode de séparation sur puce, nous avons souhaité étudier l'analyse des peptides par électrophorèse capillaire couplée à la détection par fluorescence induite par laser (EC-LIF). L'EC-LIF représente, en effet, une des techniques les plus sensibles pour l'analyse quantitative des protéines et des peptides [125, 126, 127, 128]. Cependant, seuls les peptides et protéines, ayant dans leur structure primaire la présence des résidus Tyr, Trp ou Phe possèdent une fluorescence naturelle. Cette fluorescence n'est par ailleurs exploitable qu'en utilisant des sources lasers qui émettent dans l'UV. Donc, afin de faire des analyses EC-LIF, l'approche la plus commune consiste en la dérivation covalente des résidus d'acides aminés avec un marqueur rendant la molécule fluorescente [129]. Cependant, le challenge est de réaliser cette réaction de façon reproductible et avec un rendement élevé lorsque l'objectif est de réaliser la quantification des analytes. En outre, la dérivation peut compliquer les électrophérogrammes en raison de la possible formation de produits secondaires fluorescents, de l'obtention de multiples formes dérivées du peptide d'intérêt portant une ou plusieurs molécules de marqueur et également en raison de la présence même du marqueur si celui-ci est fluorescent [87].

Le choix d'un bon marqueur est donc une tâche très importante, orientant toute la suite du développement analytique. Une multitude de marqueurs covalents a été développée pour la

dérivation des peptides et des protéines. La plupart d'entre eux peuvent réagir avec les amines primaires ou secondaires des acides aminés, d'autres réagissent avec les groupements thiols des résidus cystéine [87, 90] et d'autres encore, bien moins fréquemment utilisés, réagissent avec les acides carboxyliques. Notre choix s'est porté sur les molécules du premier groupe, en raison de l'absence du résidu Cys dans la séquence primaire des deux peptides d'intérêts (cf. figure 3.1). Par ailleurs, un autre choix s'offre à nous parmi deux groupes de marqueurs : les marqueurs fluorogènes, qui ne sont pas initialement fluorescents mais qui forment un produit fluorescent après réaction avec une amine, et les marqueurs fluorescents, qui sont fluorescents avant et après le marquage.

N-term GPTGTGESKPLMVKVLDAVRGSPAINVAVHVFRKAADDTWEPFASGK**TSESGELHGLTTEEFVEGIYK**
VEIDTKSYWKALGISPFHEHAEVVFTANDSGPRRYTIAALLSPYSYSTTAVVTNPKE **C-term**

N-term GPTGTGESKPLMVKVLDAVRGSPAINVAVHVFRKAADDTWEPFASGK**ASESGELHGLTTEEFVEGIYK**
VEIDTKSYWKALGISPFHEHAEVVFTANDSGPRRYTIAALLSPYSYSTTAVVTNPKE **C-term**

Figure 3.1 – Structure primaire de la TTR (en rouge) les peptides d'intérêt

Pour nos travaux, nous nous sommes intéressés à deux réactifs fluorogènes et trois fluorophores (cf. tableau 3.1). Nous détaillerons dans la suite du mémoire les différents développements analytiques réalisés pour optimiser dans un premier temps le marquage des peptides natif et mutant dont la séquence est rappelée dans la figure 3.1, puis, dans un second temps, la séparation électrocinétique des dérivés marqués.

A Optimisation du marquage des peptides natif et mutant par des réactifs fluorogènes

Deux réactifs fluorogènes ont été choisis pour le marquage des deux peptides d'intérêt : le FQ (3-(2-furoyl)quinoline-2-carboxaldehyde) et le NDA (naphthalene-2,3-dicarboxaldehyde). Le choix des réactifs fluorogènes a été dicté par leurs propriétés. En effet, ces réactifs non fluorescents forment un produit fluorescent en présence d'un agent nucléophile (CN⁻), après réaction avec un groupe fonctionnel amine [130, 131]. La stabilité des dérivés isoindoles fluorescents résultant est beaucoup plus grande que celle des dérivés ortho-phthalaldehyde par

exemple [132, 133], bien qu'ils réagissent lentement pour former des produits fluorescents secondaires [134, 135].

L'optimisation de la réaction de marquage a été effectuée en étudiant l'influence de divers paramètres tels que le pH, la force ionique et la température du milieu d'incubation, le rapport de concentrations entre le marqueur et le peptide, la température ainsi que le temps de réaction afin d'évaluer leurs influences sur le rendement de la réaction de marquage. Par ailleurs, et sachant que les peptides étudiés possèdent chacun deux amines primaires (extrémité N-terminale des résidus Thr (PN) et Ala (PM) et chaîne latérale du résidu Lys), des analyses par spectrométrie de masse ont été aussi effectuées afin de déterminer si PN et PM étaient mono ou di-marqués.

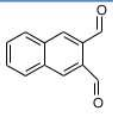
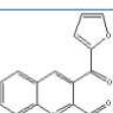
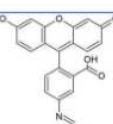
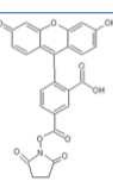
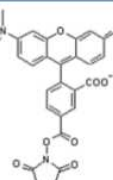
Marqueurs étudiés	Formule développée	λ_{exc} (nm)	λ_{em} (nm)	Masse molaire (g/mol)	Caractère (fluorescent/fluorogène)
NDA		419	493	184,2	fluorogène
FQ		480	590	251,2	fluorogène
FITC		492	518	389,4	fluorescent
NHS-Fluoresceine		494	519	473,4	fluorescent
TAMRA-SE		546	579	527,5	fluorescent

Table 3.1 – Récapitulatif des caractéristiques des différents fluorophores utilisés dans notre étude

I Marquage des peptides PN et PM par le NDA

Le NDA (naphthalene-2,3-dicarboxaldehyde) est un réactif fréquemment utilisé pour le marquage fluorescent pré-capillaire des amines. L'intérêt majeur de cette molécule est qu'elle est à la fois fluorogène et électroactive. Elle peut donc être détectée à la fois optiquement et électrochimiquement ce qui présente une excellente opportunité de collaboration entre notre laboratoire et le LISE (Laboratoire Interfaces et Systèmes Chimiques, UPR 15 CNRS Université Pierre et Marie Curie) dans le cadre du projet ANR « DIMIPOLE ». Ici, nous ne discuterons pas des propriétés électroactives de ce marqueur mais uniquement de ses propriétés optiques. La réaction de marquage d'une amine par ce réactif est présentée sur la figure 3.2.

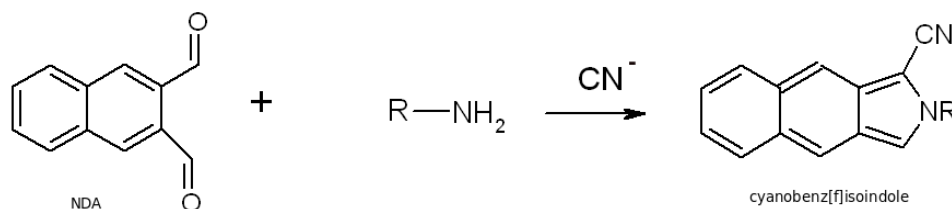


Figure 3.2 – Réaction de marquage d'une amine par le NDA
[106]

Le mécanisme de cette réaction a été décrit par de Montigny [132]. Dans ce mécanisme, les transformations clés comprennent, la première réaction de l'amine primaire avec la fonction aldéhyde du NDA pour former une imine, l'addition de HCN permet ensuite de former un alpha-aminonitrile. Après cela, une cyclisation intramoléculaire permet de former le cabinolamine, et enfin une déshydratation intervient pour conduire à la formation du dérivé CBI. Une voie de formation de produits secondaires a aussi été présentée.

I.1 Mise en place du couplage EC-LIF à 442 nm

D'après les données de la littérature [136], les dérivés fluorescents obtenus après marquage par le NDA possèdent un maximum d'excitation à 419 nm et un maximum d'émission à 493 nm. Compte tenu du prix élevé des sources lasers He Cd à 419 nm par rapport aux lasers à diodes à 442 nm et ayant vu plusieurs études sur le NDA reportant la possibilité d'exciter

les dérivés du NDA à une longueur d'onde d'excitation de 442 nm [137, 138], nous avons souhaité coupler un des appareils d'électrophorèse capillaire du laboratoire à une source laser à diodes 442 nm.

Une étude préliminaire a consisté à étudier par spectrofluorimétrie l'émission de fluorescence d'une solution de PN marquée par le NDA excitée à 419 nm et à 442 nm (spectrofluorimètre Jasco FP 750) (cf. figure 3.3).

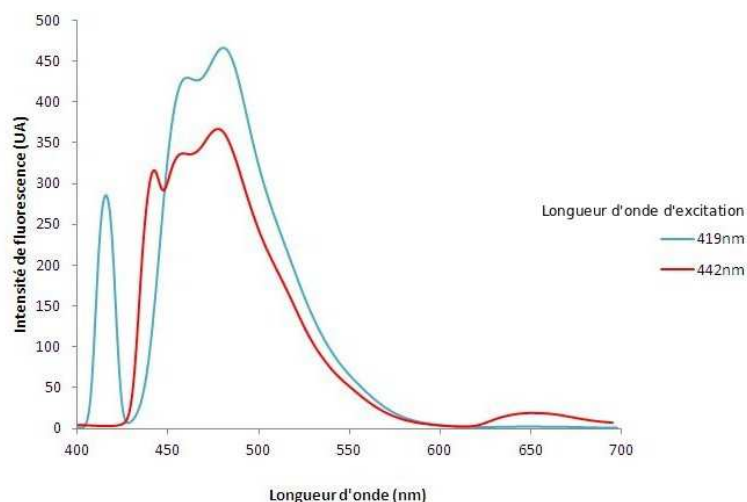


Figure 3.3 – Spectres d'émission de fluorescence d'une solution de PN marqué par le NDA enregistrée pour différentes longueurs d'ondes d'excitation

Nous observons que les spectres d'émission de fluorescence enregistrés présentent tous deux une bande caractérisée par deux maxima situés autour de 460 et 480 nm. Ce résultat est similaire à ce qui a été précédemment décrit lors d'études menées sur le marquage d'acides aminés ou d'histamines par le NDA [139, 140]. L'intensité de fluorescence la plus élevée est observée par excitation de la solution à 419 nm, elle est inférieure d'environ 25% à 442 nm. Cette diminution n'est certes pas négligeable, cependant l'émission de fluorescence reste suffisamment élevée dans ces conditions d'excitation pour envisager d'obtenir en EC une sensibilité de détection des peptides marqués par le NDA élevée par détection LIF à 442 nm.

Un des appareils d'électrophorèse capillaire du laboratoire (PA800 Beckman commercialisé avec un détecteur LIF 488) a ainsi été couplé à un laser 442 nm (BFI Optilas, France). Ce couplage a nécessité la mise en place au sein du détecteur de filtres optiques adaptés à nos be-

soins analytiques. Deux filtres différents : un filtre laser (coupe bande) et un filtre d'émission (filtre passe bande ou filtre passe haut) (CVI Melles-Griott, France) ont ainsi été sélectionnés pour optimiser la détection des peptides marqués par le NDA (cf. figure 3.4). Le filtre coupe bande a pour rôle de ne laisser passer, en excitation, que la longueur d'onde 442 nm tout en atténuant l'intensité du laser afin de ne pas saturer le détecteur et d'avoir des spectres avec le minimum de bruit de fond, ce qui permet d'augmenter la sensibilité de détection. Le filtre passe haut, quant à lui, permet le passage des longueurs d'ondes supérieures à une valeur donnée et coupe les longueurs d'onde inférieures à cette dernière. C'est donc ce filtre qui permet de recueillir les longueurs d'ondes émises par les composés marqués après leur excitation par le laser. Dans la littérature, nous avons pu voir un certain nombre de publications traitant de l'analyse (en EC ou en HPLC) et de la détection par la fluorescence de diverses molécules marquées par le NDA. Dans un certain nombre d'entre elles : [105, 141, 137, 142, 143, 144, 139], nous avons pu voir que la longueur d'onde d'émission de fluorescence prise par ces différents auteurs se situait entre 495 nm et 550 nm. Or, en regardant de plus près les caractéristiques spectrales des peptides marqués par le NDA (cf. figure 3.3), nous pouvons voir qu'à ces longueurs d'ondes là nous sommes loin du maximum d'émission de fluorescence des dérivés CBI. Nous avons donc choisi de faire notre étude en sélectionnant comme filtre d'émission un filtre passe haut à 475 nm, et comme filtre d'excitation, un filtre coupe bande à 442 nm.

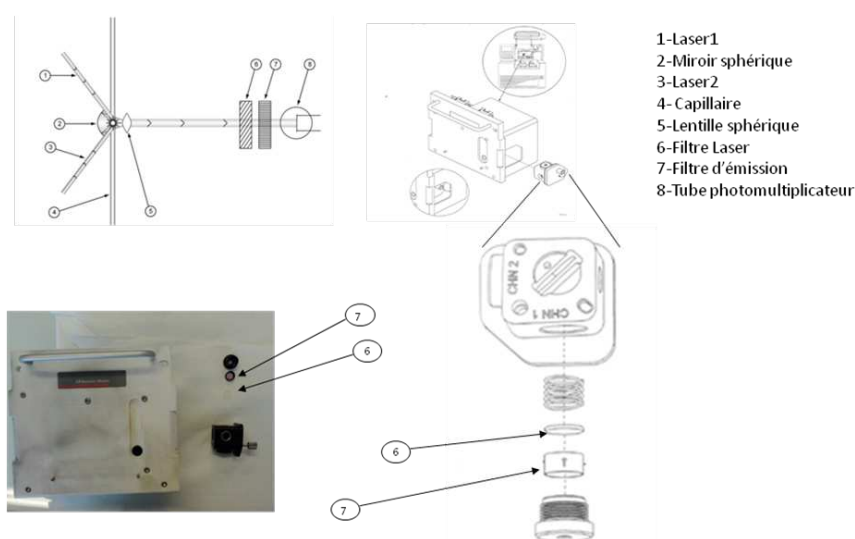


Figure 3.4 – Système optique du détecteur LIF et mise en place des filtres

Nous avons procédé à une caractérisation des filtres et du laser afin de vérifier que leurs performances étaient conformes aux spécifications du fournisseur. Les filtres ont ainsi été caractérisés en utilisant un spectromètre fibré (Océans Optics USB 2000+). Pour cela, nous avons eu à choisir entre deux sources lumineuses : une lampe LED (*light-emitting diode*, lampe électroluminescente en français) (microscope Zeiss Axio Observer 2000) et une lampe à vapeur de mercure (HXP 120 C Kübler). Le spectre de la lumière émise par les deux sources a été enregistré (cf. figure 3.5). L'intensité du signal étant plus élevée pour la LED dans la gamme de longueurs d'onde d'intérêt pour notre étude (à partir de 435 nm), nous avons sélectionné cette source pour caractériser les filtres.

Nous pouvons constater sur la figure 3.6 que les filtres dont nous avons fait l'acquisition sont compatibles avec les caractéristiques techniques données par le constructeur. En effet, la lumière LED passant par le filtre laser 442 nm présente un spectre avec une gaussienne centrée sur 442 nm, tout en atténuant son intensité, ce qui permet de ne pas saturer le détecteur. Le filtre passe haut 475 nm, quant à lui, laisse passer les longueurs d'onde supérieures à 475 nm et bloque toutes les longueurs d'onde en dessous de cette valeur.

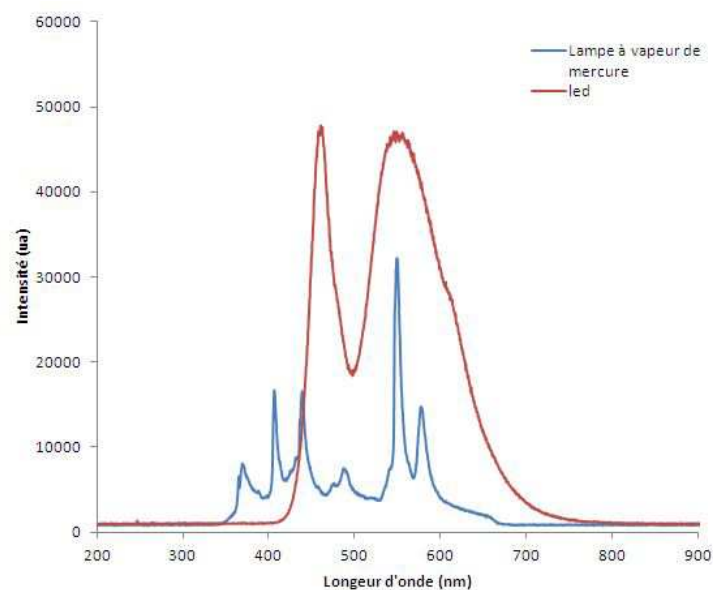


Figure 3.5 – Spectre de la lumière émise par une lampe LED (rouge) et une lampe à vapeur de mercure (bleu)

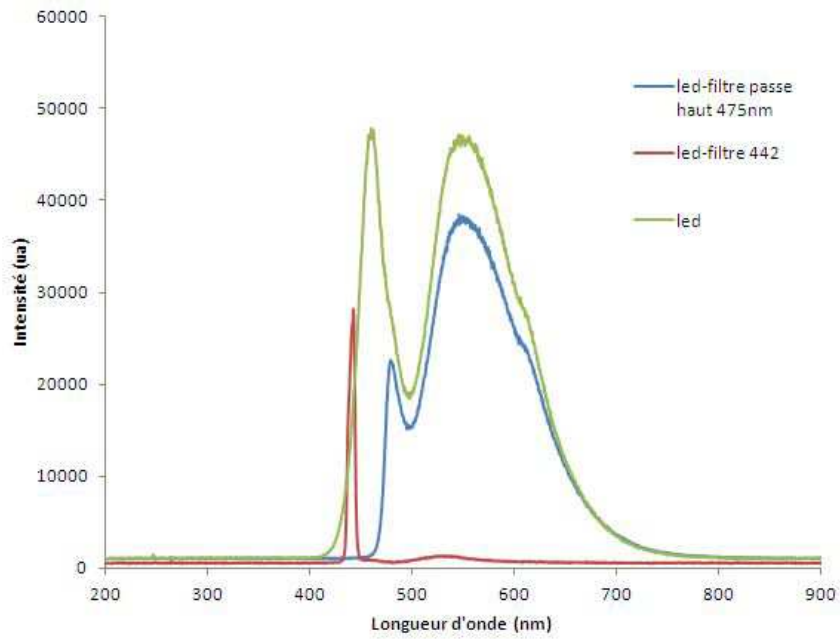


Figure 3.6 – Spectre de la lumière émise par une lampe LED avant (vert) et après le passage par les filtres coupe bande 442 nm (rouge) et passe haut 475 nm (bleu)

Une caractérisation du laser a aussi été effectuée en utilisant le spectromètre fibré utilisé plus haut. Nous avons obtenu le spectre de la figure 3.7. Nous pouvons y voir que le rayonnement du laser est à la fois intense et bien focalisé autour de 442 nm. Notre laser est donc conforme aux spécifications du fournisseur.

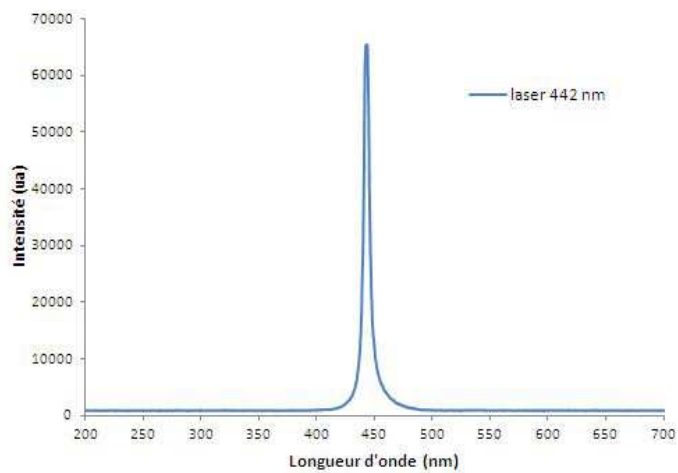


Figure 3.7 – Spectre de caractérisation du laser 442 nm

I.2 Optimisation de la réaction de marquage

Des études antérieures faites sur le marquage d'amines par le NDA [145, 139, 146, 132], montrent que plusieurs paramètres peuvent influencer sur le rendement de la réaction de dérivation. Parmi ces paramètres, les plus importants sont : le temps de réaction, le pH et la force ionique du tampon de dérivation ainsi que le rapport molaire NDA/peptide. Nous avons donc cherché à optimiser ces différents paramètres afin que la réaction de dérivation des peptides par le NDA donne le meilleur rendement possible. L'optimisation a été réalisée à température ambiante et en maintenant le rapport molaire NDA/KCN = 1 selon le protocole général décrit dans l'annexe B.I.

I.2.1 Temps de réaction

Le spectre d'émission de fluorescence d'une solution de PN incubée en présence d'un excès de NDA dans un tampon borate (pH=10, 50 mM) a été enregistré à intervalles de temps réguliers pendant 5 heures (cf. figure 3.8).

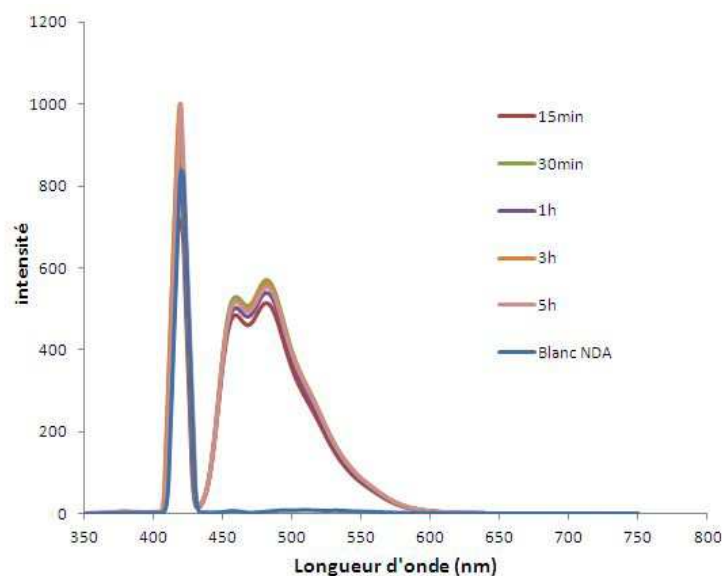


Figure 3.8 – Analyses par spectrofluorimétrie du peptide natif marqué par le NDA à différents temps de réaction $\lambda_{ex}=419$ nm
Condition de dérivation (voir annexe B.I)

Le spectre du mélange réactionnel ne contenant pas le peptide (dénommé blanc NDA) a également été enregistré dans les mêmes conditions. Dès 15 minutes d'incubation, une bande

d'émission présentant 2 maximas situés à 460 et 480 nm est observée pour la solution de peptide incubée par le NDA. Comme attendu compte tenu des propriétés fluorogènes de ce marqueur, cette bande n'est pas présente sur la solution du blanc NDA. Ces résultats confirment l'efficacité de la réaction de marquage dans les conditions opératoires retenues. Aucune différence significative de l'intensité de la bande d'émission de fluorescence caractéristique du dérivé PN-NDA n'est détectée entre 15 minutes et 5 heures d'incubation. Ceci indique, d'une part, que la réaction est achevée à 15 minutes et, d'autre part, que le produit de la réaction de marquage est stable pendant 5 heures à température ambiante à l'abri de la lumière.

I.2.2 Rapport molaire NDA/peptide

Le ratio marqueur /peptide est un facteur déterminant pour la réussite de la réaction de dérivation [139, 124]. Une trop faible concentration de marqueur par rapport à celle du peptide peut diminuer la cinétique de la réaction, tandis qu'une forte concentration de marqueur peut favoriser l'apparition de produits secondaires fluorescents qui peuvent être gênant pour détecter et quantifier par EC les analytes d'intérêt.

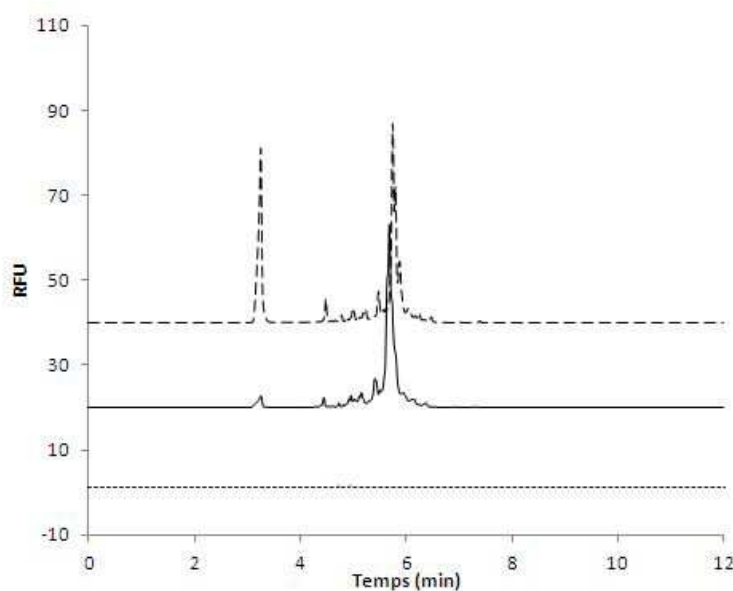


Figure 3.9 – Electrophérogramme de PN-NDA : rapport molaire NDA/PN=100 (tirets) rapport molaire NDA/PN=40 (trait plein) blanc NDA (pointillés).

Capillaire de silice vierge (50 cm L_{eff} , 75 μm .DI), tampon HEPES pH 8, 40 mM, 25 kV, 25°C. détection $\lambda_{ex}=442$ nm

Conditions de dérivation : concentration de peptide 0,2 mM, tampon borate pH = 10, 50 mM

Nous avons fait varier le rapport molaire entre le NDA et le PN de 20 à 100, tout en gardant les autres paramètres constants. L'analyse EC-LIF de solutions de PN incubées 15 minutes dans un tampon borate 50 mM pH 10 en présence de concentrations croissantes de NDA été effectuée sur un capillaire de silice fondue en sélectionnant comme électrolyte support un tampon HEPES 40 mM pH 8. Dans ces conditions, un pic correspondant au dérivé PN-NDA est observé à 5,75 minutes sur l'électrophérogramme de la solution de dérivé (cf. figure 3.9). La figure 3.10 présente l'évolution de l'aire du pic du dérivé PN-NDA en fonction du rapport molaire NDA/PN.

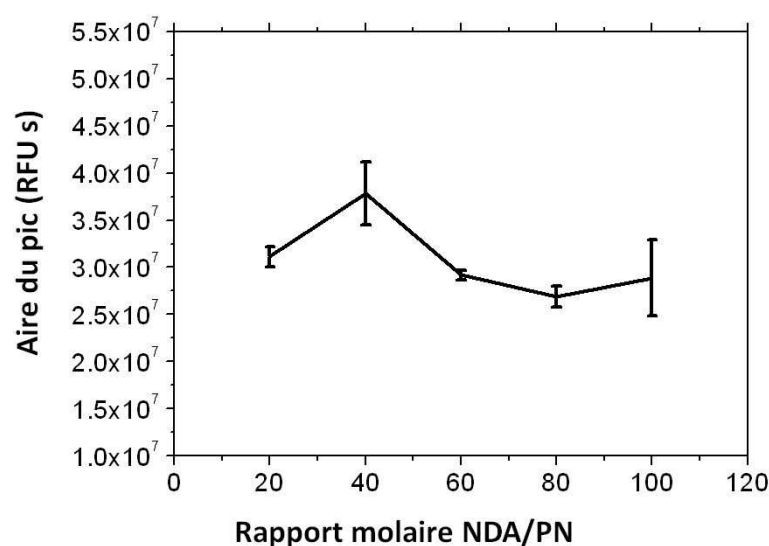


Figure 3.10 – Graphique représentant l'évolution de l'aire du pic du dérivé PN-NDA par rapport au rapport molaire NDA/PN

Une augmentation de l'aire du pic caractéristique du dérivé PN-NDA est observée lorsque le rapport molaire augmente jusqu'à 40, valeur pour laquelle l'aire maximale est obtenue. Pour des ratios supérieurs à 40, une légère diminution de l'aire du pic est observée parallèlement à l'augmentation de l'aire des pics parasites correspondant vraisemblablement aux dérivés fluorescents secondaires formés au cours de la réaction (cf. figure 3.9). Ces résultats montrent que dans les conditions expérimentales utilisées, le rapport molaire optimal entre le NDA et PN est égal à 40.

I.2.3 Force ionique du tampon

L'influence de la force ionique du tampon de dérivation sur l'efficacité du marquage de PN par le NDA a également été évaluée. Nous avons ainsi étudié l'évolution de l'aire et de l'efficacité du pic du dérivé PN-NDA obtenu lors de l'analyse EC-LIF d'une solution de PN incubée 15 min en présence de NDA (ratio NDA/PN = 40) dans un tampon borate pH 10 de force ionique variant de 10 à 100 mM (cf. figure 3.11). La séparation a été réalisée en utilisant un tampon HEPES 40 mM pH 8 comme électrolyte support et l'efficacité de pic a été estimée en calculant le nombre de plateaux théoriques.

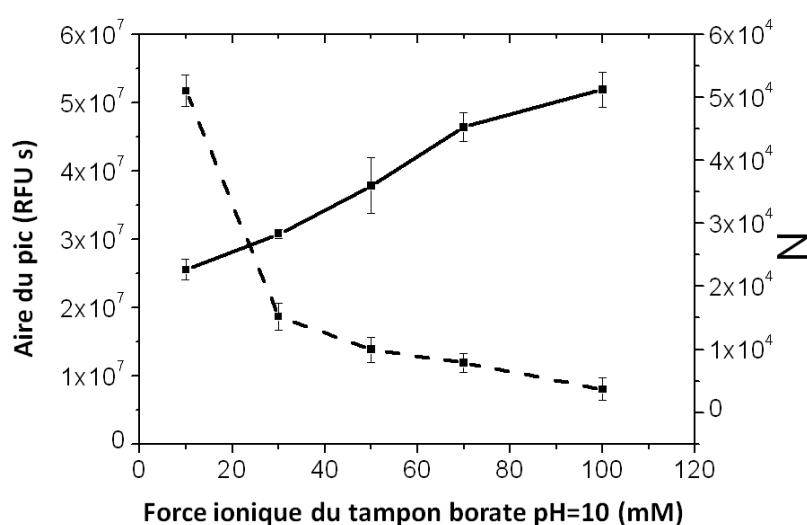


Figure 3.11 – Évolution de l'aire du pic du dérivé PN-NDA (trait plein) et de l'efficacité du pic du dérivé PN-NDA (tirets) en fonction de la force ionique du tampon de dérivation

Nous avons constaté une nette augmentation de l'aire du pic du dérivé PN-NDA avec l'augmentation de la force ionique du tampon de dérivation. L'aire du pic obtenu lorsque la dérivation est effectuée en tampon de force ionique 100 mM est ainsi doublée par rapport à celle caractéristique du pic obtenu pour une force ionique dix fois plus petite. Ces résultats sont en accord avec l'étude de Lunte *et al* qui montre que la réaction de dérivation des peptides et protéines par le NDA est catalysée lorsque la force ionique du tampon augmente [145]. Cependant, nous avons aussi mis en évidence une très nette diminution de l'efficacité de pic du dérivé PN-NDA avec l'augmentation de la force ionique du tampon de dérivation (cf. figure 3.11). Le nombre de plateaux théoriques est ainsi environ cinq fois plus grand pour

l'analyse de la solution dérivée en tampon de force ionique 10 mM par rapport au nombre de plateaux obtenu pour l'analyse de la solution de dérivation de force ionique 100 mM. Ceci peut s'expliquer par la différence de conductivité entre l'échantillon et l'électrolyte support, plus favorable pour générer une séparation efficace lorsque la concentration en sels de l'échantillon est faible.

Notre objectif étant à terme, de développer une méthode d'analyse sensible adaptée à la détection dans le sérum humain de faibles concentrations de peptides, la force ionique optimale retenue pour mener la dérivation des peptides a été fixée à 70 mM, ce qui nous est apparu être un bon compromis entre sensibilité de détection et efficacité de la séparation.

I.2.4 pH du tampon de dérivation

L'influence du pH sur la réaction de dérivation de PN par le NDA a également été étudiée sur une gamme de pH variant de 8,5 à 10. Cette gamme a été retenue car il a été montré que le rendement de la réaction de dérivation d'une amine est généralement élevé lorsque le pH du tampon d'incubation est proche du pKa de l'amine cible [132, 145]. Les solutions de dérivation de PN (tampon borate 70 mM, ratio NDA/PN = 40) ont été analysées par EC-LIF en utilisant deux systèmes tampons différents comme électrolyte support : le tampon HEPES pH=8 et tampon borate pH=10, tous deux à une force ionique de 40 mM. L'efficacité ainsi que l'aire du pic du dérivé PN-NDA calculée pour chacune des conditions expérimentales a été représentée en fonction du pH du milieu d'incubation sur les figures 3.12 et 3.13.

Quelle que soit la valeur du pH du tampon de dérivation, on observe que l'efficacité de pic obtenue en analysant la solution de dérivation avec un tampon HEPES pH 8 est très nettement inférieure à celle obtenue avec un tampon borate pH 10. Par ailleurs les aires de pics observés avec ces deux électrolytes sont équivalents. Cependant, des écart-types importants ont été observés avec le tampon HEPES notamment à pH=9,5 et 10. C'est donc sur la base de ces résultats que nous avons étudié l'évolution de l'aire du pic de PN-NDA en fonction du pH du milieu de dérivation, en utilisant le tampon borate pH10, 40mM comme électrolyte support.

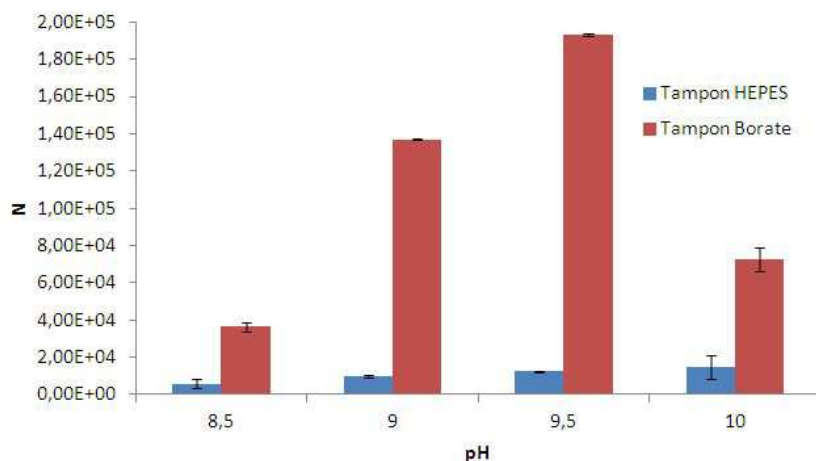


Figure 3.12 – Histogramme représentant l'efficacité de pic du dérivé PN-NDA en fonction du pH du tampon de dérivation pour les deux électrolytes supports testés pour la séparation électrocinétique

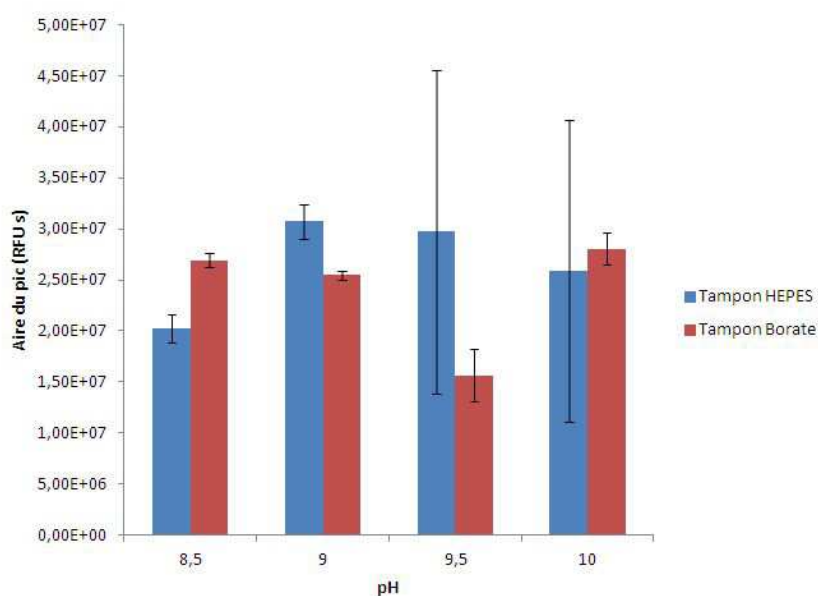


Figure 3.13 – Histogramme représentant l'aire du pic du dérivé PN-NDA en fonction du pH du tampon de dérivation pour les deux électrolytes supports testés pour la séparation électrocinétique

Comme le montre la figure 3.14, une augmentation de l'efficacité de pic est observée pour des valeurs de pH allant de 8,5 à 9,5, tandis qu'une diminution de l'aire du pic est observée dans cette gamme de pH. Pour des valeurs de pH supérieures à 9,5, l'efficacité de pic diminue tandis que l'aire du pic augmente. Dans ces conditions, il apparaît donc qu'une valeur de pH égale à 9 permet d'obtenir le meilleur compromis entre aire et efficacité de pic.

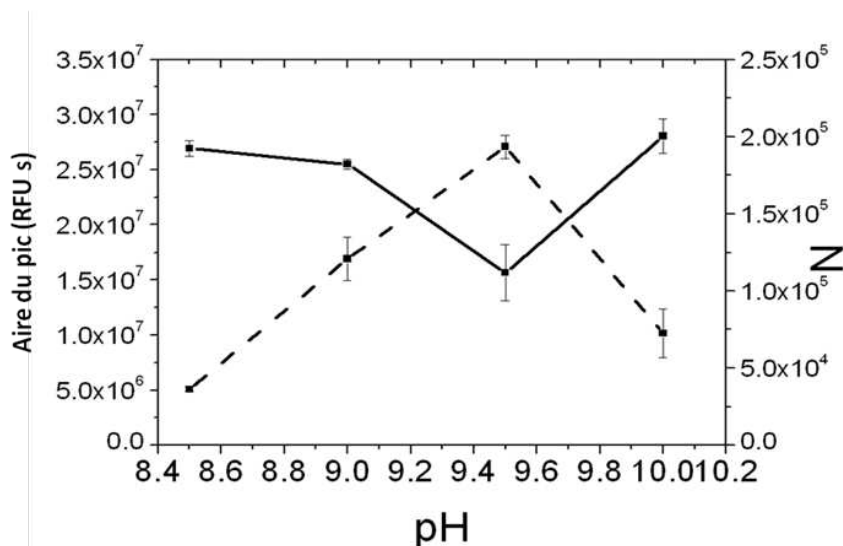


Figure 3.14 – Évolution de l'aire du pic du dérivé PN-NDA (trait pleins) et du nombre de plateaux théoriques (tirets) en fonction du pH du tampon de dérivation (borate 70 mM) - Électrolyte support : borate pH 10 40 mM

I.3 Contrôle de la réaction de marquage par spectrométrie de masse

Le contrôle de la réaction de dérivation optimisée a également été effectué par spectrométrie de masse en mode MALDI-TOF (Perseptive Biosystems Voyager-DE Pro STR). Ces analyses, réalisées au Laboratoire d'analyse pour la modélisation et la biologie (LAMBE, UMR 8587) de l'Université Evry Val d'Essonne, ont été menées dans le but de confirmer que la réaction est achevée mais également de préciser le nombre de fonctions amine marquées au cours de la réaction de dérivation des peptides d'intérêt (mono ou multi-marquage).

Comme nous pouvons le constater sur la figure 3.15, aucun pic correspondant aux peptides n'ayant pas réagi (situé à un rapport m/z de 2456 pour PN et 2426,2 pour PM) n'a été détecté sur le spectre de masse des solutions de PN et PM dérivées par le NDA, ce qui indique que la réaction de marquage est quasi-totale. Parmi les pics observés sur le spectre de masse des solutions de dérivation de PN et PM, nous trouvons les pics correspondant aux produits mono-marqué de PN et PM à un rapport m/z égal à 2630,9 (PN-NDA) et 2601,4 (PM-NDA) respectivement.

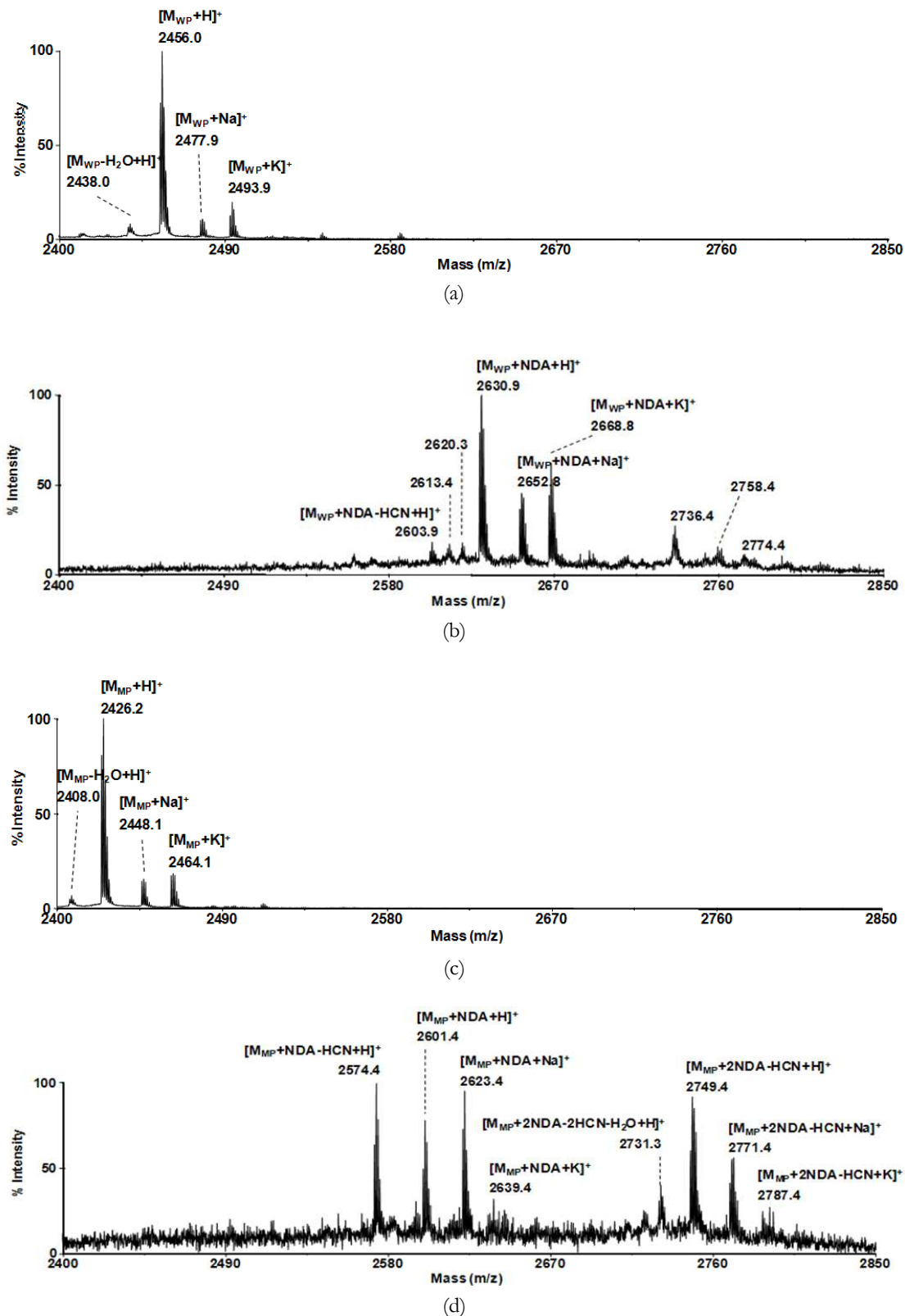


Figure 3.15 – Analyse en spectrométrie de masse MALDI-TOF de PN et PM avant (a, c) et après dérivatation par le NDA (b, d)

Conditions : matrice CHCA à 10mg/mL dans acétonitrile/eau 50/50 (v/v) 0,1% TFA. Echantillon : 1 μ L de solution dérivée de peptide à 200 mM + 1 μ L de matrice. Mode réflecteur. Délai d'extraction : 450 nsec

Nous observons aussi la présence de pics à 2652,8 et 2623,4 m/z correspondant aux adduits sodium des dérivés mono-marqué de PN et PM respectivement. Des adduits potassium des dérivés mono-marqués des 2 peptides sont également observés à 2668,8 et 2639,4 m/z respectivement. Nous remarquons aussi dans le cas de PM (spectre (d)) la présence d'un groupe de pics dont la masse pourraient correspondre au produit di-marqué. Bien qu'aucun pic dont la masse corresponde exactement au dérivé di-marqué (2776,4 m/z) n'ait été trouvé, des pics correspondant au dérivé di-marqué ayant perdu HCN, ainsi que les adduits sodium et potassium de ce dérivé ont pu être identifiés (2749,4 m/z, 2771,4 m/z et 2787,4 m/z). Ces résultats prouvent bien la formation d'un dérivé di-marqué pour le peptide mutant, correspondant au marquage double de l'amine de la chaîne latérale de la lysine et de l'extrémité N-terminale de l'alanine. Ils indiquent également que ce dérivé est instable et perd rapidement le substituant HCN pour donner un produit bien plus stable.

Le fait que le double marquage n'ait pu être mis en évidence pour la dérivation de PN, contrairement à PM, pourrait être lié à la nature de l'acide aminé en position N-terminale (thréonine pour PN et alanine pour PM) et de sa probable influence sur la réactivité de la fonction amine N-term et/ou la stabilité du dérivé fluorescent. On peut ainsi supposer que la conformation du peptide peut être modifiée par le remplacement d'un résidu apolaire (Ala pour PM) par un résidu polaire (Thr pour PN) ayant pour conséquence de diminuer l'accessibilité du groupement amine au marqueur fluorogène.

II Marquage des peptides par le FQ

La réaction de marquage d'une amine par le 3-(2-furoyl)quinoline-2-carboxaldéhyde (FQ) est présentée dans la figure 3.16. Ce marqueur fluorogène, acheté sous le nom commercial de ATTO-TAG FQ (Interchim, France) conduit à la formation, en présence d'un agent nucléophile (CN^-), de dérivés fluorescents possédant un maximum d'excitation à 480 nm et un maximum d'émission aux alentours de 590 nm (d'après les spécifications du fabricant). Le FQ est donc un bon candidat pour le marquage des peptides PN et PM, les dérivés étant susceptibles d'être analysés par EC-LIF au moyen d'une excitation par le laser Argon 488 nm (PA 800, Beckman Coulter, USA), déjà présent dans notre laboratoire.

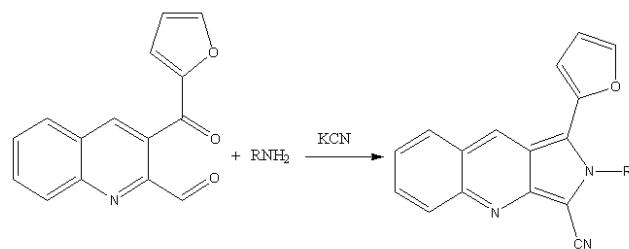


Figure 3.16 – Réaction de marquage d'une amine par le FQ

[103]

II.1 Développement de la réaction de marquage

Pour optimiser la réaction de marquage des peptides d'intérêt, nous nous sommes inspirés de travaux antérieurs portant sur la dérivation d'acides aminés et de protéines par le FQ [147, 103]. La dérivation pré-capillaire de PN a ainsi été réalisée, selon le protocole général décrit dans l'annexe B.III, en milieu hydro-organique (tampon borate pH 9 / méthanol 1/1 v/v). Cette valeur de pH a été décrite comme optimale pour atteindre le meilleur rendement de la réaction de marquage. En effet, il a été reporté que même si le pH du milieu de dérivation doit être suffisamment élevé pour que les groupements amines soient non ionisés, des réactions secondaires entre le FQ et le KCN peuvent se produire à des valeurs de pH supérieure à 9,3 ce qui entraîne la formation de produits secondaires qui compliquent le profil EC [148]. Nous avons étudié au cours de nos travaux l'influence de la température, du temps d'incubation et du rapport molaire marqueur / peptide sur l'efficacité du marquage.

II.1.1 Étude préliminaire

a) Par spectrofluorimétrie

Tout d'abord, le spectre d'émission de fluorescence du FQ, du peptide PN et d'une solution de PN incubée 15 min à 55°C par le FQ en tampon borate 40 mM pH 9 / méthanol 1/1 v/v avec un ratio marqueur /peptide égal à 100 a été enregistré (spectrofluorimètre Jasco FP 750) en excitant les échantillons à 488nm (cf. figure 3.17).

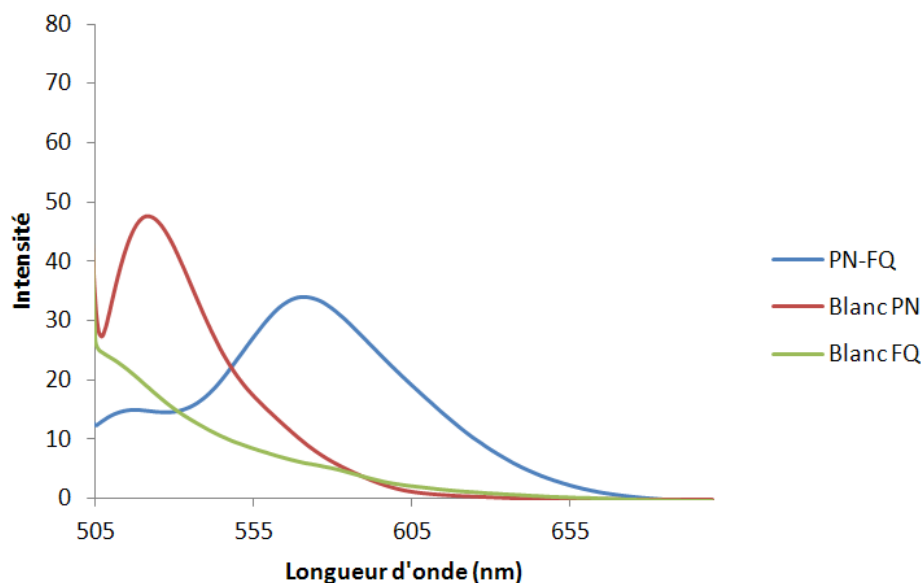


Figure 3.17 – Spectres d'émission de fluorescence après excitation 488 nm du PN marqué par FQ, blanc FQ (mélange de dérivation sans peptide) et blanc peptide (mélange de dérivation sans FQ).

Conditions de dérivation : milieu : tampon borate pH=9, 40mM/méthanol (1/1) rapport molaire FQ/peptide = 100, dérivation à 55°C pendant 15 min. Tous les échantillons ont été dilués au 1/6.

Comme le montre la figure 3.17, aucune bande n'est observée sur le spectre d'émission de fluorescence de la solution de FQ ce qui est conforme aux propriétés fluorogènes du réactif. Le spectre enregistré, dans les mêmes conditions, pour la solution de PN non dérivé présente, en revanche, une bande située vers 519 nm, résultant vraisemblablement d'impuretés de synthèse fluorescentes du peptide synthétique. Le spectre de la solution de PN incubée 15 min à 55°C avec le FQ avec du FQ présente quant à lui une bande à 590 nm, caractéristique du dérivé isoindole formé, confirmant l'efficacité de la réaction de dérivation.

b) Analyse par électrophorèse capillaire couplée à la détection par la fluorescence à 488 nm

L'analyse EC -LIF d'une solution de PN incubée 15 min à 55°C par le FQ dans un mélange tampon borate 40 mM pH 9/ méthanol 1/1 v/v a été réalisée sur un capillaire de silice fondue en sélectionnant comme électrolyte support un tampon borate 40 mM pH 9. Comme le montre l'électrophérogramme présenté sur la figure 3.18, un pic correspondant au peptide dérivé par le FQ (PN-FQ) est observé à 7,5 min. L'attribution de ce pic a été ef-

fectuée en procédant à l'analyse EC-LIF d'une solution de marqueur préparée dans le milieu d'incubation en l'absence de PN (blanc FQ). Etant donné le caractère fluorogène du FQ, l'électrophérogramme du blanc FQ ne montre que quelques petits pics, pouvant être assimilés à du bruit de fond, qui correspondent à la formation de produits d'hydrolyse et/ou à la présence d'impuretés du réactif. Le profil électrophorétique d'une solution de PN préparée dans le milieu d'incubation en l'absence de FQ (blanc PN) a également été enregistré dans les mêmes conditions d'analyse. Comme le montre la figure 3.18, quelques petits pics sont présents sur le profil du blanc PN indiquant la présence probable dans l'échantillon de PN d'impuretés fluorescentes à l'origine de la bande d'émission de fluorescence précédemment observée à 519 nm sur le spectre d'émission de fluorescence de la solution (figure 3.17).

Comme illustré sur la figure 3.19, le profil électrophorétique d'une solution de dérivation de PM par le FQ est similaire à celui d'une solution de PN : un pic correspondant au dérivé fluorescent PM-FQ est observé vers 7,5 minutes.

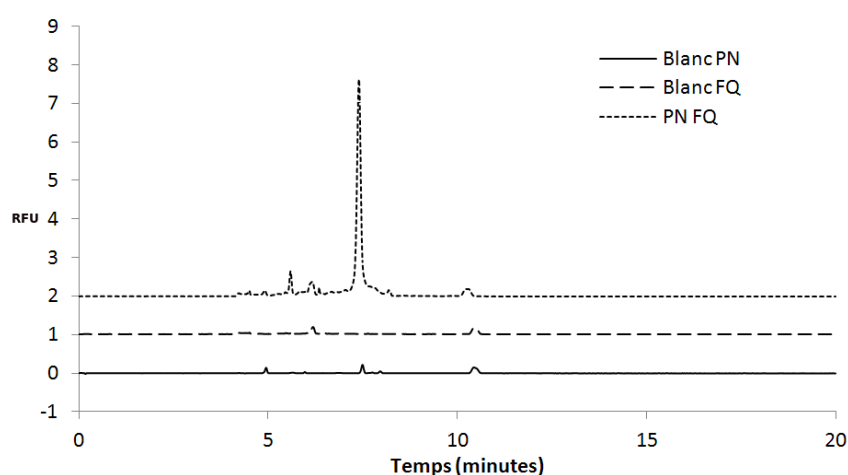


Figure 3.18 – Analyse EC-LIF de la dérivation par le FQ de PN
Conditions d'analyse : capillaire silice (60×50cm×75µm), voltage 20kV, température 25°C, tampon borate de sodium pH=9,0 40mM, échantillon : solution de peptide incubée pendant 15 min à 55°C selon le protocole décrit en annexe B.III.

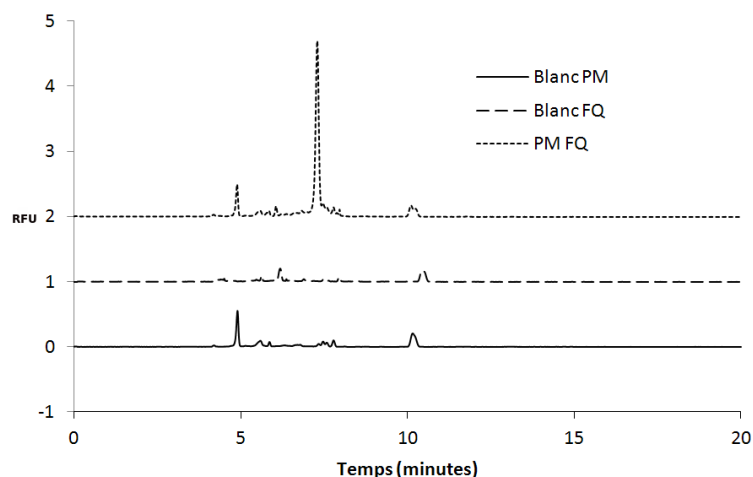


Figure 3.19 – Analyse EC-LIF de la dérivation par le FQ de PM
Conditions d'analyse : capillaire silice (60×50cm×75µm), voltage 20kV, température 25°C, tampon borate de sodium pH=9,0 40mM, échantillon : solution de peptide incubée pendant 15 min à 55°C selon le protocole décrit en annexe B.III.

II.1.2 Optimisation du rapport molaire marqueur fluorogène / peptide

L'influence du rapport molaire FQ/peptide sur le rendement de la réaction a été étudiée en procédant à l'analyse EC-LIF de solutions de PN incubées 15 min à 55°C dans un mélange méthanol/tampon borate 40 mM pH 9 1/1 v/v pour deux valeurs de rapport FQ/PN : 10 et 100. Comme indiqué dans la figure 3.20, aucune différence significative de l'aire du pic du dérivé PN- FQ obtenu à 7,5 min sur un capillaire de silice fondue en sélectionnant comme électrolyte support un tampon borate 40 mM pH 9 n'a été mise en évidence pour les ratios étudiés. Un excès de réactif de marquage étant une condition a priori favorable pour augmenter la cinétique de la réaction, le rapport molaire 100 a été choisi pour la suite des expériences.

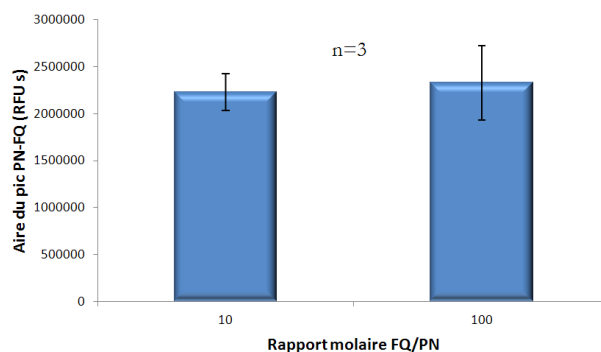


Figure 3.20 – Aires du pic du dérivé PN-FQ en fonction du rapport molaire FQ/PN

II.1.3 Optimisation de la température et du temps d'incubation

L'effet de la température et du temps d'incubation sur la réaction de dérivation a été étudié en procédant à l'analyse EC-LIF de solutions de PN incubées par le FQ dans un milieu méthanol/tampon borate 40 mM pH 9 pour un rapport molaire FQ/peptide égal à 100. L'étude a été menée en faisant varier la température de 45 à 65°C et le temps d'incubation de 5 à 30 min. Les solutions de dérivation ont été analysées sur un capillaire de silice fondue en sélectionnant comme électrolyte support un tampon HEPES 40 mM pH 8.

Nous avons aussi remarqué une dégradation à 65°C du dérivé fluorescent PN-FQ illustrée par l'apparition sur l'électrophérogramme de la solution de dérivation de nouveaux pics parallèlement à une diminution de 16% et 65% de l'aire et de la hauteur du pic correspondant au peptide marqué, respectivement (cf. figure 3.21). Dans les conditions opératoires définies (milieu hydro-méthanolique pH 9, rapport molaire marqueur/peptide de 100) et pour trouver un compromis entre gain de temps et dégradation des molécules, les conditions optimales d'incubation de PN par le FQ ont été fixées à 55°C pendant 15 min. A noter que l'utilisation de l'électrolyte HEPES pH 8 a mis en évidence, quelques soient les conditions d'incubation, la présence d'un épaulement sur le pic caractéristique du dérivé PN-FQ indiquant la formation probable au cours de la réaction de marquage de PN de plusieurs dérivés fluorescents.

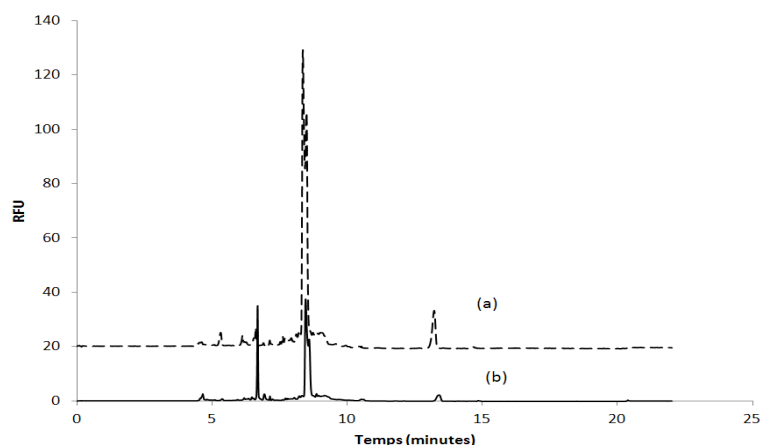


Figure 3.21 – Analyse EC-LIF de la dérivation par le FQ de PN 55°C 15 min (a) et 65°C 15 min (b)

Conditions d'analyse : électrolyte : tampon HEPES pH =8, 40 mM. Capillaire de silice vierge (60x50 cmx75 μ m), voltage 20 kV, température 25°C.

II.2 Contrôle de la réaction de marquage par analyse par spectrométrie de masse

Des investigations ont été menées par spectrométrie de masse MALDI-TOF (appareil Perseptive Biosystems Voyager-DE Pro STR) et ESI-Trappe ionique (appareil Esquire 3000+) pour confirmer l'efficacité de la méthode de marquage développée.

Au-delà de 2850 m/z aucun pic n'a été détecté (cf. figure en annexe B.IV).

Les spectres de masse MALDI-TOF des peptides PN et PM avant et après marquage par le FQ sont présentés sur la figure 3.22. Aucun pic correspondant aux peptides PN (2456,0 m/z) et PM (2426,2 m/z) non marqués n'est détecté après dérivation par le FQ (spectre b et d). Ces résultats montrent que la réaction de marquage est achevée dans les conditions opératoires définies. Par ailleurs, nous observons aussi la présence d'un pic situé à un rapport m/z égal à 2698,3, pour PN et à 2668,5 pour PM correspondant au rapport théorique caractéristique d'un dérivé monomarqué pour chacun des deux peptides. D'autres pics correspondant aux différents adduits sodium et potassium sont aussi présents. Aucun pic susceptible de correspondre à un dérivé di-marqué n'a pu être observé dans les conditions d'analyse. Ces résultats indiquent que le marquage s'effectue principalement sur un seul groupement amine et non pas sur les deux sites potentiellement dérivables des peptides (groupements amine de l'extrémité N-term et de la chaîne latérale de la lysine), comme c'est le cas pour le marquage par le NDA. Compte tenu de la structure des deux marqueurs, la différence de réactivité pourrait être liée à la taille de la molécule de FQ, plus grande que celle du NDA, ce qui limiterait son accès aux sites de marquage N-term.

Par ailleurs, sur ce spectre MALDI-TOF, on remarque la présence d'un pic à 2689,4 m/z présentant une différence de masse de 9 m/z avec le pic principal situé à 2698,3m/z. Ce pic ne pouvant pas correspondre à des adduits, confirme nos doutes concernant une formation de dérivés du FQ pouvant réagir avec les peptides et donnant ces pics. La présence de ces sous-produits pouvant être à l'origine de l'épaulement que nous constatons lors des analyses en EC- LIF et des peptides marqués par le FQ (cf. figures 3.21).

Des analyses par spectrométrie de masse ESI-trappe ionique en infusion directe en électrospray de solution de peptides PN et PM avant et après marquage par le FQ ont été réalisées

en vue de confirmer ces résultats (Trappe 3D Bruker Esquire 3000+).

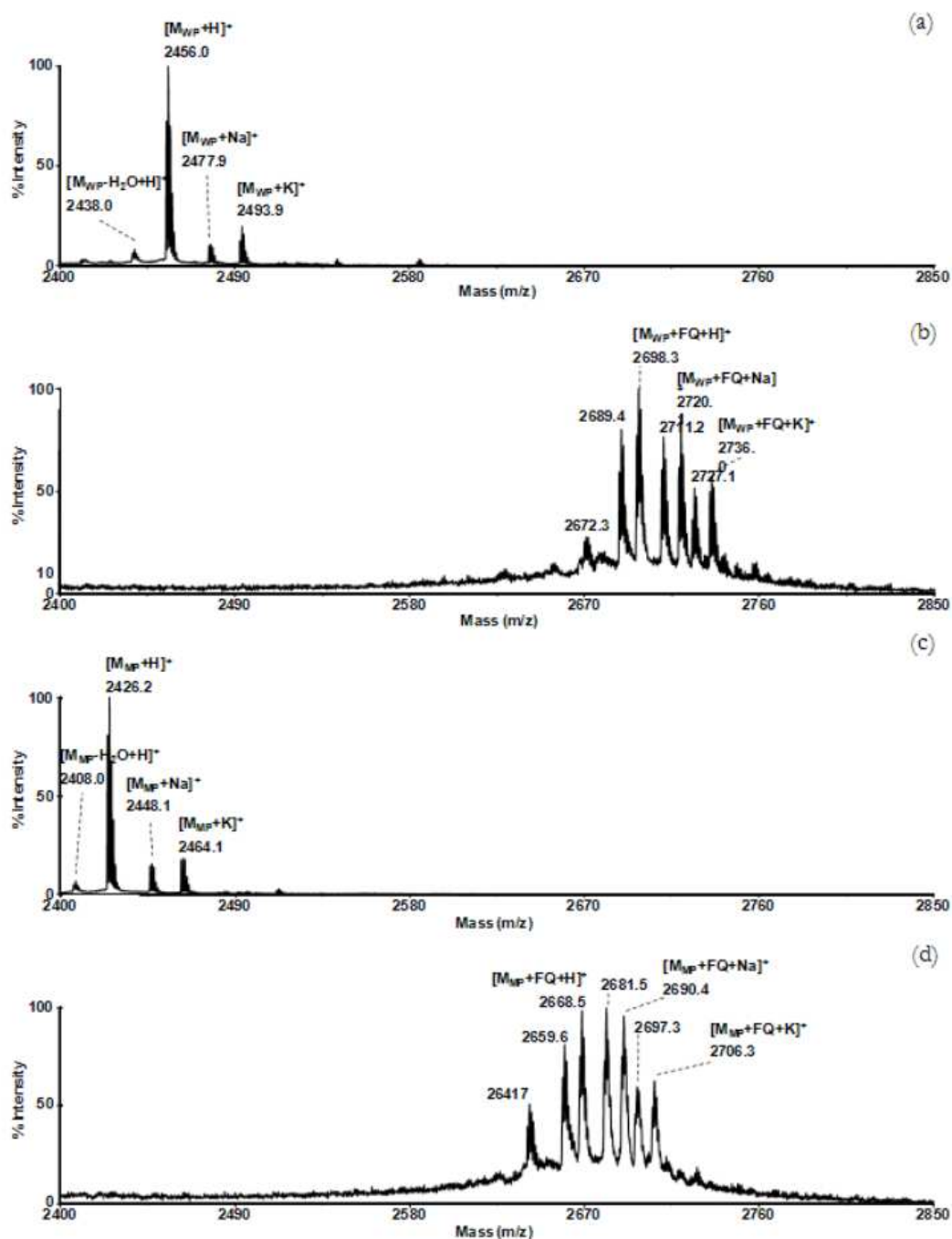


Figure 3.22 – Analyse en spectrométrie de masse MALDI-TOF de PN (a) PN dérivé par le FQ (b) PM (c) PM dérivé par le FQ (d)

Conditions : matrice CHCA à 10mg/mL dans acétonitrile/eau 50/50 (v/v) 0,1% TEA. Échantillon : 1 μ L de solution dérivée de peptide à 200 mM + 1 μ L de matrice. Mode réflecteur. Délai d'extraction : 450 nsec

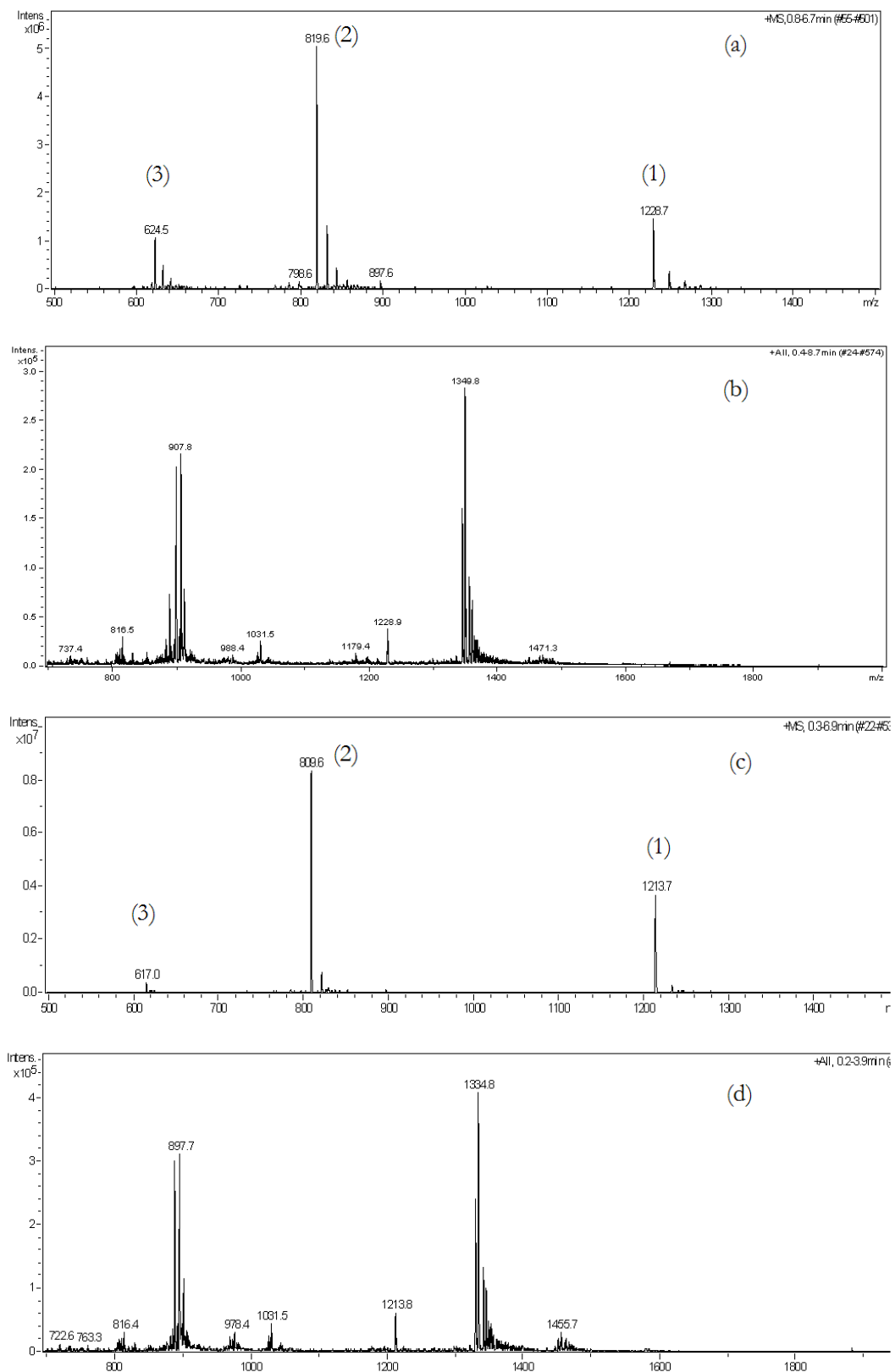


Figure 3.23 – Spectres de masse ESI-Trappe ionique en infusion directe en électrospray de solutions de peptide PN (a) PN marqué par le FQ (b) peptide PM (c) PM marqué par le FQ

Les spectres de masse ESI-Trappe ionique de PN et PM obtenus avant et après incubation par le FQ sont présentés sur la figure 3.23. Les spectres des peptides natif et mutant (a et c) présentent chacun trois pics principaux (notés 1, 2 et 3) correspondant aux ions susceptibles d'être formés compte tenu des différents degrés d'ionisation des peptides : $(M+2H)/2$ pour le pic (1), $(M+3H)/3$ pour le pic (2) et $(M+Na+3H)/4$ pour le pic (3).

Pour le spectre de la solution de PN incubée par le FQ (b), les deux principaux pics observés correspondent au dérivé mono- marqué (rapport m/z égal à 1349,8 pour l'ion di-chargé et 907,8 pour l'ion tri-chargé). Des pics bien moins intenses situés à un rapport m/z de 1228,9 et 1471,3 sont également détectés signalant la présence à l'état de traces dans la solution de PN n'ayant pas réagi (1228, 9 m/z) et celle d'un dérivé di-marqué (1471, 3 m/z). Ces deux composés n'ont pas été détectés en MALDI- TOF. Ceci indique que les peptides d'intérêt s'ioniseraient mal en MALDI, ce qui rendrait leur détection en TOF plus difficile.

En revanche, en ESI, nous pensons que le fait que les peptides soient en solution faciliterait leur ionisation et donc leur détection par la trappe ionique. Le spectre de la solution de PM incubée par le FQ (d) met en évidence de la même façon la formation du dérivé mono-marqué (1334,8 m/z) et celle de traces de dérivé di-marqué (1455,7 m/z) et de PM n'ayant pas réagi avec le fluorophore (1213,8 m/z). Ces deux ions minoritaires n'ont pas été mis en évidence précédemment lors des analyses en mode MALDI-TOF, ce mode d'ionisation étant vraisemblablement moins favorable pour l'ionisation des molécules étudiées que le mode d'ionisation par électrospray qui repose sur l'ionisation d'échantillons en solution.

Afin d'identifier le site de marquage préférentiel des peptides conduisant à l'obtention d'un dérivé mono-marqué, nous avons réalisé des analyses en ESI-MS/MS en effectuant des fragmentations du pic correspondant au dérivé mono-marqué (rapport m/z de $1348,8 \pm 2$ pour l'ion di-chargé caractéristique de PN-FQ). Les résultats sont présentés sur la figure 3.24.

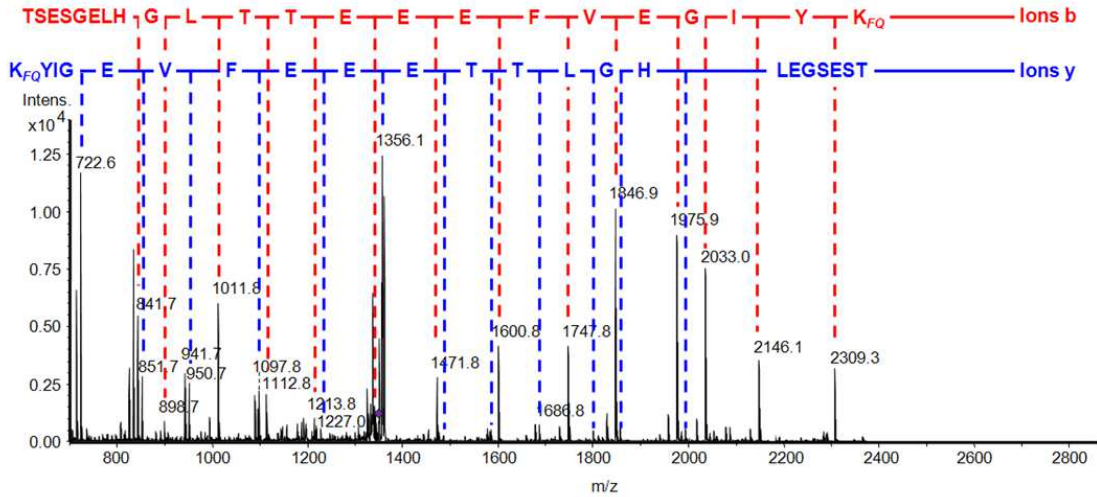


Figure 3.24 – Analyse du spectre de masse MS/MS de PN monomarcqué, ion précurseur : 1348,8 m/z

L'analyse de ce spectre MS/MS a été faite en y et en b. Les ions y, dénommés fragments C-terminaux, correspondent aux fragments obtenus en rompant une liaison peptidique et en conservant la charge de l'ion sur la partie C-terminale du peptide. Les ions b, dénommés fragments N-terminaux, correspondent quant-à eux aux fragments obtenus en rompant une liaison peptidique et en conservant la charge de l'ion sur la partie N-terminale du peptide (cf. figure 3.25).

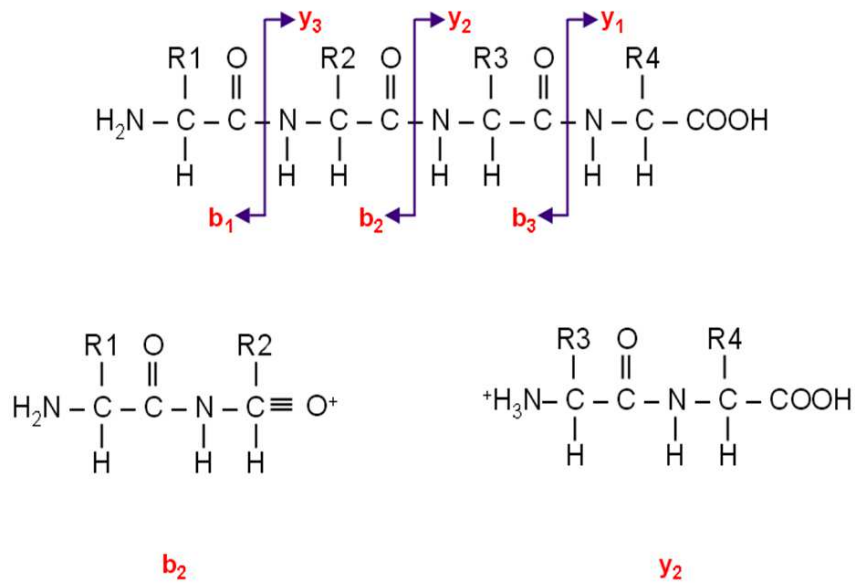


Figure 3.25 – Exemple de fragmentation d'un peptide en ions b et y

Le rapport m/z de l'ion précurseur di-chargé étant de 1348,8, la masse caractéristique de l'ion mono-chargé est égale à 2696,6 ($2 \times 1348,8 - 1$). La différence de rapport m/z entre cet ion et le premier ion b observé sur le spectre à un rapport m/z de 2309,3 est donc de 387,3. Cette valeur étant égale à la somme des masses du FQ (258,25) et du résidu lysine (128,17 cf. tableau en annexe B.V), nous pouvons déduire que l'amine primaire du résidu lysine situé à l'extrémité N-term de PN a réagi avec le FQ.

Par la suite, l'exploitation des pics observés sur le spectre MS-MS de PN a permis de retrouver les rapports m/z caractéristiques de la série d'ions b et d'ions y et de remonter à la séquence du peptide étudié. En conclusion, cette étude a permis de prouver que le produit majoritairement formé au cours du marquage pré-capillaire des peptides PN et PM est un dérivé mono-marqué sur l'amine primaire de la chaîne latérale du résidu lysine situé à l'extrémité C-term des peptides étudiés.

B Optimisation du marquage des peptides par des réactifs fluorescents

I Marquage des peptides par les dérivés de la fluorescéine

Nous avons, pour commencer, choisi d'étudier le marquage fluorescent des peptides d'intérêt avec deux réactifs dérivés de la fluorescéine : la fluorescéine 5(6)-isothiocyanate (FITC) et la 5- carboxy-fluorescéine-N- succinimidyl ester (NHS-fluorescéine). Ces réactifs réagissent, comme indiqué sur la figure 3.26, en milieu alcalin avec les amines primaires et sont couramment utilisés pour le marquage de peptides et de protéines [149]. Ces marqueurs fluorescents ont été sélectionnés en raison de leur faible coût et de leur compatibilité avec la source laser 488 disponible au laboratoire (Beckman Coulter) puisqu'ils présentent respectivement une longueur d'onde d'excitation de 492 nm (FITC) et 494 nm (NHS-Fluorescéine) et une longueur d'onde d'émission de 518 nm (FITC) et 519 nm (NHS- fluorescéine), d'après les spécifications du fabricant. La réactivité du NHS-fluorescéine est supérieure à celle du FITC en raison de la présence du groupement succinimidyl ester qui réagit efficacement avec les

amines dans des tampons de pH allant de 7 à 9 pour former des liaisons amide stables.

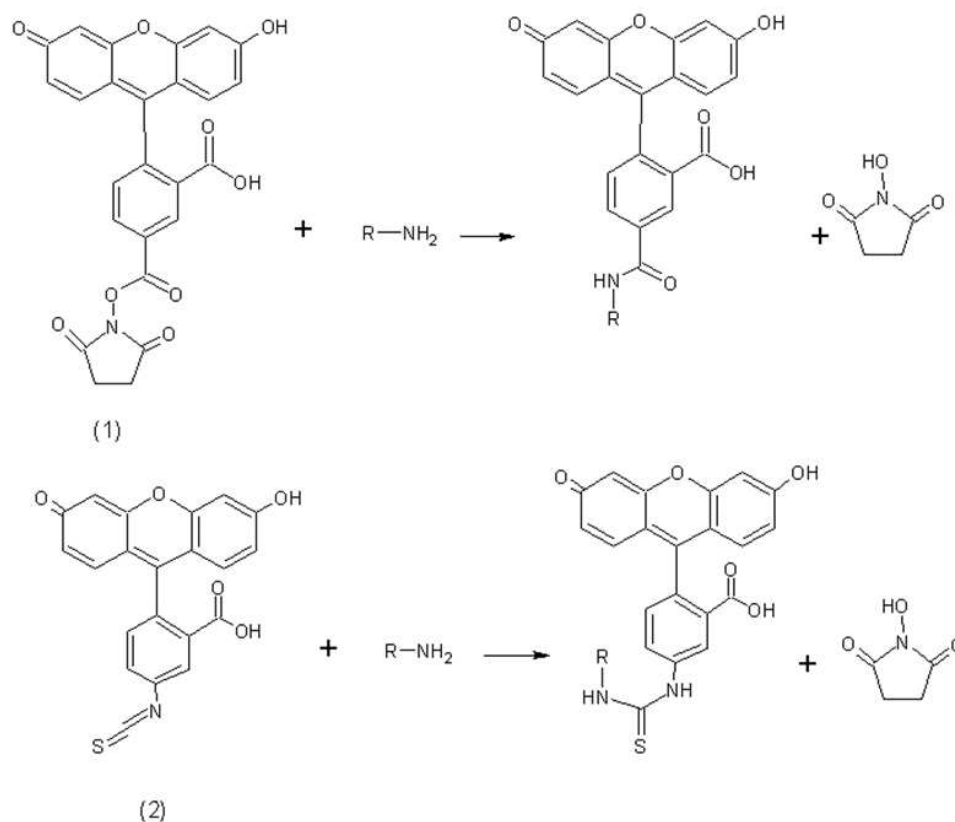


Figure 3.26 – Réaction (1) du NHS fluorescéine et (2) du 5-FITC avec une amine primaire

En s'inspirant de travaux précédemment publiés [150], la dérivation pré-capillaire de PN et de PM par le FITC a été réalisée en tampon borate pH 9 40 mM en laissant la solution incuber une nuit à température ambiante (cf. protocole détaillé en annexe B.VI). L'analyse EC-LIF des solutions de dérivation de chacun des peptides et d'un blanc de dérivation, dans lequel la fraction de l'échantillon protéique est remplacée par une fraction identique de tampon, a été réalisée sur capillaire de silice vierge avec un tampon borate 40 mM pH 9 (cf. figure 3.27).

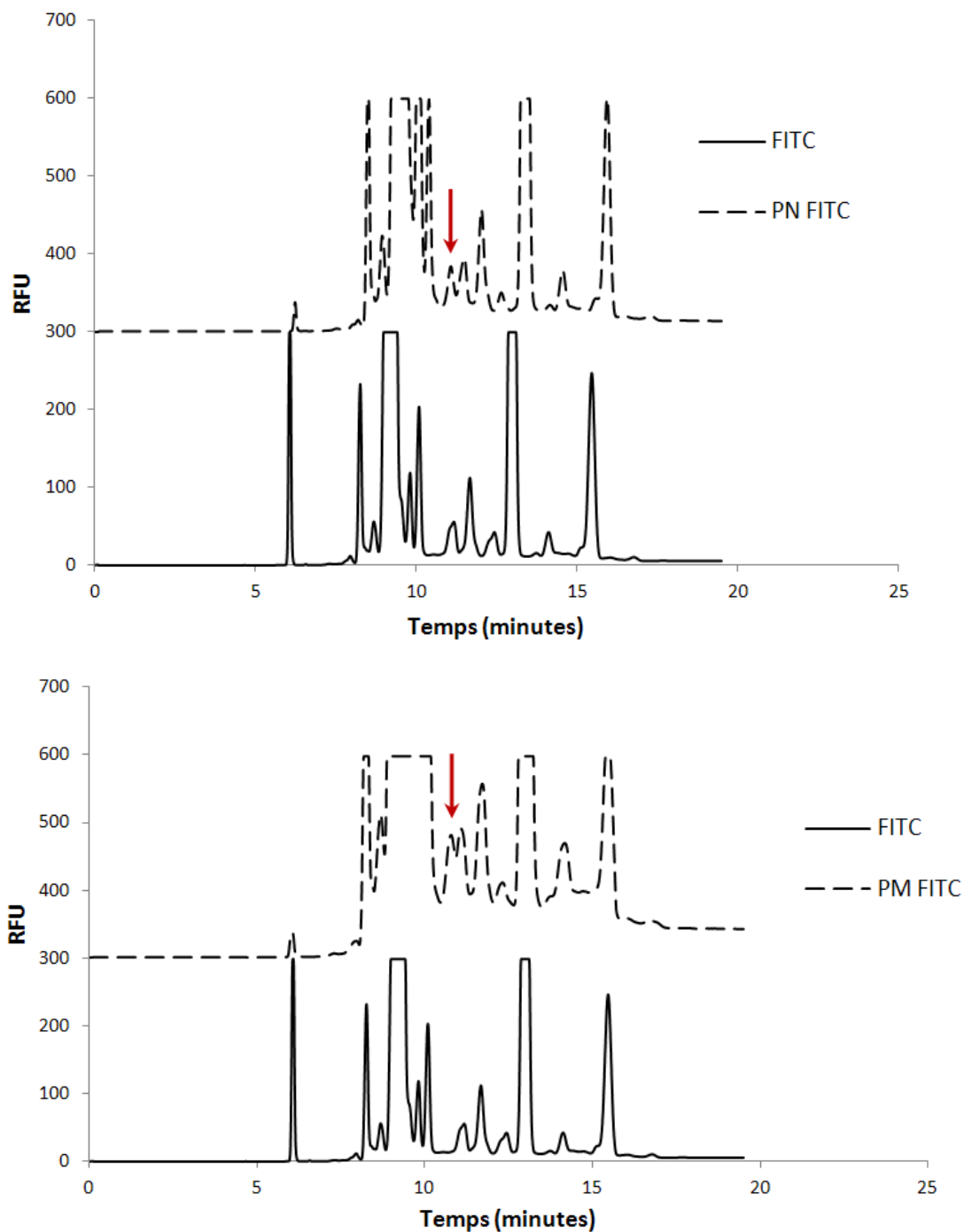


Figure 3.27 – Analyses EC-LIF de la dérivation par le FITC de PN et d'un blanc FITC
Conditions EC : capillaire silice ($60 \times 50 \text{ cm} \times 75 \mu\text{m}$), voltage 20 kV , température 25°C , tampon borate de sodium $\text{pH}=9,0$ 40 mM , échantillon : dilution $1/1000$ de la solution de dérivation. Conditions de dérivation (cf. annexe B.VI). Les flèches rouges indiquent le dérivé marqué.

Comme le montre la figure 3.27, le blanc FITC donne une multitude de pics, dont plusieurs sont très intenses, rendant l'observation du pic du peptide marqué particulièrement difficile. La fenêtre permettant d'observer le pic du dérivé fluorescent est très étroite, lais-

sant présager des difficultés en terme de résolution lors de l'analyse simultanée des peptides marqués PN et PM. Les variations de pH et de force ionique de l'électrolyte support (pH 8 à 10, force ionique de 40 à 80 mM) n'ont pas permis d'améliorer la séparation entre les dérivés marqués et les pics interférents liés à la fluorescence du FITC en excès et de ses produits d'hydrolyse.

Dans un second temps, le marquage de PN a été réalisé par le NHS-fluorescéine, selon les conditions décrites dans l'annexe VII, en tampon borate 50 mM pH 8,5 avec un rapport molaire réactif fluorescent/peptide égal à 15 (cf. annexe B.VII). Après une incubation d'une heure à température ambiante, l'analyse EC-LIF de la solution et d'un blanc NHS-fluorescéine a été effectuée sur capillaire de silice vierge avec un tampon borate 40 mM pH 9. Compte tenu des très nombreux pics présents sur l'électrophérogamme du blanc réactif (cf. figure 32) et de la répétabilité extrêmement médiocre des analyses se traduisant par de grandes variations des temps de migration et des hauteurs des pics, il n'a pas été possible de mettre en évidence un pic susceptible d'être attribué à un dérivé fluorescent de PN.

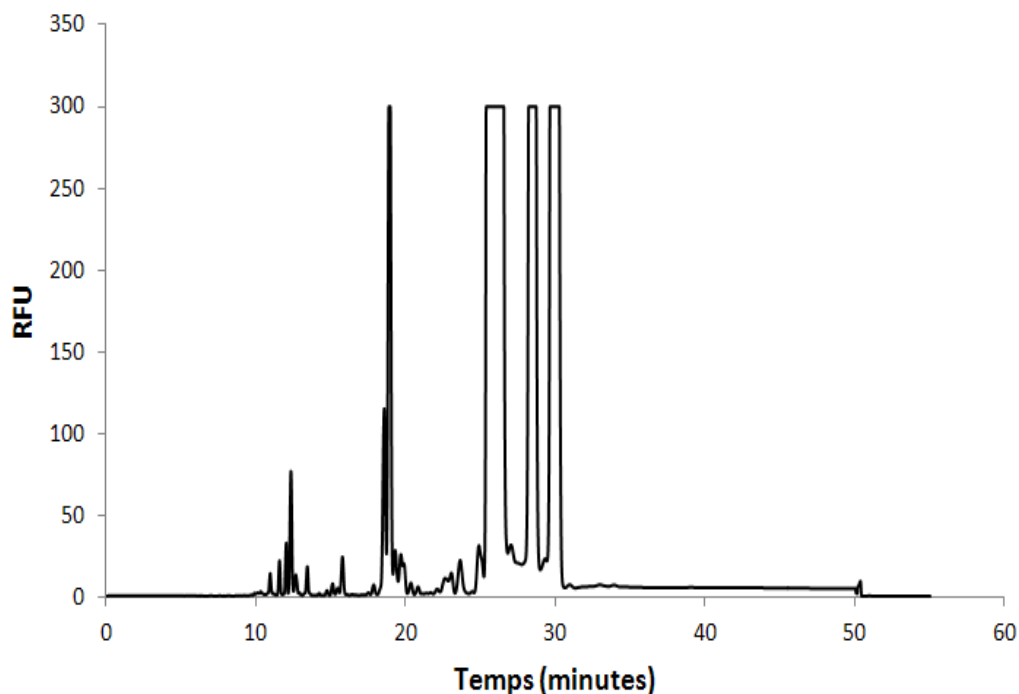


Figure 3.28 – Analyse EC-LIF du NHS-fluoresceine
Conditions EC : capillaire silice ($60 \times 50 \text{ cm} \times 75 \mu\text{m}$), voltage 20 kV , température 25°C , tampon borate de sodium pH=9,0 40mM, échantillon : dilution 1/20 de la solution de dérivation dans l'eau.

De façon à limiter l'adsorption probable du fluorophore sur les parois du capillaire à l'origine des problèmes de répétabilité observés, une méthode de rinçage du capillaire effectuée entre chaque analyse incluant notamment une étape de rinçage par le DMSO, solvant dans lequel le NHS- fluorescéine est très soluble, a été testée (cf. annexe B.VIII).

Un test de recouvrement a été effectué en procédant à l'injection tantôt du côté court du capillaire (10 cm de longueur effective) tantôt du côté long (50 cm de longueur effective) d'une solution de dérivation.

Le calcul du recouvrement a été réalisé en utilisant l'équation suivante [151] :

$$R = \left(\frac{A_l}{A_s} \right)^{\frac{l}{l-s}}$$

Avec l , la longueur effective du capillaire lors de l'injection du côté long, s la longueur effective du capillaire lors de l'injection du côté court, A_l et A_s , les aires de pics mesurées lors de l'injection de l'échantillon du côté long et court respectivement. Le pic sélectionné pour cette étude est observé à 19 min lors de l'injection du grand côté (cf. figure 3.28), 3 analyses ont été réalisées pour chaque conditions.

La valeur du recouvrement ainsi calculée est égale à 0,65. Cette valeur est faible ce qui signifie que la procédure de rinçage développée ne permet pas de juguler le problème d'adsorption du fluorophore sur le capillaire de séparation.

II Marquage des peptides par le TAMRA-SE

Le 5-carboxy-tetramethyl-rhodamine-N-succinimidyl ester (TAMRA-SE) est un dérivé de la rhodamine. Son maximum d'absorption se situe à 546 nm et son maximum d'émission se situe à 575 nm. Ce réactif fluorescent réagit sur les amines primaires pour donner un dérivé fluorescent présentant un quantum de fluorescence élevé (cf. figure 3.29) [152].

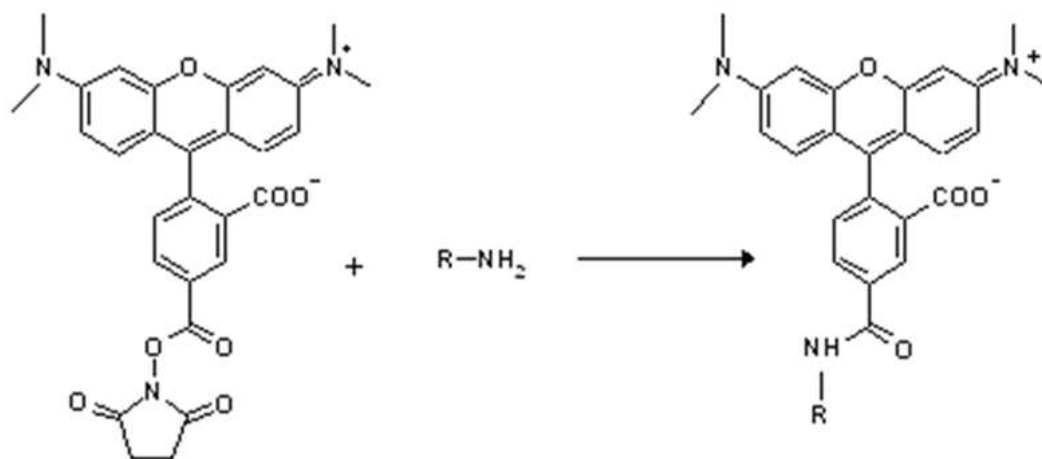


Figure 3.29 – Réaction de marquage d'une amine primaire par le TAMRA-SE

Dans le but d'analyser en EC-LIF les dérivés de la rhodamine, nous avons fait l'acquisition d'une source laser à diodes 532 nm (BFI Optilas, France) que nous avons couplée à l'un des appareils d'électrophorèse capillaire du laboratoire (PA800 Beckman commercialisé avec un détecteur LIF 488). Ce couplage a nécessité la mise en place au sein du détecteur d'un filtre coupe bande 532 nm et d'un filtre passe bande 570 nm. En s'inspirant de travaux précédemment publiés [153] la dérivation pré-capillaire de PN a été réalisée en présence d'un excès de réactif (rapport molaire TAMRA-SE/PN = 40) en milieu alcalin (tampon borate 40 mM). L'influence du pH et du temps d'incubation sur les produits de la réaction a été évaluée au cours de nos travaux.

Dans un premier temps, la réaction a été effectuée à $\text{pH} = 10$ en fixant le temps d'incubation à une heure. Les spectres d'émission de fluorescence de la solution de dérivation de PN et de la solution de dérivation exempte de peptide (blanc TAMRA-SE), toutes deux excitées à 532 nm, sont présentés sur la figure 3.30. Contrairement aux réactifs fluorogènes FQ et NDA, le spectre d'émission de fluorescence du blanc réactif présente une bande intense située à 570 nm. Cette bande est retrouvée sur le spectre de la solution de dérivation de PN avec une intensité d'émission de fluorescence comparable.

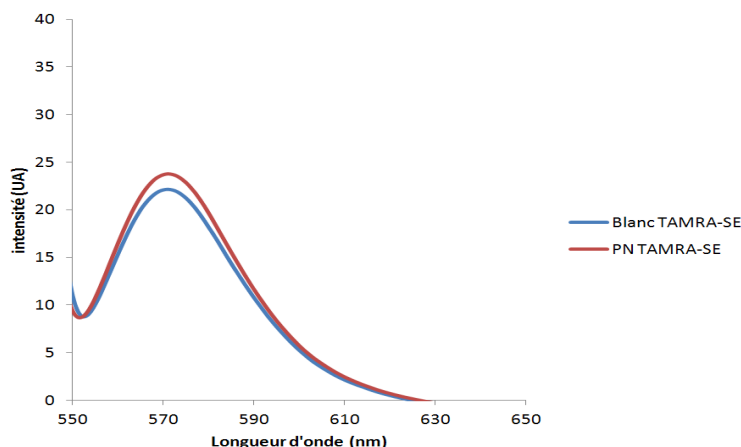


Figure 3.30 – Spectres d'émission de fluorescence après excitation à 532 nm du blanc TAMRA-SE et de PN marqué par le TAMRA-SE (Conditions de dérivation : cf. annexe B.IX). Dilution 1/1000

L'analyse EC-LIF des deux solutions a été réalisée sur un capillaire de silice fondue en utilisant un tampon phosphate 50 mM pH 7 (figure 3.31). Par comparaison des profils obtenus pour la solution de blanc réactif et pour la solution de dérivation de PN, une série de pics, dont un majeur situé à 6,2 min, susceptible d'être attribuée aux produits de la réaction de marquage de PN a été mise en évidence. Afin de préciser la structure des dérivés fluorescents obtenus dans ces conditions expérimentales, nous avons effectué des analyses par spectrométrie de masse MALDI- TOF. Les spectres de masse des solutions de PN et PM avant et après incubation par le TAMRA-SE sont présentés sur la figure 3.32.

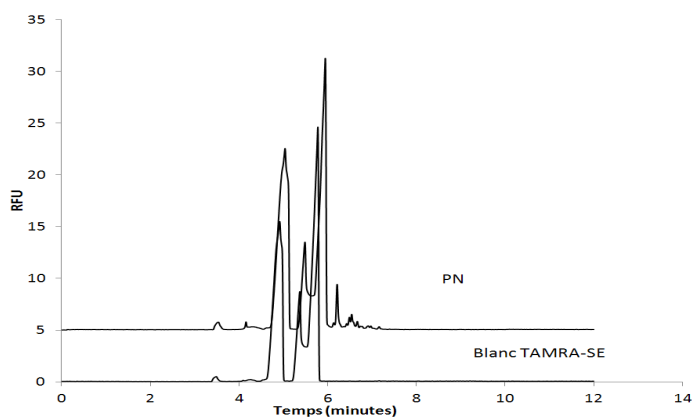


Figure 3.31 – Analyses EC-LIF de la dérivation par le TAMRA-SE de PN et d'un blanc TAMRA-SE

Conditions EC : capillaire silice ($57 \times 50 \text{ cm} \times 75 \mu\text{m}$), voltage 20 kV, température 25°C. Analyse tampon phosphate pH=7, 50mM. Dilution des échantillons 1/4 avec HEPES pH 8, 40mM.

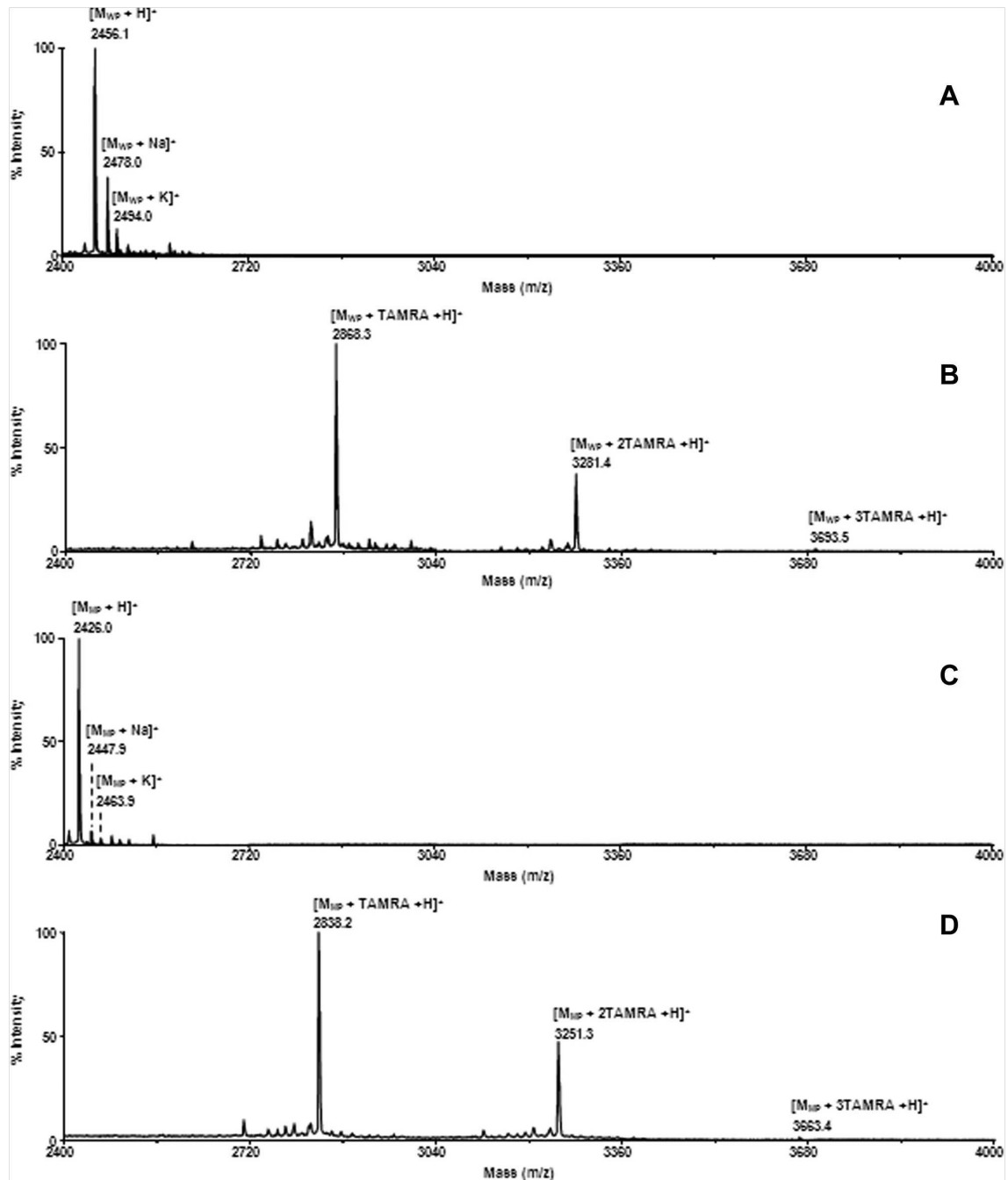


Figure 3.32 – Analyse en spectrométrie de masse de PN (a) PN dérivé par le TAMRA-SE (b) de PM (c) PM dérivé par le TAMRA-SE (d)

Conditions : matrice CHCA à 10mg/mL dans acétonitrile/eau 50/50 (v/v) 0,1% TFA. Échantillon : 1 μ L de solution dérivée de peptide à 200 mM + 1 μ L de matrice. Mode réflecteur. Délai d'extraction : 450 nsec

Nous remarquons sur les spectres de masse des solutions de dérivation des deux peptides (spectres (b) et (d)) l'absence de pics correspondant aux peptides non marqués, indiquant que la réaction de marquage est quasi-totale dans les conditions expérimentales retenues.

Sur le spectre (b), correspondant à l'analyse du peptide natif après marquage, nous obser-

vons la présence de deux pics majeurs : le premier à un rapport m/z de 2868,3 correspond au peptide natif mono-marqué par le TAMRA-SE (rapport m/z théorique = 2868), le second, obtenu à un rapport m/z de 3281,4 correspond quant-à lui au peptide doublement marqué par le TAMRA-SE (rapport m/z théorique = 3281). Nous observons aussi la présence d'un petit pic de rapport m/z égal à 3693,5 qui pourrait correspondre au peptide triplement marqué par le TAMRA-SE (rapport m/z théorique = 3694). Dans la mesure où il n'existe que deux amines primaires sur PN (extrémité N-term et chaîne latérale du résidu Lysine), nous avons émis l'hypothèse que l'amine secondaire du résidu Histidine est également susceptible de réagir avec le TAMRA-SE dans nos conditions expérimentales.

A notre connaissance, cette réaction n'a pas été précédemment décrite dans la littérature. En revanche, des études publiées montrent que l'amine secondaire du résidu Histidine peut réagir avec des marqueurs possédant une fonction epoxy [154], cette fonction, tout comme la fonction succinimidyl ester, étant un bon groupement partant. Le spectre de masse de la solution de dérivation du peptide mutant (spectre d) présente également deux pics principaux correspondant aux dérivés mono- et di- marqués (situés respectivement à un rapport m/z de 2838,2 et 3251,3), ainsi qu'un petit pic à un rapport m/z de 3663,4 correspondant au peptide triplement marqué par le TAMRA-SE.

Une étude de la cinétique de la réaction de marquage a été réalisée en enregistrant le spectre de masse MALDI-TOF d'une solution de PN incubée par le TAMRA-SE à pH 10 (rapport molaire réactif/peptide = 40). La proportion de peptide natif et des dérivés mono-, di- et tri- marqués a été estimée sur une gamme de temps allant jusqu'à 4h15 en partant de l'hypothèse que l'efficacité d'ionisation de toutes ces espèces est identique [155].

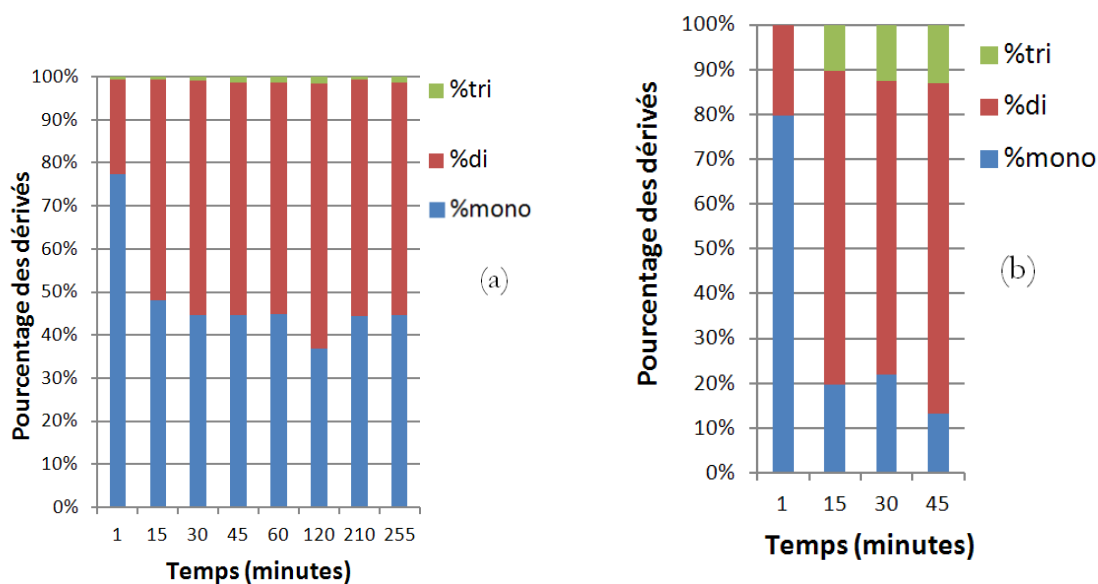


Figure 3.33 – Pourcentage du peptide natif et des dérivés mono-, di- et tri-marqués en fonction du temps pour un marquage effectué en tampon borate 40 mM pH=10 (a) pH=7,9 (b)

Comme le montre la figure 3.33 (a), aucune trace de peptide natif n'a pu être décelée dès 1 minute d'incubation indiquant que la réaction entre le TAMRA-SE et PN est rapide. A ce stade, la solution est composée principalement de dérivé mono-marqué (77%), les dérivés di- et tri- marqués étant formés à hauteur d'environ 22% et 1%, respectivement. La proportion du dérivé di-marqué augmente ensuite pour atteindre dès 30 minutes une valeur de 45% restant stable par la suite tandis que le pourcentage de dérivé triplement marqué ne dépasse pas 2% dans ces conditions. La cinétique de la réaction de marquage de PN par le TAMRA-SE a également été étudiée par spectrométrie de masse MALDI-TOF à une valeur de pH égale à 7,9, conditions moins alcalines susceptibles de limiter l'hydrolyse du réactif (figure 3.33 (b)). Si à 1 min, la composition de la solution de dérivation est semblable à celle obtenue à pH 10, la proportion du dérivé mono-marqué diminue davantage jusqu'à atteindre dès 15 minutes une valeur d'environ 20% tandis que celle des dérivés di-marqués et tri-marqués augmente parallèlement, ces derniers étant formés à hauteur d'environ 68% et 12% respectivement dans ces conditions de pH. Un changement de conformation de PN entre les 2 valeurs de pH étudiées, facilitant l'accessibilité de l'amine secondaire du résidu His à pH 7,9 pourrait être à l'origine du pourcentage plus élevé de dérivé tri-marqué dans ces conditions faiblement alcalines. Au vu de ces résultats, il nous a semblé souhaitable de sélectionner le tampon de pH

10 comme milieu d'incubation de façon à limiter au maximum le nombre de dérivés formés au cours de la réaction.

C Conclusions

Nous avons étudié dans ce chapitre, la réaction de marquage fluorescent des peptides d'intérêt PN et PM en vue de réaliser leur détection par EC-LIF. Cinq marqueurs de fluorescence, présentant des propriétés spectrales variées (cf. tableau 3.1) et susceptibles de réagir avec des groupements amine ont été sélectionnés pour cette étude. Deux d'entre eux présentent des propriétés fluorogènes (FQ et NDA), les trois autres (FITC, NHS-fluorescéine et TAMRA-SE) sont des réactifs fluorescents. Les dérivés fluorescents obtenus par marquage avec le FQ, le FITC et le NHS-fluorescéine sont excitables par une source laser 488 nm (source commercialisée avec l'appareil EC-LIF du laboratoire). L'analyse EC-LIF des dérivés marqués par le NDA et le TAMRA-SE a nécessité de coupler l'un des appareils d'EC de notre laboratoire à deux nouvelles sources laser à diodes à 442 et 532 nm, respectivement, et de modifier en conséquence les caractéristiques des filtres coupe bande / passe haut (442/475 et 532/570 nm, respectivement) introduits dans le détecteur. Dans le but d'obtenir le meilleur rendement pour la réaction de dérivation pré-capillaire des peptides avec les différents marqueurs, nous avons optimisé différents paramètres tels que le rapport molaire réactif/peptide, le pH et la force ionique du milieu d'incubation ainsi que le temps de réaction. Les résultats obtenus avec les dérivés de la fluorescéine (FITC et NHS-fluorescéine) se sont révélés décevants dans la mesure où la présence sur l'électrophérogramme de la solution de dérivation de nombreux pics correspondants au réactif de dérivation, à ses produits d'hydrolyse et/ou impuretés fluorescentes n'a pas permis de détecter facilement le(s) pic(s) attribuable(s) aux peptides marqués.

En revanche, les résultats ont montré que les peptides étudiés peuvent être marqués et analysés en EC-LIF avec succès par le FQ, le NDA et le TAMRA-SE. Comme indiqué dans le tableau 3.2 qui regroupe les principales caractéristiques des réactions optimisées avec ces trois réactifs, les meilleures conditions de dérivation ont été obtenues en incubant les peptides dans

un mélange solvant organique / tampon borate de pH 9-10 en présence d'un large excès de réactif fluorescent (rapport molaire marqueur/peptide supérieur ou égal à 40). Dans les trois cas, aucun pic correspondant au peptide non dérivé n'a pu être mis en évidence par analyse en MS MALDI-TOF de la solution de dérivation ce qui semble indiquer que la réaction est achevée dans les conditions optimisées. Une trace a été visualisée en MS ESI-Trappe ionique pour la réaction de marquage avec le FQ. La réaction peut être achevée en 15 min avec le FQ et le NDA, le temps de réaction étant le double avec le TAMRA-SE. Par ailleurs, les analyses par MS ont montré que le degré de substitution des peptides d'intérêt dépend de la réactivité et de l'encombrement stérique des marqueurs fluorophores mais également de la conformation des peptides. Le groupement amine primaire de la chaîne latérale du résidu Lysine à l'extrémité C-term des peptides est une bonne cible pour les trois réactifs tandis que le marquage de la fonction amine primaire de l'extrémité N-term et de l'amine secondaire du résidu Histidine est moins facile et dépend étroitement du milieu réactionnel et notamment de son pH et de la nature chimique du marqueur. Ainsi, les résultats d'analyse par MS MALDI-TOF des solutions de dérivation des peptides par le FQ ont montré que seul le dérivé mono-marqué sur l'amine de la Lysine était mis en évidence. A noter cependant qu'une trace de dérivé di-marqué non détectée en MS MALDI-TOF, a été détectée en MS ESI-trappe ionique.

En ce qui concerne le marquage de PN par le NDA, et comme observé précédemment avec le FQ, seul le dérivé mono-marqué est mis en évidence par MS MALDI-TOF. Pour PM, en plus du dérivé mono-marqué, la réaction semble conduire à la formation d'un dérivé di-marqué, peu stable cependant, puisque seul un fragment de la molécule est identifié par MS. Cette différence de réactivité de PM et PN vis-à-vis du NDA, concernant le groupement amine de l'extrémité N-term, pourrait être due à une conformation différente des 2 peptides liée à la nature du résidu présent à cette extrémité (Thréonine vs. Alanine). L'amine primaire N-term de PM serait ainsi plus accessible que celle de PN au NDA. En revanche, le FQ étant plus encombré que le NDA, l'accessibilité de la fonction amine N-Term des deux peptides n'est probablement pas suffisante pour faciliter la réaction avec le fluorophore. Les résultats obtenus avec le TAMRA-SE ont montré que ce dérivé de la rhodamine, activé par le groupement succinidimyl ester, est très réactif vis-à-vis des deux groupements amine primaire de PN

et PM mais également vis-à-vis de l'amine secondaire du résidu Histidine. Ainsi, la réaction de marquage des peptides PN et PM ne conduit pas majoritairement au dérivé fluorescent mono-marqué comme c'est le cas pour les deux fluorogènes. De multiples dérivés di- et tri-marqués sont ainsi détectés conduisant à l'obtention de plusieurs pics caractéristiques de ces molécules fluorescentes sur le profil électrophorétique de la solution de dérivation.

Réactif	Caractéristiques			Conditions de dérivation			Dérivés fluorescents obtenus ^{a)}
	Nature	λ_{ex} (nm)	Milieu	Temps (min)	Température (°C)	Rapport molaire peptide/marqueur	
FQ	fluorogène	488	méthanol/tampon borate pH 9 + KCN	15	55	1/100	mono-marqué (*)
NDA	fluorogène	442	méthanol/ tampon borate pH 9 + KCN	15	25	1/40	mono-, di-marqué (**)
TAMRA-SE	fluorescent	532	DMSO/tampon borate pH 10	60	25	1/40	mono-, di-, tri-marqué (***)

^{a)} Groupements marqués: (*) α -NH₂ des Lys en C-term, (**)(*) α -NH₂ des Lys C-term et Ala en N-term (PM), (***) α -NH₂ des Lys C-term, Ala en N-term (PM) et His.

Table 3.2 – Principales caractéristiques des réactions de marquage fluorescent de PN et PM optimisées

Chapitre 4

Séparation électrocinétique des peptides natif et mutant après marquage fluorescent

Les protocoles de dérivation par le NDA, le FQ et le TAMRA-SE, optimisés dans le chapitre précédent, ont été appliqués à un mélange équimolaire des peptides PN et PM. La séparation des dérivés fluorescents obtenus a été effectuée selon le mode d'électrophorèse capillaire de zone en utilisant un capillaire de silice fondue (Phymep, France). L'optimisation de la méthode d'analyse a consisté à évaluer l'effet de différents paramètres tels que le pH, la force ionique et la nature du tampon de séparation. D'autres paramètres tels que la longueur du capillaire, la tension appliquée, la température et la méthode de rinçage du capillaire entre chaque analyse ont également été optimisés. Dans un second temps, les méthodes EC-LIF développées pour les trois marquages fluorescents ont été validées. Les critères de linéarité, justesse, répétabilité et limites de détection et de quantification ont été évalués. Nous présentons, en dernier lieu, les travaux effectués sur les analyses électrocinétiques en puce microfluidique.

A Séparations électrocinétiques en EC-LIF

I Séparation EC-LIF des dérivés obtenus par marquage avec le NDA des peptides PN et PM

I.1 Optimisation de la méthode de séparation

I.1.1 Optimisation du tampon d'analyse

Le premier essai de séparation des dérivés obtenus après dérivation par le NDA d'une solution équimolaire de PN et PM (à la concentration de 0,2 mM) a été réalisé en utilisant un tampon phosphate de force ionique 50 mM à pH 2.

L'analyse a été effectuée dans un capillaire de silice fondue (75 μm de diamètre interne, 50 cm de longueur effective et 60 cm de longueur totale) soumis à une tension de 20 kV avec une détection LIF 442 nm réalisée du côté cathodique. A pH 2, l'amplitude du flux électroosmotique et la mobilité électrophorétique des dérivés fluorescents étant faibles, un pic unique a été détecté tardivement vers 40,5 minutes (cf. figure 4.1).

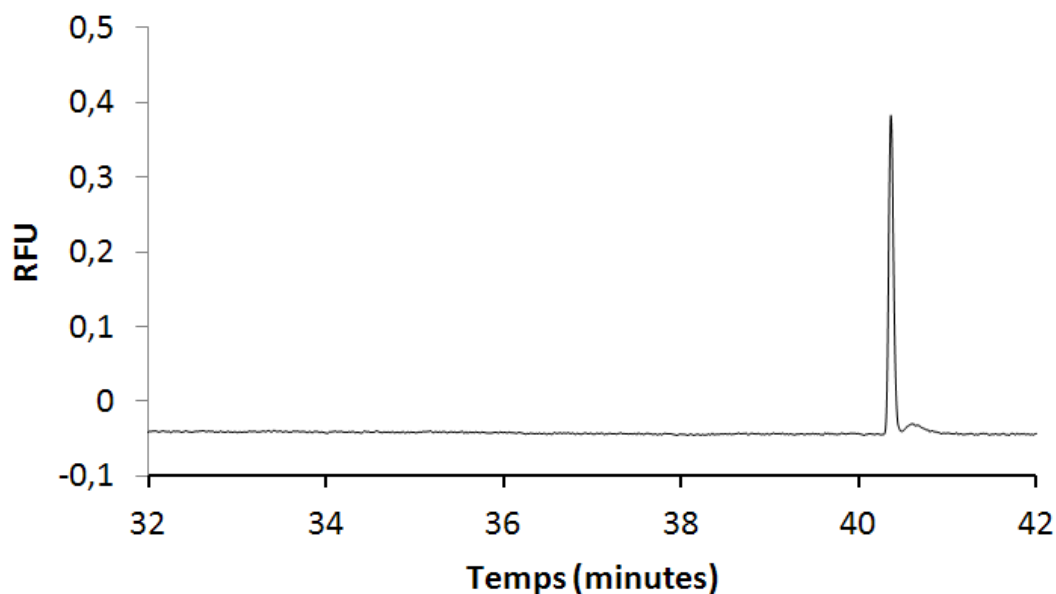


Figure 4.1 – Analyse EC-LIF de la dérivation par le NDA d'un mélange équimolaire de PN et PM en tampon acide

Conditions EC : capillaire silice (60×50cm×75 μm), voltage 20 kV, température 25°C, tampon phosphate de sodium pH=2,0 50 mM.

L'injection d'une solution de dérivation de chacun des deux peptides a confirmé la co-migration des deux dérivés fluorescents dans ces conditions acides. De plus, nous avons observé que la hauteur du pic correspondant aux peptides marqués est très faible, l'émission de fluorescence étant fortement diminuée en milieu acide. Pour toutes ces raisons, nous avons décidé de réaliser les essais suivants en testant des électrolytes supports de pH neutre et basique. De façon à assurer une bonne capacité tampon, différents électrolytes de force ionique variant de 20 à 70 mM ont été préparés, à partir des systèmes tampons suivants : phosphate de sodium (pH 7 à 7,5), borate de sodium (pH 8 à 10), Tris-HCl et HEPES (pH 8 à 8,5).

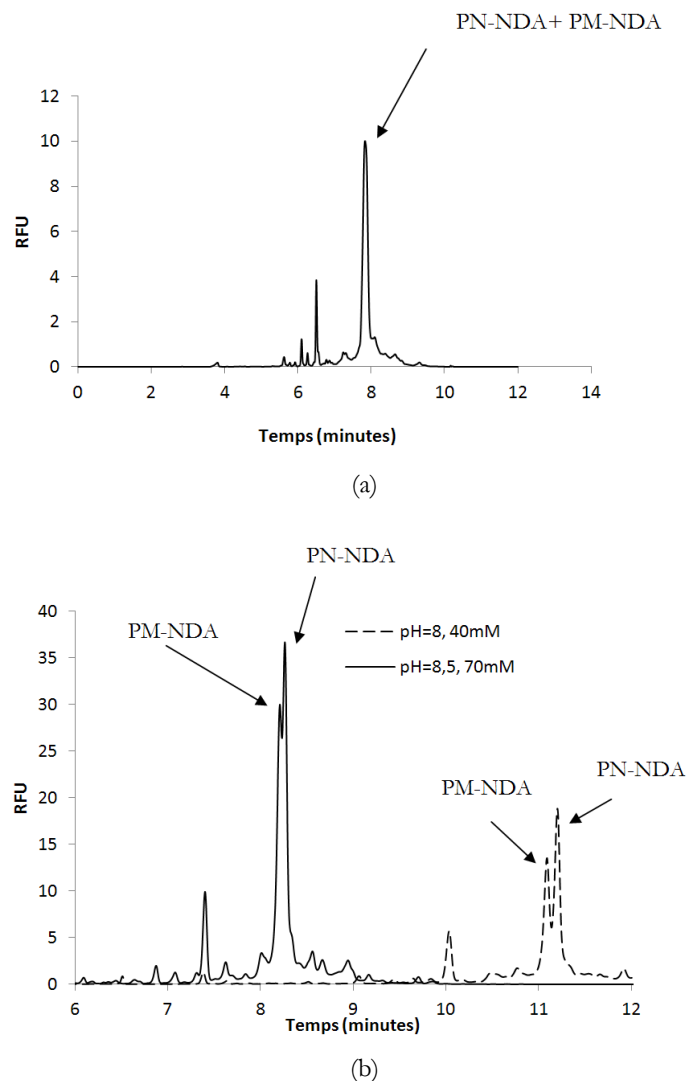


Figure 4.2 – Analyse EC-LIF de la dérivation par le NDA d'un mélange équimolaire de PN et PM en tampons basiques

Conditions EC : capillaire silice ($60 \times 50 \text{ cm} \times 75 \mu\text{m}$), voltage 20 kV , température 25°C , (a) Tampon HEPES pH=8,0 40 mM. (b) tampon borate pH=8,0 40 mM (pointillés) pH=8,5, 70 mM (trait plein)

Dans cette gamme de pH, la charge nette des dérivés fluorescents étant négative, la séparation est effectuée en mode contre-électroosmotique. Une co-migration des dérivés de PN et PM a été observée dans les gammes de pH 7-7,5 et 9-10 quelle que soit la nature du tampon. De la même façon, les analyses effectuées en tampon Tris-HCl et HEPES pH 8-8,5 n'ont pas permis de séparer les pics caractéristiques des dérivés fluorescents de PN et PM (cf. figure 4.2). En revanche, ces pics ont pu être partiellement résolus en utilisant comme électrolyte support le borate de sodium dans une zone étroite de pH comprise entre 8 à 8,5.

La force ionique de cet électrolyte a été optimisée dans une gamme variant de 20 à 70 mM. Comme illustré sur la figure (b), les meilleures séparations ont été obtenues pour une force ionique de 70 mM à pH 8,5 et de 40 mM à pH 8. Ces dernières conditions donnant la plus grande valeur de résolution entre les dérivés fluorescents de PN et PM ($R_s = 1,0$) ont été retenues pour la suite de l'optimisation.

I.1.2 Optimisation de la tension appliquée

La tension appliquée aux extrémités du capillaire (60 cm de longueur totale) a été optimisée en sélectionnant comme électrolyte support le tampon borate 40 mM pH 8. Selon les équations 1.7 et 1.8 reportées dans le premier chapitre, il apparaît que l'efficacité d'une séparation (N) est directement proportionnelle à la tension appliquée (V) et que la résolution (R_s) entre deux analytes est, quant à elle, proportionnelle à la racine carrée de N et inversement proportionnelle à la racine carrée du coefficient de diffusion des espèces séparées (D_m). Une augmentation de la tension appliquée peut donc augmenter la résolution d'une séparation à condition que la dissipation de la chaleur produite par effet Joule demeure efficace.

L'analyse d'une solution équimolaire de PN et PM marquée par le NDA a été réalisée en appliquant une tension de 7 kV à 30 kV. Les électrophérogrammes obtenus sont présentés sur la figure 4.3.

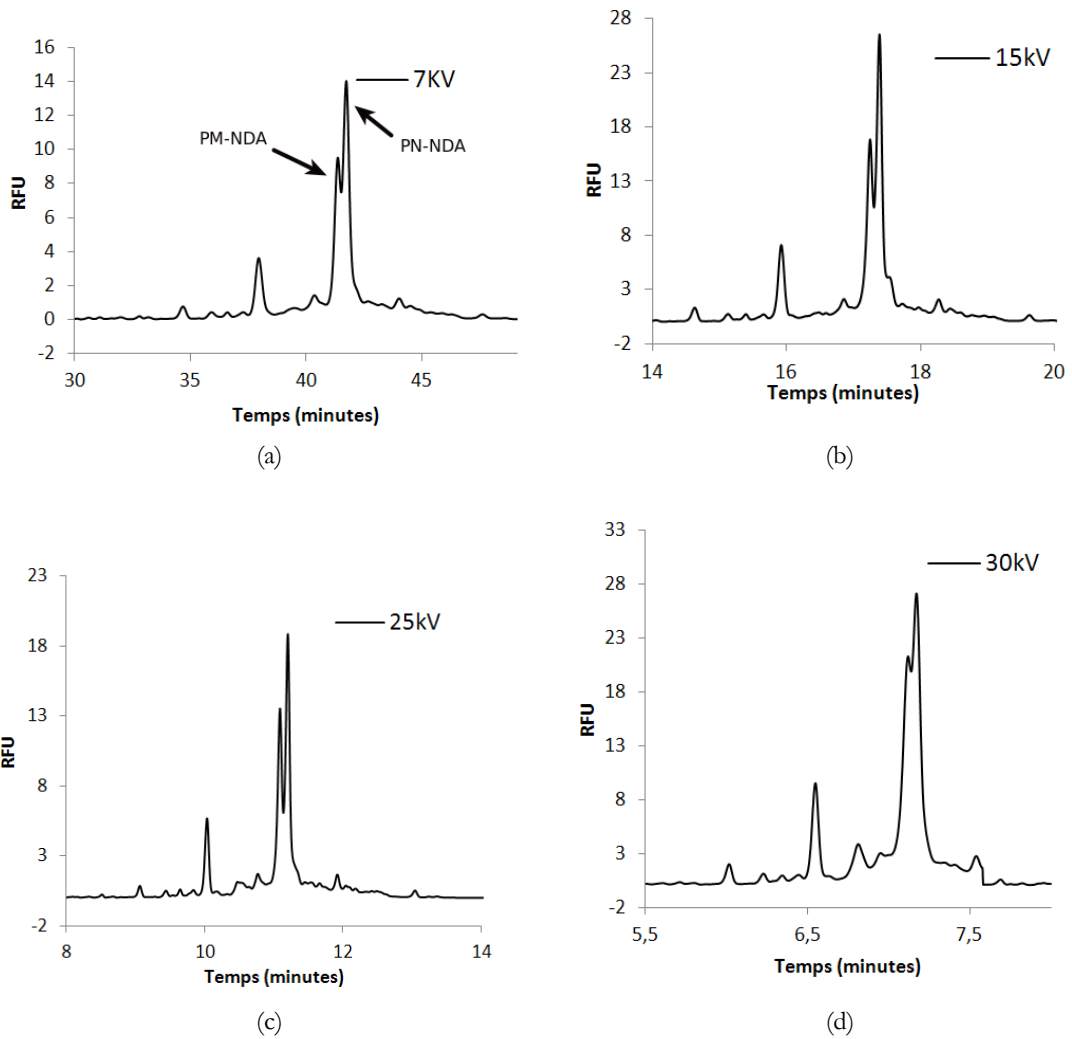


Figure 4.3 – Analyse EC-LIF de la dérivation par le NDA d'un mélange équimolaire de PN et PM à différents voltages

Conditions EC : capillaire silice ($60 \times 50 \text{ cm} \times 75 \mu\text{m}$), température 25°C , tampon borate $\text{pH}=8,0$ 40 mM

Afin d'évaluer l'effet Joule, nous avons tracé la courbe représentant l'intensité du courant électrique mesurée en fonction de la tension appliquée (vérification expérimentale de la loi d'Ohm) (cf. figure 4.4).

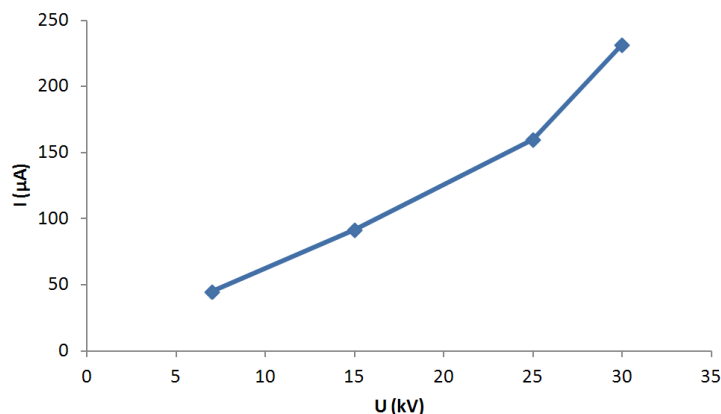


Figure 4.4 – Courbe représentant l'intensité du courant en fonction de la tension appliquée
Conditions EC : capillaire silice ($60 \times 50 \text{ cm} \times 75 \mu\text{m}$), température 25°C , tampon borate $\text{pH}=8,0$ 40 mM

Nous pouvons observer que la courbe obtenue est linéaire dans une gamme de tension variant entre 7 et 25 kV, indiquant que dans ces conditions expérimentales, l'échauffement du capillaire est négligeable. Au-delà de 25 kV, l'efficacité du système de thermorégulation n'est plus suffisante pour assurer une bonne dissipation de la chaleur, ce qui entraîne une perte d'efficacité et de résolution.

La résolution entre les pics caractéristiques des dérivés fluorescents de PN et PM en fonction de la tension appliquée aux extrémités du capillaire est présentée sur la figure 4.5. Une augmentation de la résolution en fonction de la tension appliquée est observée entre 7 et 25 kV ($R_s = 1,0$ à 25 kV). R_s diminue ensuite pour atteindre une valeur minimale de 0,2 à 30 kV. Nous avons donc choisi de poursuivre l'optimisation de la méthode en fixant la tension appliquée à 25 kV et la température du capillaire à 25°C .

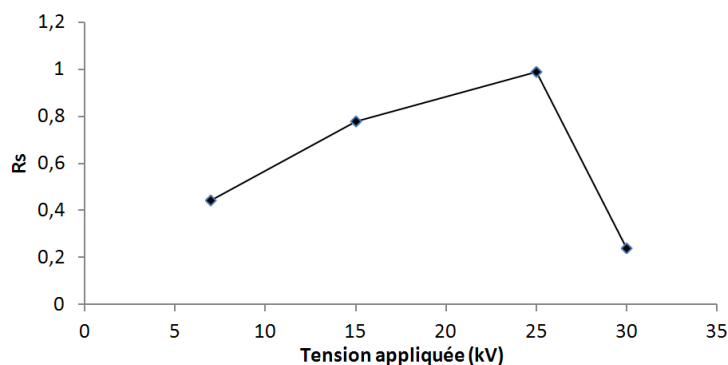


Figure 4.5 – Évolution de la résolution entre les peptides PN et PM marqués par le NDA en fonction de la tension appliquée.

I.1.3 Optimisation de la longueur du capillaire

L'optimisation de l'électrolyte support (nature, pH et force ionique) et de la tension appliquée, a permis d'atteindre une résolution entre les deux peptides marqués de 1,0. Cette valeur étant insuffisante pour permettre la quantification des analytes, nous avons étudié dans les conditions opératoires retenues (tampon borate 40mM pH 8, tension de 25kV, température de 25°C) l'influence de la longueur du capillaire sur la résolution. Selon l'équation 1.8 présentée dans le chapitre 1, la résolution étant proportionnelle à la racine carrée du rapport de la longueur effective du capillaire par sa longueur totale, une augmentation de la résolution peut être obtenue en augmentant ce rapport. Les résultats représentant la résolution entre les pics caractéristiques des dérivés fluorescents de PN et PM en fonction de la longueur effective du capillaire de séparation sont présentés sur le graphique de la figure 4.6.

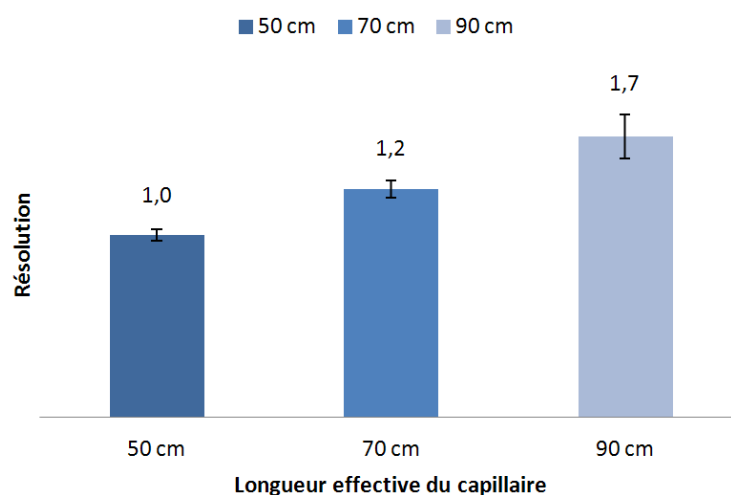


Figure 4.6 – Évolution de la résolution entre les peptides PN et PM marqués par le NDA en fonction de la longueur effective du capillaire

Nous constatons sur ce graphique, que l'augmentation de la longueur du capillaire permet d'augmenter significativement la résolution entre les peptides marqués. La résolution obtenue en effectuant la séparation d'un mélange équimolaire de PN et PM sur un capillaire de 90 cm de longueur effective est satisfaisante ($R_s = 1,7$).

I.1.4 Optimisation de la température/tension appliquée

Nous avons en dernier lieu cherché à améliorer la résolution de la séparation effectuée sur un capillaire de 90 cm de longueur effective avec un tampon borate 40 mM pH 8, en augmentant la tension appliquée aux extrémités du capillaire de 25 kV à 30 kV tout en diminuant la température de 25°C à 15°C de façon à assurer une dissipation efficace de la chaleur. Un léger gain en résolution a été ainsi obtenu, la valeur de R_s étant alors égale à 1,9 (figure 4.7).

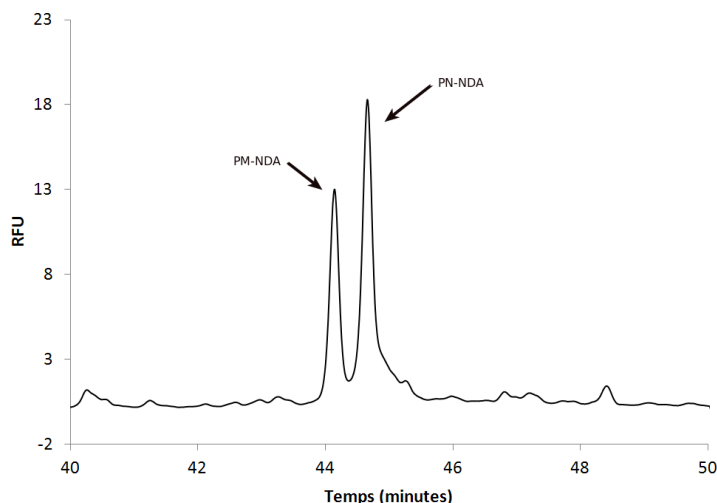


Figure 4.7 – Analyse EC-LIF de la dérivation par le NDA d'un mélange équimolaire de PN et PM dans les conditions optimisées

Conditions EC : capillaire silice ($100 \times 90 \text{ cm} \times 75 \mu\text{m}$), voltage 30 kV, température 15°C, tampon borate pH=8,0 40mM)

I.1.5 Optimisation de la méthode de rinçage du capillaire

De façon à limiter le phénomène d'adsorption probable du NDA et/ou des dérivés fluorescents sur les parois du capillaire, se traduisant par une mauvaise répétabilité des temps de migration et des aires de pics, nous avons cherché à optimiser la méthode de rinçage du capillaire. Une étape de rinçage avec une solution de dodécyl sulfate de sodium (SDS) à 30 mM concentration supérieure à la concentration micellaire critique (8 mM dans l'eau), a été ajoutée à la séquence classique réalisée entre chaque analyse, incluant un rinçage à la soude molaire puis à l'eau. Cette procédure a conduit à une nette amélioration de la répétabilité de la méthode (coefficient de variation sur l'aire et le temps de migration des pics inférieurs à 2,6%).

Au total, dans les conditions optimisées (tampon borate 40 mM pH 8, tension de 30 kV, température 15°C, capillaire de longueur effective 90 cm), la séparation des dérivés PN-NDA

et PM-NDA peut-être obtenue avec une résolution satisfaisante de 1,9 et une efficacité du pic caractéristique du dérivé PN-NDA, estimée en calculant le nombre de plateaux théoriques, de 27200, qui est également satisfaisante en dépit du temps d'analyse qui est élevé.

I.2 Validation de la méthode

Nous avons réalisé la validation de la méthode en étudiant les critères de linéarité, répétabilité, justesse et détermination des limites de détection et quantification. L'étude de la linéarité a été menée en analysant une solution de PN dérivée par le NDA dans une gamme de concentrations variant de 5 à 600 μM . L'aire du pic correspondant au dérivé fluorescent PN-NDA a été reportée en fonction de la concentration du peptide (cf. figure 4.8).

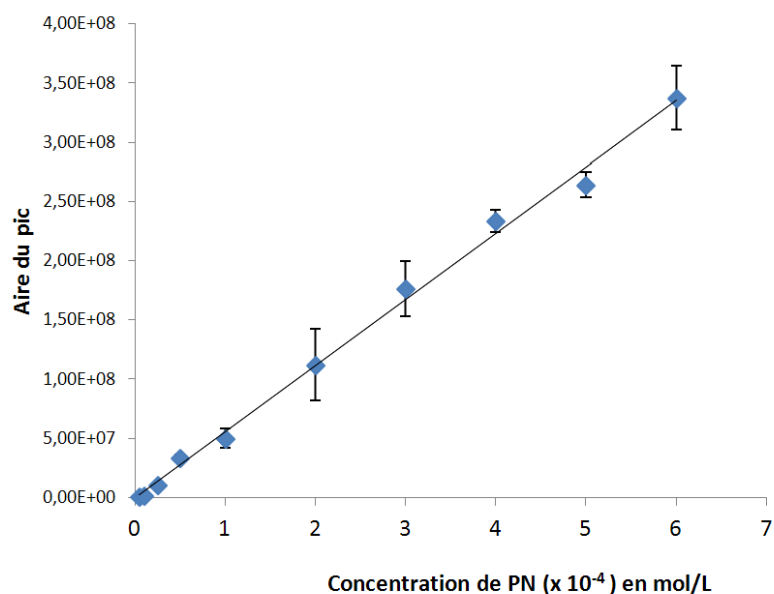


Figure 4.8 – Droite d'étalonnage obtenue pour l'analyse de PN-NDA

Une droite de régression, d'équation $y = 59,1 \times 10^4 x - 391,5 \times 10^4$ et caractérisée par un coefficient de corrélation $R = 0,999$ a été établie prouvant la linéarité de la méthode sur la gamme de concentrations étudiée. La répétabilité de la méthode a aussi été déterminée en étudiant la répétabilité intra-jour et la répétabilité inter-jours. La première a été déterminée en faisant 5 analyses consécutives d'une solution de peptide PN à une concentration de 200 μM marquée par le NDA. La seconde a été étudiée en analysant trois solutions de dérivation sur trois jours consécutifs. La répétabilité intra-jour de la méthode est bonne puisque les

coefficients de variations calculés sur l'aire et le temps de migration du dérivé PN-NDA sont respectivement de 2,6% et 0,8%. La répétabilité inter-jour est satisfaisante, les coefficients de variation pour l'aire et le temps de migration étant respectivement de 7,6% et 3,7%. La justesse de la méthode, définie comme étant le degré de concordance entre la valeur réelle et la valeur mesurée, a été déterminée en comparant la moyenne des valeurs calculée en réalisant 3 analyses d'une solution de peptide à la concentration de $200\mu M$ à la valeur théorique. La valeur du biais relatif calculée est égale à 0,2% indiquant que l'erreur sur la justesse peut-être considérée comme non significative.

La limite de détection (LOD) et la limite de quantification (LOQ) du dérivé PN-NDA ont été déterminées par détection de fluorescence avec un rapport S/B calculé de 3 pour la LOD et de 10 pour la mesure de la LOQ. Les valeurs de LOD et LOQ obtenues sont respectivement égales à $2,5\mu M$ et $5\mu M$.

Au total, les résultats de cette étude ont montré que la méthode développée pour réaliser l'analyse des peptides PN et PM dérivés par le NDA est linéaire, répétable et juste et peut donc être utilisée à des fins quantitatives pour calculer la teneur de solutions de peptides à une concentration de l'ordre du μM .

II Séparation EC-LIF des dérivés obtenus par marquage avec le FQ des peptides PN et PM

II.1 Optimisation de la méthode de séparation

Les résultats présentés dans le paragraphe précédent ayant montré que seules les séparations effectuées en milieu de pH supérieur à 7 permettaient à la fois de séparer et de d'obtenir un signal de fluorescence élevé pour les dérivés du NDA, les essais de séparation des dérivés obtenus après marquage de PN et PM par le FQ ont été menés en utilisant différents électrolytes support de pH variant de 7 à 10. L'analyse d'une solution équimolaire de PN et PM (200 μM), dérivée selon les conditions expérimentales optimisées dans le chapitre 3, a ainsi été réalisée par EC-LIF 488 nm sur un capillaire de silice fondue de 60 cm de longueur effective soumis à une tension de 25 kV avec comme électrolyte de séparation les systèmes tampons suivants : borate de sodium (pH entre 8 et 10), phosphate de sodium (pH 7 et 7,5), carbonate d'ammonium (pH 7,6 et 9) et HEPES (pH entre 8 et 9) de force ionique variant de 20 à 70 mM.

Le comportement électrophorétique des peptides marqués par le FQ s'est révélé être assez similaire à celui des peptides marqués par le NDA. En effet, une co-migration entre les dérivés fluorescents de PN et PM a été observée dans les gammes de pH 7-7,5 et 9-10, quelle que soit la nature du tampon utilisé. Les dérivés PN-NDA et PM-NDA ont pu en revanche être séparés dans une gamme étroite de pH comprise entre 8 et 8,5. Cependant, contrairement aux résultats obtenus avec les peptides marqués par le NDA, la séparation des pics a cette fois-ci été observée en présence du tampon HEPES tandis qu'en tampon borate aucune ébauche de séparation n'a été mise en évidence quelle que soit la force ionique de l'électrolyte (cf. figure 4.9). La résolution obtenue en tampon HEPES est meilleure à pH 8 qu'à pH 8,5. Aucune différence significative des valeurs de R_s n'a été observée en augmentant jusqu'à 70 mM la force ionique du tampon HEPES pH 8, le seul effet observé étant une augmentation du temps d'analyse.

Dans les conditions optimisées (tampon HEPES 40 mM pH 8), la séparation des dérivés PN-FQ et PM-FQ est réalisée en 11 minutes avec une résolution satisfaisante de 1,5 et une

efficacité du pic caractéristique du dérivé PN-FQ, estimée en calculant le nombre de plateaux théoriques, de 27500.

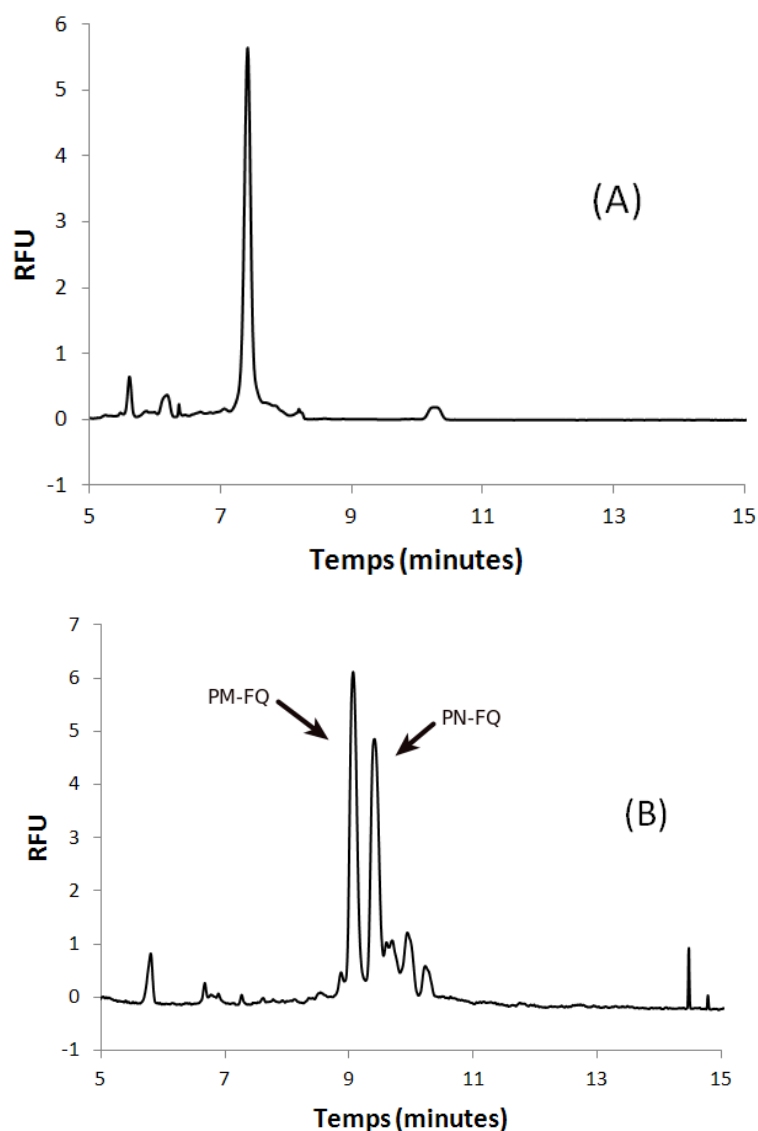


Figure 4.9 – Analyse EC-LIF de la dérivation par le FQ d'un mélange équimolaire de PN et PM

Conditions EC : capillaire silice ($60 \times 50 \text{ cm} \times 75 \mu\text{m}$), voltage 25 kV , température 25°C , tampon borate $\text{pH} = 8$, 40 mM (A), tampon HEPES $\text{pH} = 8,0$ 40 mM (B)

II.2 Validation de la méthode de séparation

La méthode de séparation électrocinétique des dérivés fluorescents obtenus par marquage des peptides par le FQ a été validée. La linéarité a été étudiée en analysant une solution de PN dérivée par le FQ dans une gamme de concentrations variant de 100 à $500 \mu\text{M}$. La

droite d'étalonnage a été établie en traçant l'aire du pic correspondant au dérivé fluorescent PN-NDA en fonction de la concentration de PN, son équation est la suivante : $y = 0,5 \times 10^4 x + 6,3 \times 10^4$. Le coefficient de corrélation calculé, égal à 0,997, confirme la linéarité de la réponse en fonction de la concentration du peptide. La répétabilité intra-jour évaluée en calculant les coefficients de variation de l'aire et du temps de migration caractéristique de PN-FQ obtenus sur 5 analyses consécutives d'une solution de PN à la concentration de 200 μM est bonne (CV aire = 3,7%, CV Tm = 0,3%). La répétabilité inter-jours, établie sur 3 jours, est également satisfaisante (CV aire = 7,1%, CV Tm = 4,8%). La justesse de la méthode a été estimée en analysant une solution de PN à la concentration de 200 μM . La valeur du biais relatif calculé est égal à -1,5 %. Les limites de détection (rapport S/B = 3) et de quantification (rapport S/B = 10) calculées sont respectivement égales à 50 μM et 100 μM .

En conclusion, les résultats de cette validation analytique présentés ci-dessus montrent que la méthode EC-LIF développée répond aux critères de linéarité, justesse et répétabilité nécessaires pour effectuer dans de bonnes conditions l'analyse quantitative des peptides PN et PM après marquage par le FQ. A noter cependant, que la méthode est moins sensible que celle développée pour l'analyse des peptides dérivés par le NDA, la limite de quantification du dérivé PN-FQ étant 20 fois plus élevée que celle du dérivé PN-NDA.

III Optimisation de la séparation EC-LIF des dérivés obtenus par dérivation avec le TAMRA-SE des peptides PN et PM

La mise au point de la méthode de séparation des dérivés obtenus après marquage de PN et PM par le TAMRA-SE a été effectuée en analysant par EC-LIF 532 nm d'une solution équimolaire de PN et PM (600 μM), dérivée selon les conditions expérimentales optimisées dans le chapitre 3, sur un capillaire de silice fondue de 50 cm de longueur effective soumis à une tension de 25 kV avec comme tampon de séparation les systèmes tampons suivants : borate de sodium (pH entre 8 et 10), phosphate de sodium (pH 7 et 7,5) et HEPES (pH entre 8 et 9) de force ionique variant de 20 à 70mM.

En comparaison avec l'optimisation des méthodes développées pour l'analyse des déri-

vés fluorescents formés par marquage des peptides par le FQ et le NDA, la sélection de l'électrolyte support permettant la séparation des pics principaux caractérisant les dérivés PN-TAMRA-SE et PM-TAMRA-SE s'est avérée être plus aisée. En effet, une résolution supérieure à 1,5 a pu être obtenue sur une gamme de pH entre 7 et 9 en utilisant différents tampons de séparation tels que : HEPES, phosphate de sodium et borate de sodium. Le tampon de séparation ayant donné la meilleure résolution entre les pics principaux correspondant aux dérivés fluorescents de PN et PM ($R_s = 2,5$) est le tampon phosphate pH = 7 de force ionique égale à 50 mM. L'analyse est rapide et peut être effectuée dans ces conditions en moins de 11 minutes.

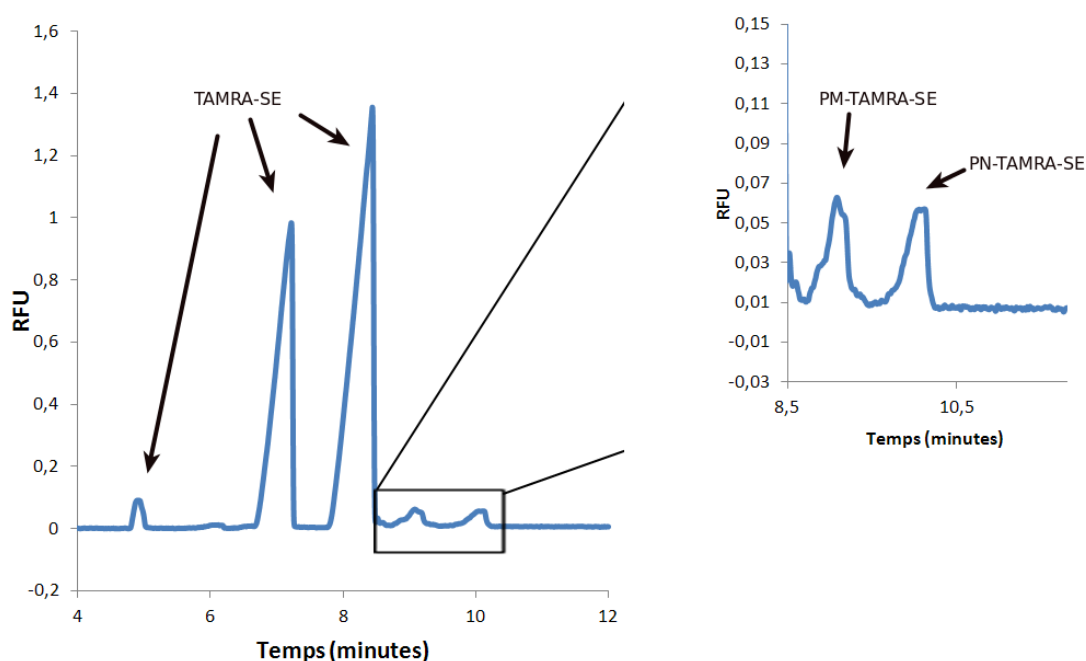


Figure 4.10 – Analyse EC-LIF de la dérivation par le TAMRA-SE d'un mélange équimolaire de PN et PM

Conditions EC : capillaire silice (60×50cm×75µm), voltage 20 kV, température 25°C. Analyse tampon phosphate pH =7, 50mM. Dilution des échantillons 1/4 tampon phosphate pH =7, 50mM

L'efficacité de pic n'est pas satisfaisante, comme le montrent les valeurs médiocres du nombre de plateaux théoriques calculées pour les 2 pics situés vers 9 et 10 minutes sur l'électrophérogramme présenté dans la figure 4.10 ($N = 8680$ pour PM-TAMRA-SE et $N = 7535$ pour PN-TAMRA-SE). Afin d'améliorer l'efficacité de la séparation, l'échantillon analysé (tampon borate 40 mM pH 10) a été dilué au quart dans une solution de faible conducti-

tivité (solution d'incubation des peptides en tampon HEPES 40 mM pH=8) comparée à celle du tampon d'analyse afin de créer un phénomène de stacking.

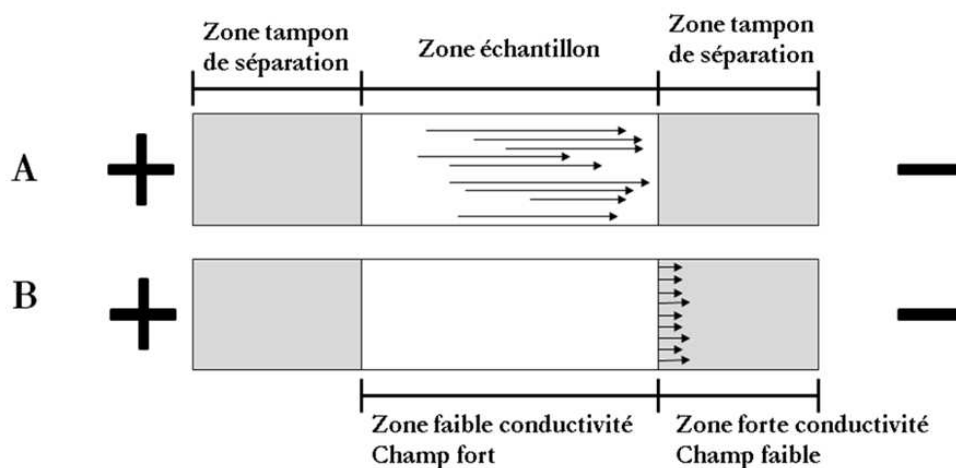


Figure 4.11 – Principe de la compression de la bande (stacking) de l'échantillon en électrophorèse capillaire
 (A) injection d'un plug d'échantillon (B) ralentissement des espèces à la limite entre la zone d'échantillon et le tampon de séparation (Adapté de [156])

Comme illustré sur la figure 4.11, une compression de la bande échantillon peut en effet être observée dans ces conditions opératoires : lorsque la tension est appliquée, le champ électrique dans la solution d'échantillon est plus élevé que dans le reste du capillaire, les espèces migrent rapidement à travers la zone de l'échantillon jusqu'à ce qu'elles atteignent le tampon de séparation au sein duquel le champ électrique est faible. Les espèces sont alors ralenties et se concentrent à la limite entre la zone d'échantillon et la zone du tampon permettant ainsi de diminuer la dispersion. Ce choix a été dicté par la très faible conductivité du tampon HEPES par rapport à celle du tampon phosphate (pour une solution d'une concentration de 200 mM, la conductivité du phosphate est de 22,0 mS/cm alors que celle du HEPES est de 0,06 mS/cm soit plus de 360 fois plus faible [157]).

L'électrophérogramme obtenu pour l'analyse de la solution de dérivation de PN et PM par le TAMRA-SE après dilution au quart de l'échantillon dans le tampon HEPES pH = 8, 40 mM est présenté sur la figure 4.12.

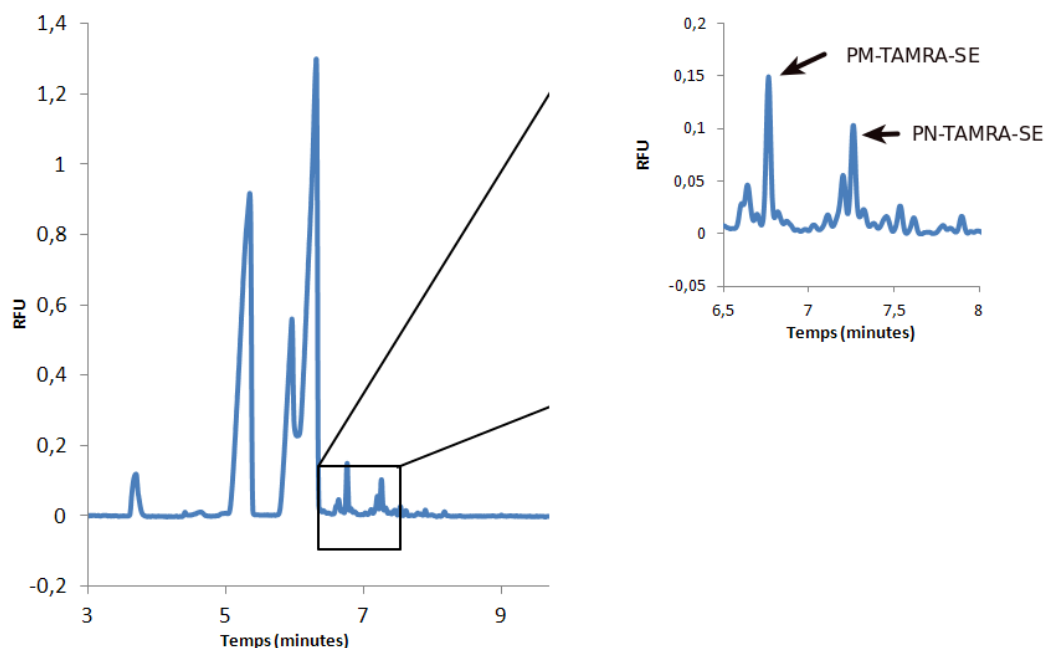


Figure 4.12 – Analyse EC-LIF de la dérivation par le TAMRA-SE d'un mélange équimolaire de PN et PM

Conditions EC : capillaire silice ($60 \times 50 \text{ cm} \times 75 \mu\text{m}$), voltage 20 kV, température 25°C. Analyse tampon phosphate pH = 7, 50mM. Dilution des échantillons 1/4 tampon HEPES pH = 8, 40 mM. Conditions de dérivation (cf. annexe B.IX).

Une nette amélioration de l'efficacité des pics est observée dans ces conditions. Le profil des 2 pics larges et déformés observés en l'absence de dilution de l'échantillon est ainsi modifié après dilution, ce qui permet de mettre en évidence de nombreux pics correspondant vraisemblablement aux multiples dérivés fluorescents formés pour chacun des 2 peptides (mono-, di- et tri-marqués). Le nombre de plateaux théoriques calculé pour les 2 pics principaux, que l'on pourrait attribuer respectivement aux dérivés PM-TAMRA-SE et PN-TAMRA-SE, atteint dans ces conditions de stacking des valeurs respectives de 277560 et 289580 soit une amélioration de plus d'un facteur trente de l'efficacité. La résolution calculée entre ces deux pics est égale à 9,5.

La répétabilité intra-jour de la méthode, estimée en analysant 5 fois une solution de PN dérivée à la concentration de 600 μM , ayant donné des valeurs élevées de CV pour l'aire et le temps de migration des pics, une étape de rinçage avec une solution de DMSO diluée au demi dans l'eau a été ajoutée à la séquence classique réalisée entre chaque analyse. En

facilitant l'élimination du marqueur fluorescent et/ou des dérivés vraisemblablement adsorbés à la surface du capillaire, cette procédure de rinçage a permis d'améliorer la répétabilité de la méthode (CV aire = 3,8% et CV Tm = 2,2%). Dans ces conditions, la répétabilité inter-jours a donné des résultats satisfaisants (CV aire = 7,4% et CV Tm = 4,0%). En revanche, les valeurs calculées de LOD (rapport S/B = 3) et LOQ (rapport S/B = 10), respectivement égales à 300 et μM 600 μM , ont été très décevantes (120 fois plus élevées que celles obtenues pour les dérivés formés par marquage au NDA). Ces résultats décevants nous ont incités à ne pas poursuivre la validation de la méthode pour les critères de linéarité et de justesse.

IV Conclusions

Nous nous sommes intéressés dans ce chapitre à la mise au point des méthodes d'analyse EC-LIF des dérivés fluorescents obtenus par marquage des peptides natif et mutant avec 3 fluorophores : le NDA, le FQ et le TAMRA-SE. Les protocoles de dérivation optimisés dans le chapitre 3 ont été appliqués à un mélange équimolaire des peptides PN et PM. La séparation des dérivés fluorescents obtenus a été effectuée selon le mode d'électrophorèse capillaire de zone en utilisant un capillaire de silice fondue.

Les trois méthodes d'analyse ont été mises au point en optimisant dans un premier temps la nature, le pH et la force ionique du tampon de séparation dont l'impact sur l'amplitude du flux électroosmotique, l'ionisation et la solvatation des analytes est majeur. Dans les trois cas, la meilleure résolution entre les dérivés fluorescents formés par marquage de PN et PM est obtenue en réalisant la séparation en mode contre-électroosmotique au moyen d'électrolytes supports de pH 7 pour les dérivés PN/PM-TAMRA-SE et de pH 8 pour les dérivés PN/PM-FQ et PN/PM-NDA (cf. tableau 4.1). Les résultats ont montré que la nature du tampon de séparation avait un impact important sur la qualité de la séparation puisque le couple de dérivés PN/PM-FQ est séparé uniquement en tampon HEPES 40 mM pH 8, tandis que le couple de dérivés PN/PM-NDA est séparé en tampon borate 40 mM pH 8. Pour ce dernier couple, la mise au point s'est avérée délicate puisque d'autres paramètres tels que la tension appliquée, la température, la longueur du capillaire et la procédure de rinçage ont été dans un second temps optimisés pour obtenir une résolution satisfaisante. Le meilleur compromis en

termes de rapport temps d'analyse vs résolution est obtenu avec la méthode de séparation des peptides marqués par le FQ : la séparation peut ainsi être réalisée en moins de 11 minutes avec une résolution de 1,5, tandis qu'une analyse de 46 minutes est nécessaire pour séparer avec une résolution comparable les dérivés formés par marquage au NDA. La procédure de dérivation des peptides par le TAMRA- SE conduisant à la formation de plusieurs dérivés présentant des degrés de marquage variés (mono-, di- et tri-marqués), l'optimisation de la séparation du mélange de dérivation de PN et PM n'a pas permis d'obtenir la résolution complète de toutes les espèces même si la résolution calculée entre les deux pics principaux caractéristiques des 2 peptides marqués est élevée dans une large zone de pH et notamment en tampon phosphate pH 7.

Marqueur	Conditions optimales de séparation				Résolution
	Electrolyte support	Température (°C)	Longueur effective du capillaire (cm)	Tension Appliquée (kV)	
NDA	Tampon borate pH=8, 40mM	15	90	30	1,9
FQ	Tampon HEPES pH=8, 40mM	25	50	25	1,5
TAMRA-SE	Tampon phosphate pH=7, 50mM	25	50	20	9,5

Table 4.1 – Récapitulatif des conditions optimales de séparation EC-LIF des peptides natif et mutant après marquage fluorescent

La validation analytique des méthodes développées a porté sur l'étude des critères de linéarité, justesse, répétabilité et détermination des limites de détection et de quantification (cf. tableau 4.2). Les résultats ont montré que les méthodes reposant sur la séparation des dérivés formés par marquage par le FQ et le NDA sont linéaires, justes et répétables. Les valeurs les plus faibles de LOD et LOQ ont été obtenues pour les dérivés marqués par le NDA (LOD 2,5 μ M). La procédure de dérivation des peptides par ce marqueur conduit à un gain d'un facteur 20 et 120 en termes de sensibilité par rapport à celle obtenue respectivement avec le FQ et le TAMRA-SE.

Marqueur	Gamme de linéarité (µM)	Equation de la courbe de calibration $y=ax+b$		Coefficient de corrélation (R)	Répétabilité intra-jour (%)		Répétabilité inter-jour (%)		Justesse (%)	LOD (µM)	LOQ (µM)
		a (10 ⁻⁴)	b (10 ⁻⁴)		A	Tm	A	Tm			
NDA	5-600	59,1	-391,5	0,999	2,6	0,8	7,6	3,7	0,2	5	2,5
FQ	100-500	0,5	6,3	0,997	3,7	0,3	7,1	4,8	-1,5	100	50
TAMRA-SE	-	-	-	-	3,8	2,2	7,4	4,0	-	600	300

Table 4.2 – Récapitulatif de la validation des méthodes d’analyse EC-LIF des dérivés fluorescents obtenus par marquage de PN et PM

En conclusion, les travaux présentés dans ce chapitre montrent que les méthodologies développées reposant la séparation EC-LIF des dérivés fluorescents formés après dérivation pré- capillaire de PN et PM par le FQ et le NDA sont adaptées pour réaliser l’analyse quantitative de ces peptides. Bien que les limites de détection et de quantification obtenues ne soient pas aussi élevées que ce que l’on peut espérer atteindre en détection LIF, ces méthodes pourraient être compatibles avec l’analyse d’échantillons biologiques, en raison de la teneur élevée de la TTR dans le sérum et du rendement élevé des étapes de pré-traitement de l’échantillon consistant à isoler et digérer en gel la TTR pour produire les peptides d’intérêt.

Les travaux présentés dans cette partie et ceux du chapitre 3 ont fait l’objet de deux publications [158, 159].

B Séparations électrocinétiques sur puce microfluidique

La microfluidique est un domaine émergent qui consiste généralement à utiliser des puces de quelques centimètres carrés comportant des canaux micrométriques pour la circulation de liquides dans lesquels sont dissous les analytes (produits d’intérêt). En terme d’applications visées par les nombreux projets de recherche en cours on peut citer le diagnostic médical [160], la détection de polluants et d’agents biologiques dans diverses matrices [161, 162]. L’intérêt de cette science émergente réside dans le fait de pouvoir intégrer plusieurs étapes préparatives et analytiques sur une petite surface. Même si les aspects analytiques peuvent sembler aux

premiers abords prédominants il faut aussi reconnaître que le défi permanent associé à ce type de recherche réside dans la nécessité de travailler au sein de groupes pluridisciplinaires.

Historiquement, les premiers systèmes miniaturisés d'analyse (μ TAS pour micro Total analytical System) ont été proposés par Andreas Manz en 1990 [163]. Ils offrent divers avantages qui leur permettent d'intervenir dans les domaines de la chimie, la biologie ou le domaine médical. Les avantages régulièrement rabâchés sont les économies en solvants ou autre réactifs et la diminution du temps d'analyse. D'autre part, l'intégration liée à la miniaturisation permet de disposer sur un même système différentes étapes. A l'heure actuelle, les étapes de pré concentration [164, 165] ou de dérivation [166] sont les plus matures.

Comme nous l'avions évoqué dans l'introduction de cette thèse, l'aboutissement du projet dans lequel s'imbrique ma thèse consistera à intégrer dans une puce microfluidique, des étapes de préparation de l'échantillon, de marquage, de séparation, de détection et de quantification des peptides d'intérêt pour l'étude de la mutation TTR Thr49Ala de la TTR et de concevoir, à terme, un système analytique intégré « point of care » voué à une utilisation hospitalière simple, efficace et rapide pour effectuer le suivi thérapeutique de patients FAP à TTR. Dans ce cadre, nous avons décidé de transposer les séparations électrocinétiques développées dans la première partie de ce chapitre dans les puces microfluidiques. Dans les parties qui vont suivre, nous développerons la mise en place du poste d'analyse sur puces ainsi que les résultats de séparation des peptides obtenus sur puces.

I Mise en place du poste d'analyse sur puces

Dans un premier temps nous avons choisi, commandé et installé un poste d'analyse adapté aux expériences analytiques de microfluidique. Cette installation est centrée autour d'un microscope Axio Observer (Karl Zeiss, Marly-le-Roi, France) customisé pour la détection. En plus du statif couramment vendu par Zeiss, son équipe de conception a, à notre demande, introduit sur la partie gauche un bras permettant de déporter le faisceau lumineux sur une caméra CCD (Hamamatsu ORCA C8484 03G, Massy, France) et/ou un spectrophotomètre UV-visible fibré (Ocean Optics USB 2000+) (cf. figure 4.13). De plus nous avons la possibilité de changer de source par l'introduction à l'arrière du microscope de connectiques standardisées

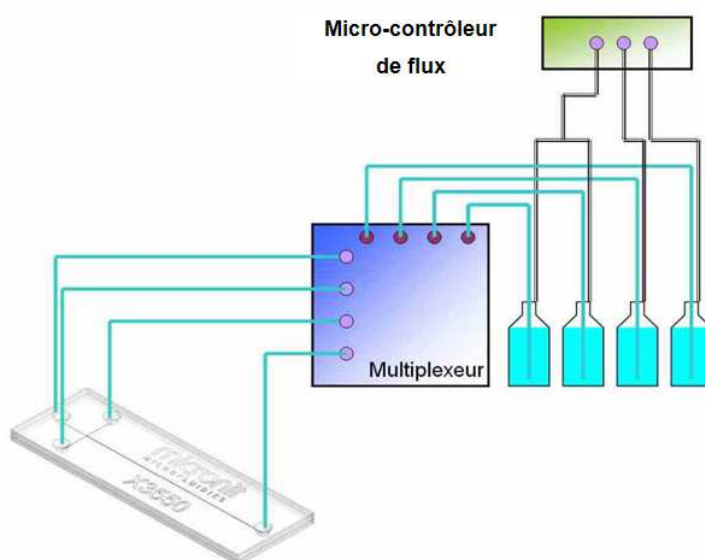
SMA (SubMiniature version A pour fibres optiques) et ainsi avoir la possibilité de mettre une source large spectre de type lampe à vapeur de mercure ou bien d'introduire comme source les lasers solides monochromatiques émettant à 442 nm ou 532 nm pour une détection LIF. Une protection siliconée et bac récupérateur sur le revolver d'objectifs longue focale ont été ajoutés pour protéger l'optique en cas de fuite.



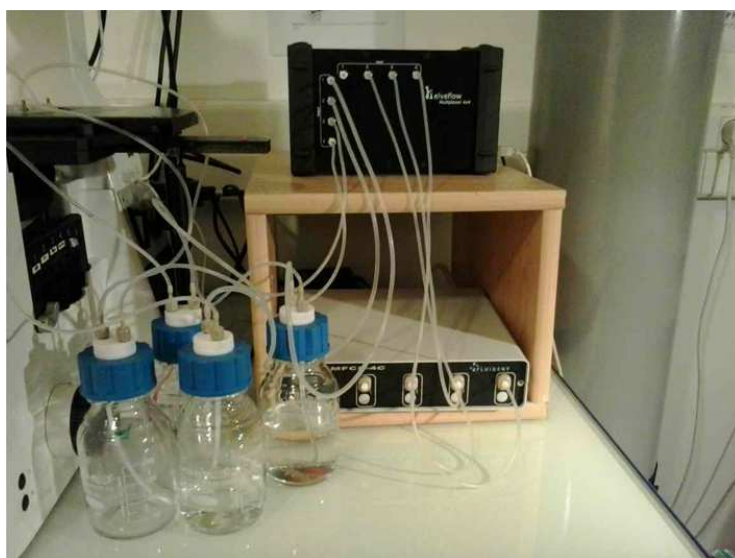
Figure 4.13 – Photographie du poste d'analyse sur puce
Avec en bas à gauche le bras dédié à l'analyse quantitative avec la caméra CCD et qualitative avec la sortie fibrée (ici non connectée) et couplée à spectrophotomètre dans l'UV-visible.

Ensuite nous avons installé un générateur de tension stabilisée LabSmith (HVS448 6000D, Livermore, USA CA) pour fournir des hautes tensions et de faibles courants. Une station de travail (Hewlett Packard Z 800) avec douze cœurs physique et vingt quatre cœurs logiques sous Windows XP 64-bits, permet la commande du générateur électrique, de la fluidique et le traitement des données avec Azur (Datalys, S t Martin D'Herès, France). Ce logiciel généralement associé à des chaînes chromatographique permet de traiter les données fournies par la caméra CCD et propose un traitement classique des électrophérogrammes pour en extraire l'aire des pics, les temps de migration, la résolution entre deux pics et l'asymétrie

de ces derniers, etc. Une conversion des niveaux gris de la zone de détection sous forme de tableau et l'enregistrement d'un fichier au format « txt » sont nécessaires avant de pouvoir travailler avec Azur. La figure 4.13 propose une photographie générale du poste d'analyse microfluidique financé par l'ANR DIMIPOLE.



(a)



(b)

Figure 4.14 – Schéma explicatif de la gestion des fluides pour les étapes préparatives et de séparation sur puce microfluidique

Avec la configuration « bouteilles avant le multiplexeur ». Les tuyaux en noir sont remplis d'azote gazeux sous pression et les bleus contiennent du liquide. Le multiplexeur permet de connecter n'importe quelle entrée avec n'importe quelle sortie (A). Photographie d'un montage réel lors de la préparation d'une campagne d'analyses sur puce avec la configuration « bouteilles après le multiplexeur » (B).

Le système de gestion des liquides (solution de rinçage, électrolytes, solution contenant des polymères pour le traitement de surface, etc.) est constitué d'un microcontrôleur de flux (Fluigent MFCS 3 voies, Villejuif, France) couplé en série avec une matrice de vannes (Elvesys, Multiplexer 4x4, Paris, France) et des bouteilles en pyrex montées avec des bouchons Omnifit (Cambridge, Angleterre). La figure 4.14 reprend le schéma de la gestion des fluides nécessaires pour « alimenter » la puce.

Ce système de poste d'analyse sur puce a été disposé dans la salle « grise » de notre laboratoire. Il s'agit d'une salle, semi propre où on impose des effectifs limités, des manipulateurs formés sur l'ensemble du matériel et des consignes de sécurité ainsi que des tapis adhésifs à l'entrée. De plus, une filtration systématique de toutes les solutions utilisées, avec filtres en téflon® ou de poly-tetra fluoro éthylène PTFE de 0,22 μm de porosité (VWR, Fontenay sous Bois, France), est imposée. En réalité, toutes ces règles imposées n'empêchent pas de retrouver des poussières ou encore des fibres textiles à l'intérieur du canal de séparation ou d'injection et de devoir passer par de longues étapes de rinçage. Par le passé, ces procédures de rinçages, ne se faisaient pas à l'intérieur de la salle grise mais en dehors, en utilisant d'une pompe à membrane avec une tuyauterie bricolée, se terminant par un cône de micropipette. La durée de ces étapes de rinçages pouvait être rallongée par des contaminations secondaires vu que, malgré toutes les précautions prises, la puce se retrouvait dans une atmosphère bien moins propre que la salle grise. L'installation du système de gestion des liquides nous a permis d'éviter de sortir la puce de la salle grise en faisant les rinçages de la puce directement sur la platine du microscope. Ceci a été rendu possible en combinant, en série le microcontrôleur de flux et le multiplexeur.

Un premier montage a été mis en place, il se base sur le fait que la compressibilité des liquides est plus faible que celle des gaz. Donc plus il y a de liquide dans la tuyauterie entre le générateur de pression (dans lequel il faut proscrire toute introduction de liquide sous peine de panne), plus faible sera la différence entre la pression de consigne et celle réellement appliquée au niveau de la puce. Or, les différents tampons, les solutions acides, basiques ou encore hydro-organiques, utilisées pour les rinçages ainsi que les séparations, peuvent être suffisamment conductrices pour dégrader la matrice de vannes du multiplexeur. De son côté le

microcontrôleur de flux a du mal à stabiliser ses pressions de consigne au niveau des entrées-sorties de la puce lorsque la longueur de la tuyauterie est trop longue. De manière générale nous avons donc opté pour des longueurs de tuyaux les plus courtes possibles. La seconde possibilité était donc de mettre les bouteilles de liquides après le multiplexeur. Dans ce cas, il n'y a plus de risque de dégradation du multiplexeur mais la pression appliquée au niveau des puces est bien plus faible que la pression de consigne. Les deux possibilités, mettre les bouteilles avant le multiplexeur ou après, ont donc leur avantage et leur inconvénient. Quelque soit la configuration choisie, les longueurs de tuyaux sont toujours de mêmes longueurs pour limiter les flux résiduels (parasites) de Poiseuille.

Afin de relier la puce au système de contrôle de flux, un autre dispositif a été conçu en collaboration avec Syrine Chebil du Laboratoire de Photonique et Nanostructures (équipe Nanoflu sous la direction d'Anne-Marie Haghiri) et réalisé par l'équipe « conception et machine à outils » du LPN : un « chip-holder ». Celui-ci est montré sur la figure 4.15. La partie inférieure est usinée dans de la tôle bleue qui est ensuite vernie (pour éviter l'apparition de rouille) et recouvert par un adhésif noir (Ferreteria, Medina de Pomar, Espagne) qui limitera les réflexions. On positionne sur cette plaque métallique la puce qui sera surmontée par une fine couche de PDMS (poly-diméthyl siloxane, Corning, Fontainebleau, France) percée de quatre trous en vis-à-vis des quatre réservoirs de la puce en verre. Cette couche d'élastomère assure l'étanchéité du système grâce à sa relativement bonne compressibilité entre la puce et la partie supérieure en plexiglass® (PMMA ou polyméthyl metacrylate). Ce capot supérieur est transparent dans le visible et facilite le positionnement de la puce au-dessus de l'objectif avec l'illumination de la lampe halogène qui surplombe le microscope. Le plexiglass® est collé avec des connectiques Lüer® (Fisher- Bioblock, Illkirch, France) avec une colle Loctite 3430 hysto. Ces connectiques sont elles-mêmes percées et collées avec des électrodes de platines (récupérées sur les anciennes électrophorèses PACE de Beckman, toujours avec la même colle). Ensuite par coalescence on connecte le « chip- holder » avec les tuyaux en tygon® remplis de liquide (Saint-Gobain, Courbevoie, France) pour éviter l'introduction d'air qui favoriserait la présence de bulle dans notre puce. Ce montage nous permet d'obtenir une parfaite étanchéité avec des électrodes plongeant directement dans les réservoirs de la puce en verre.

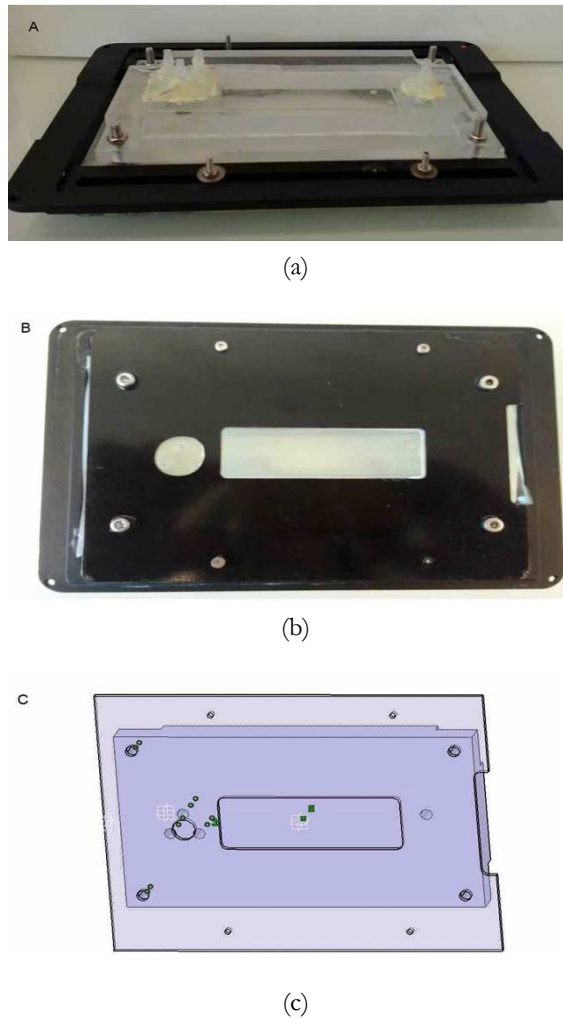


Figure 4.15 – Photographies du chip-holder associé au support démontable de platine Karl Zeiss qui s'insère juste au dessus des objectifs du microscope inversé
La partie supérieure (A) et la partie inférieure (B) sont présentées ici ainsi que l'image obtenue à partir du logiciel AutoCad® avec lequel sont réalisés les plans définitifs compatibles avec nos puces « simple croix » Micralyne (C). La longueur totale du chip-holder est de 12,5cm et sa largeur est de 9,9cm

L'assemblage de ces différents éléments en ayant au préalable vérifié leur compatibilité s'est avéré être un travail laborieux et extrêmement chronophage, d'autant plus si l'on tient compte de la lourdeur des procédures d'appel d'offre mises en place à l'Université qui allonge le délai entre le choix et la réception du matériel.

II Séparations sur puce microfluidique

II.1 Diminution du flux résiduel dans le canal de séparation

La dissymétrie du réseau fluidique des puces « simple croix » commerciales implique la présence de flux résiduels de Poiseuille. Ces mouvements hydrodynamiques parasitiques affectent directement la répétabilité et la reproductibilité des nos séparations électrocinétiques sur puce. Le système de gestion des fluides nous permet de faire une correction des pressions hydrodynamiques au niveau des entrées-sorties de la puce. Pour effectuer cette compensation nous avons mis au point une technique qui se base sur la PIV (particle image velocimetry). Nous effectuons de manière systématique une étape d'ajustement des pressions hydrodynamiques provenant du microcontrôleur en introduisant dans l'électrolyte d'analyse des billes de polystyrène fluorescente (1 μm de diamètre fonctionnalisées COOH, FX-100, Merck-Millipore Estapor, Lyon, France). La bonne symétrie du canal d'injection nous permet d'utiliser une seule voie du Micro-contrôleur de flux Fluigent (les deux bouteilles qui alimentent les deux réservoirs du canal d'injection doivent avoir un niveau de liquide équivalent) tandis que les deux pressions du canal de séparation sont ajustées pour immobiliser ou plutôt minimiser le mouvement des billes fluorescentes sans appliquer de champ électrique. La minimisation des vitesses des billes fluorescentes se fait de manière visuelle ou elle peut être étudiée plus finement à l'aide du logiciel gratuit Micromanager (Image J 1.45S) associé au plugin. PIV_.jar. L'idée à terme serait de réaliser informatiquement une boucle de rétroaction pour automatiser la diminution des ces flux parasitiques avec Micromanager et le contrôleur de flux. Ensuite il suffit de rincer la puce avec l'électrolyte d'analyse pour retirer toutes les microbilles, d'arrêter ensuite toutes pressions hydrodynamiques et d'introduire l'échantillon dans l'un des réservoirs du canal d'injection. Une fois cette étape réalisée nous n'avons plus qu'à programmer le microcontrôleur de flux pour qu'il compense hydrodynamiquement ces flux résiduels lorsque la séquence de séparation sera amorcée par le générateur de tension électrique. La synchronisation nécessaire mais qui reste perfectible entre la gestion des fluides et l'électronique est assurée par le multiplexeur, le microcontrôleur de flux et le générateur de tension, ou plus précisément par la temporisation incluse dans chacun des logiciels fournis par Fluigent, Elvesys

et Labsmith.

II.2 Séparations électrocinétiques

En parallèle de ces différentes études du système de gestion fluïdique, des séparations électrocinétiques « classiques » ont été menées (cf. figure 4.16). Ces expériences ont été menées sur les mêmes puces simple croix, décrites précédemment, à la différence qu'ici des réservoirs 10-32 port (Cluzeau, France), sont collés avec une colle Port Adhésive (Cluzeau, France) sur les ports de la puce. Afin d'assurer l'étanchéité, des joints NanoPort Gasket (Cluzeau, France) sont positionnés entre la colle et le réservoir. Ces réservoirs permettent de déposer la quantité de tampon et d'échantillon nécessaire pour faire quelques analyses (pour un volume d'environ 100 μL au maximum).

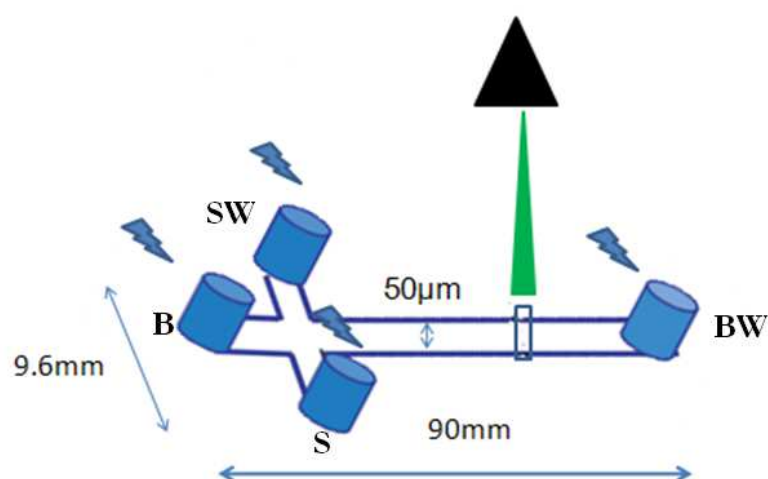


Figure 4.16 – Représentation schématique d'une puce simple croix afin de désigner les quatre réservoirs par une ou deux lettres qui sont couramment utilisées en microfluidique *B* (comme *buffer*) correspond au réservoir du petit côté du canal de séparation. *BW* (comme *buffer waste*) correspond à l'autre réservoir du canal de séparation à proximité du point de détection. *S* (comme *sample*) est le réservoir dans lequel est introduit l'échantillon qui va donc migrer dans le canal d'injection vers *SW* (comme *sample waste*) lors de l'étape d'injection.

Afin de donner plus de précisions expérimentales concernant les tensions utilisées lors des séparations du peptide synthétique d'intérêt, je vous propose sur la figure 4.16, un schéma d'une puce « simple croix » qui désigne les différents réservoirs par une ou deux lettres. La puce lors des étapes d'injection et ensuite de séparation est toujours totalement remplie par

un électrolyte. Les étapes de conditionnement et de rinçages de la puce sont décrites dans l'annexe B.X.

Une échelle micrométrique est positionnée parallèlement au canal de séparation pour effectuer la détection avec le microscope à une distance fixée et connue. La zone de détection se fait donc dans le canal de séparation et elle correspond à une aire de taille donnée et toujours identique d'une analyse à l'autre (en excluant les bords du canal). Elle est sélectionnée à partir d'une image de la caméra incluant ce canal, pour permettre ensuite une moyenne image par image des niveaux de gris en fonction du temps. C'est sur cette base que nos électrophérogrammes sont obtenus pour les électrophorèses sur puce. Nous avons pris soin de conserver des paramètres de caméra toujours identiques d'une analyse à l'autre et l'intensité de fluorescence (niveau de gris) est toujours recalculée en soustrayant chaque image à une intensité moyenne issue d'une portion d'image de même taille mais qui est en dehors du canal. Cette démarche améliore nos comparaisons des électrophérogrammes entre eux, en d'autres termes elle autorise une discussion avec des considérations de type quantitatif relatif. Finalement nous prenons toujours soin de focaliser correctement notre image sur la caméra (la focale est légèrement différente sur la sortie binoculaire).

Ayant obtenu des résultats satisfaisant lors de la séparation des peptides natif et mutants marqués par les réactifs fluorogènes FQ et NDA (cf. chapitre 4 partie A), et vu l'avantage que représente ces réactifs en termes d'électrophérogrammes simplifiés (peu de pics), nous avons commencé nos séparations électrocinétiques en puce en utilisant les peptides synthétiques marqués par le FQ et par le NDA. Là, nous avons été confrontés à une première difficulté concernant ces deux réactifs : leur photoblanchiment rapide. Pourtant, nous avions auparavant mené des études sur ce phénomène de photoblanchiment avec des solutions des peptides marqués par le NDA. Seulement ces études ont été menées en exposant le mélange à la lumière du jour qui reste moins intense que la lumière reçue par l'échantillon lors de l'analyse. En effet, lors des analyses, nous avons pu constater un photoblanchiment quasi immédiat de l'échantillon lors d'irradiations provenant de la lampe à vapeur de mercure.

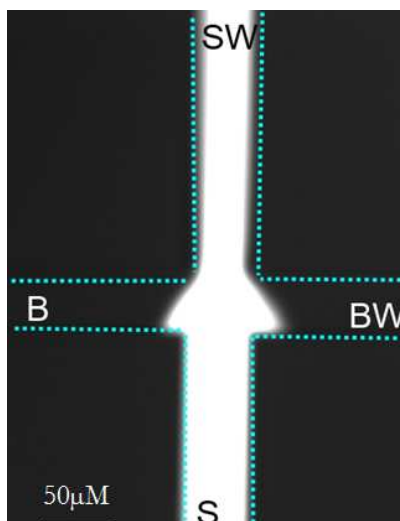


Figure 4.17 – Photographie prise en microscopie de fluorescence lors de l'injection de l'échantillon entre les réservoirs S et SW

On observe à l'intersection entre le canal d'injection et de séparation la forme triangulaire caractéristique de l'injection pincée. Les lignes bleues en pointillé sont présentes pour montrer au lecteur les parois des microcanaux.

Les résultats que nous allons présenter dans cette partie, sont donc des résultats obtenus en analysant les peptides synthétiques PN et PM ayant été marqués par le TAMRA-SE (procédure de marquage cf. annexe B.X). L'ensemble des injections des échantillons de peptides marqués on été effectué en mode pincé (cf. figure 4.17). Cette technique favorise une bonne reproductibilité entre ces analyses qui sont faites avec de puces « simple croix ». En effet les quantités qui migrent dans le canal de séparation sont relativement semblables d'une analyse à l'autre. Concernant le choix des tampons de séparation j'ai directement utilisé comme base ceux qui, en électrophorèse capillaire me donnaient les meilleures séparations en capillaire conventionnelle. Ensuite à partir de mes observations j'ai ajusté mes tampons pour optimiser rapidement mes séparations.

	Injection	Séparation
S	0 V	-200 V
SW	-750 V	-200 V
B	-100 V	200 V
BW	1440 V	-1700 V

Table 4.3 – Potentiels électriques imposés lors des analyses en puce

Nous avons donc réalisé une multitude de séries d'injection-séparation avec plus d'une dizaine d'électrolytes différents (essentiellement des tampons borate et phosphate) en faisant varier le pH et la force ionique. Seuls les résultats les plus résolutifs et répétables sont présentés ici. Concernant le tampon borate pH = 9 à 20 mM de force ionique nous avons imposé les potentiels électriques décrits dans le tableau 4.3. Les séparations du PN et PM sont présentées avec une répétabilité de 4 analyses sur la figure 4.18. ces séparations ont été faites sans rinçages intra-analyses.

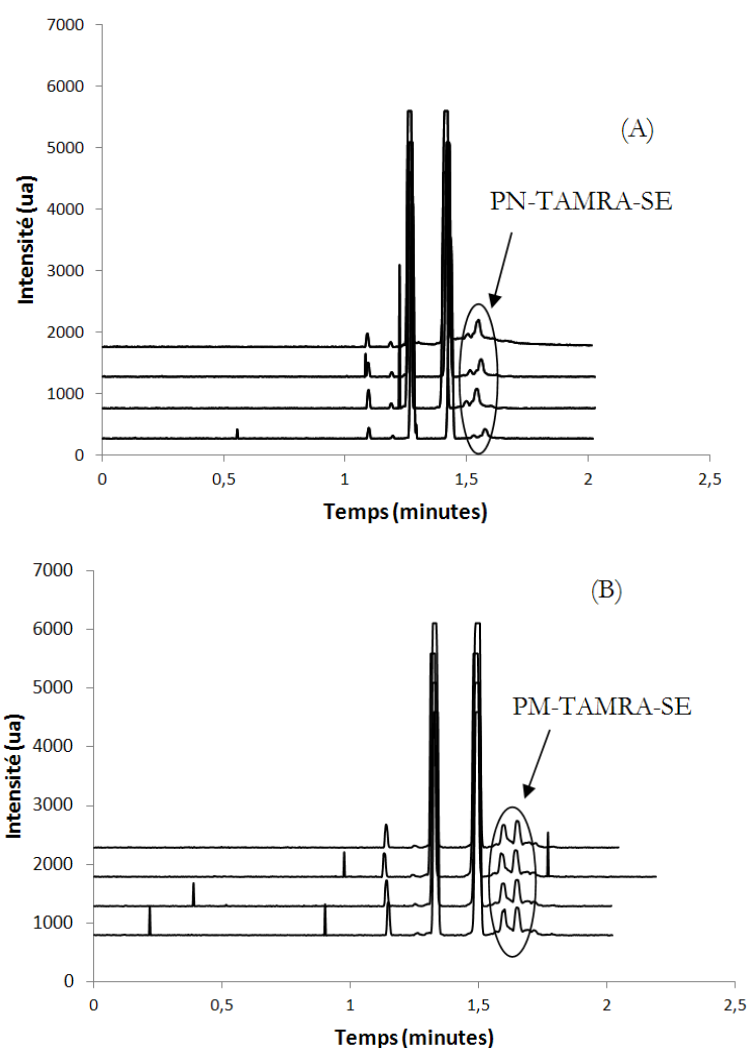


Figure 4.18 – Électrophérogrammes obtenus à partir d'analyses sur puce du PN (A) et du PM (B) marqués par le TAMRA-SE (Conditions de dérivation cf. annexe B.IX) avec une répétition de 4 analyses dans un tampon borate pH=9, 20 mM, les détections sont réalisées avec le filtre rhodamine et se situent à une distance 40 mm de l'intersection entre le canal de séparation et d'injection (dans la direction du réservoir BW). Injection ≈ 0.05 nl, d'échantillons dilués 60 fois.

Un récapitulatif des données obtenues en analysant les électrophérogrammes de l'analyse de nos peptides en puce est présenté dans le tableau 4.4.

	Pic PN	Pic 1 PM	Pic 2 PM
Moyenne des efficacités (N)	28525	29736	30201
CV (N) (%)	5,7	4,8	2,4
Moyenne des aires (ua.min)	653	790	905
CV (aire) (%)	28,7	19,3	5,8
T _m moyen (min)	1,54	1,55	1,60
CV (T _m) (%)	1,1	3,8	3,8

Table 4.4 – Récapitulatif des données des analyses des peptides PN et PM marqués par le TAMRA-SE sur puce.

Dans les électrophérogrammes de la figure 4.18, les pics et notamment les deux pics intenses qui apparaissent avant une minute et demie, correspondent aux pics issus de la solution commerciale du fluorophore. Les pics correspondant au peptide PN, sur les électrophérogrammes (A) migrent en moyenne à 1,54 min. Les pics correspondant au peptide PM, sur les électrophérogrammes (B) migrent en moyenne à 1,55 min, pour le premier et à 1,60 min, pour le second. Les petits pics apparaissant à des temps aléatoires sur les différents électrophérogrammes correspondent à des « spikes », qui traduisent le passage d'un agrégat fluorescent devant le détecteur.

Tout d'abord, nous pouvons voir que le peptide PM marqué par le TAMRA-SE, présente bien deux pics. En corrélant ce résultat avec les résultats obtenus en spectrométrie de masse, nous supposons qu'il s'agirait peut être là des pics respectifs appartenant aux dérivés mono et multimarqués du peptide. Cette attribution peut aussi expliquer l'épaulement aperçu sur les analyses du peptide PN (électrophérogrammes A, figure 4.18). Rappelons, qu'une multitude de petits pics accompagnaient nos pics principaux correspondant aux peptides PN et PM marqués par le TAMRA-SE lors des analyses en EC-LIF (cf. chapitre 4, section A). De plus, nous constatons, à partir du tableau 4.4, que malgré des analyses répétables en termes de temps de migration et d'efficacité, les valeurs de ce dernier paramètre analytique sont une dizaine de fois plus faibles que celles ayant été obtenues en EC conventionnelle. Ceci peut être expliqué par l'absence de stacking lors des analyses en puce, ce qui induit une diffusion plus importante des pics et donc une efficacité moindre. Le coefficient de variation calculé sur les aires des pics

est aussi important si l'on compare les valeurs obtenues en EC conventionnelle. Ceci peut être attribué à des phénomènes d'adsorptions qui ont lieu tout au long des différentes analyses successives. Rappelons qu'ici, aucun rinçage de la puce n'est effectué entre les différentes analyses présentées. Ce phénomène d'adsorption avait déjà été rencontré en électrophorèse capillaire et constitue donc une hypothèse sérieuse expliquant ces valeurs de coefficients de variation importants.

Par ailleurs, comme nous pouvons le constater en analysant les temps de migration très proches des peptides PN et PM, nous avons été incapable d'obtenir une séparation convenable entre ces peptides en microsystèmes dans ces conditions opératoires. Les optimisations effectuées en termes de tampon de séparation (borate, phosphate, HEPES, à des pH allant de 7 à 9 et des forces ioniques allant de 20 à 70 mM), de valeurs de champs électrique et de distance de détection se sont révélées infructueuses.

Il est évident qu'une certaine frustration ressort de mon expérience en microfluidique car il m'a été impossible d'aboutir à des résultats suffisamment résolutifs avec le mélange PN et PM. Un temps important a été investi dans la conception et le montage de ce poste d'analyse sur puce. Il faut aussi préciser que j'ai effectué des tâches qui m'ont été confiées autour de la formation, de la gestion et des achats des consommables sans compter l'entretien des équipements qui sont à la disposition de l'ensemble de l'UMR 8612. Je garde néanmoins un certain sentiment de fierté lié à ces missions communautaires et ne peux m'empêcher d'avoir un regard bienveillant sur les nouveaux projets de recherche qui se construisent en incluant toutes cette instrumentation dédiée à l'analyse microfluidique à l'Institut Galien Paris Sud. En parallèle une formation en microfluidique plus complète m'a été proposée au LPN pour sonder la charge de surface dans un pont de Wheatstone fluidique. Les travaux qui ont suivi cette formation ont donné lieu à la rédaction d'une publication qui sera prochainement soumise. Au-delà de ces efforts en marge de l'analyse des peptides synthétiques mimant une séquence de la TTR, la microfluidique a de toute évidence augmenté ma culture scientifique au niveau de l'instrumentation.

Conclusion et perspectives

L'objectif initial de cette thèse était la conception et l'étude de nouvelles méthodologies analytiques pour détecter et suivre une mutation particulière de la polyneuropathie amyloïde familiale (FAP) à transthyréine (TTR). Cette maladie rare à transmission autosomique dominante se développe suite à un changement structural du tétramère de la TTR mutante. Ce dernier se dissocie et la protéine s'agrège sous forme de fibrilles dans les tissus du système nerveux autonome, au niveau des nerfs périphériques et autour de certains organes comme le cœur. Avec le temps les patients souffrent de dysfonctionnements neurologiques et cardiaques, avec une forte probabilité de décès dans la dizaine d'années qui suit l'apparition des premiers symptômes. La transplantation hépatique est une solution qui permet de réintroduire dans l'organisme les tétramères de TTR, favorisant ainsi la rémission du patient. Les alternatives à la greffe sont des traitements pharmacologiques qui sont proposés au cas par cas en fonction de la dégradation de la motricité du malade et des analyses qui sont pratiquées dans les laboratoires hospitaliers de biochimie. La collaboration entre les praticiens hospitaliers et les analystes pour aboutir à un suivi de l'évolution des concentrations de TTR native et mutante semble alors pertinente. Elle pourrait représenter la base biomédicale nécessaire à l'évaluation du bénéfice d'une transplantation.

D'un point de vue expérimental, nous avons choisi de concentrer nos efforts sur l'électrophorèse capillaire de zone. Cette technique analytique repose sur la migration électrocinétique d'analytes dans un capillaire de silice vierge de quelques dizaines de micromètres de diamètre avec une détection optique. Parmi les avantages mis en avant par les analystes qui la pratiquent on peut citer l'obtention de pics fins et une aptitude à la haute résolution qui vont de concert avec une étude quantitative. Cette direction donnée à mes travaux de recherche semblait être

en adéquation avec la demande du milieu hospitalier qui souhaite donc disposer d'un indicateur fiable de l'état des malades atteints de ce type de polyneuropathie. Nous espérons même à terme pouvoir proposer une plateforme d'analyse miniaturisée simple d'utilisation se basant sur l'électrophorèse en puce microfluidique.

Le choix initial des analytes s'est porté sur deux peptides synthétiques ; le premier mimant une séquence peptidique similaire à la forme native de la TTR et le deuxième simulant la séquence de la forme mutante TTR Thr49Ala. Ces deux peptides ne diffèrent d'un point de vue chimique que par un unique acide aminé terminal, proposant ainsi un réel défi analytique à même de prouver à notre communauté la fiabilité des méthodologies développées au travers de ces travaux de recherche.

D'autre part, la mise au point d'un protocole de digestion sur gel de la TTR sauvage par la trypsine nous a permis d'obtenir un rendement conséquent et de nous conforter sur notre choix des deux analytes cités précédemment. En effet, parmi les produits issus de la digestion nous avons identifié la séquence d'acides aminés initialement choisie et d'origine synthétique. La méthode de digestion s'est révélée être efficace et répétable comme l'atteste les analyses en spectrométrie de masse nanoLC-MS/MS.

Outre la pertinence de ce choix initial concernant les analytes, une cartographie peptidique de la TTR sauvage a permis la séparation des principaux fragments lors de séparations inférieures à 16 minutes avec un tampon phosphate 40 mM pH 2. Fort de ces résultats encourageants, nous avons ajouté au digestat de la TTR sauvage le peptide synthétique mimant la séquence mutante (PM). Les électrophérogrammes montrent alors un pic bien résolu qui ne recouvre aucun autre pic attribué aux fragments issus de cette digestion. Ce qui justifie notre optimisme concernant la capacité de cette méthodologie à être suffisamment discriminante pour identifier et quantifier la proportion de TTR mutante et saine à partir d'un prélèvement issu d'un patient.

Concernant les aspects séparatifs issus de la mise au point de la méthode d'électrophorèse de zone avec un mélange des deux peptides synthétiques, nous avons abouti à une résolution de 2,3 obtenue après une dizaine de minutes. La rapidité de l'analyse et la résolution sont donc satisfaisantes mais ces deux critères ne sont pas suffisants pour le domaine de la santé. Les

détracteurs de l'électrophorèse capillaire insistent souvent sur le faible potentiel de ces séparations en termes de répétabilité et reproductibilité. De notre côté nous nous sommes donc appliqués à démontrer au travers d'une validation analytique de méthode que cette méthodologie se basant sur l'électrophorèse, satisfait aux critères de linéarité et de répétabilité. Ces critères sont impératifs pour l'analyse quantitative. De plus la limite de quantification par une détection spectrométrique d'absorbance dans l'UV est de 1 μM . Cette dernière concentration nous laisse à penser que cette méthodologie est transposable à l'analyse du sérum qui contient des concentrations qui s'échelonnent généralement entre 14 et 29 μM .

Afin de peaufiner nos méthodes électrocinétiques et de réduire les valeurs de nos limites de quantification, nous avons souhaité étudier les séparations en électrophorèse capillaire de zone couplées avec une détection LIF (EC-LIF). La difficulté de cette voie réside dans le marquage des deux peptides synthétiques par des agents fluorophores. Parmi les cinq marqueurs initialement choisis seuls trois d'entre eux ont donné des résultats permettant d'envisager une poursuite de nos investigations. Il est en effet fréquent d'obtenir après ces réactions de marquage et analyse en électrophorèse, des électrophérogrammes présentant une multitude de pics provenant des différents produits de synthèse et des impuretés présentes initialement dans les solutions commerciales de marqueurs. Cette situation complique, voire rend parfois même impossible l'attribution des pics. Parmi les trois marqueurs retenus, deux sont fluorogènes : le FQ et le NDA, et le troisième est fluorescent le TAMRA-SE. Les réactions de dérivaison ont été optimisées par des suivis de réactions en EC et des analyses en spectrométrie de masse. Cette étude montre qu'il faut incuber les peptides dans un mélange contenant un solvant organique et un tampon borate alcalin avec un excès important de marqueur. Aucune réaction de marquage après optimisation ne permet de détecter le peptide non marqué en fin de réaction comme l'atteste la spectrométrie de masse MALDI-TOF (une trace a été visualisée en spectrométrie de masse ESI-trappe qui concerne la réaction de marquage avec le FQ).

Une adaptation du bloc de détection de l'une des électrophorèses a été réalisée pour pouvoir exciter les peptides marqués dont les longueurs d'onde d'excitation et d'émission sont incompatibles avec le système présent à l'origine sur cette instrumentation commerciale. Cette

modification nous a permis ensuite de coupler l'électrophorèse capillaire avec deux sources laser émettant à 442 et 532 nm nécessaires à ces analyses.

Le marquage de ces peptides est relativement rapide avec des temps de réaction inférieurs ou égaux à 15 minutes. Mais ils peuvent donner lieu à des peptides mono ou multimarqués, ce qui provoquerait soit des élargissements de pics soit l'apparition de pics propres à ces espèces sur les électrophérogrammes obtenus en EC-LIF. Concernant les analyses des mélanges équimolaires de peptides synthétiques « natif » et « mutant », elles ont été faites en mode contre-électroosmotique avec des tampons dont les valeurs de pH étaient comprises entre 7 et 8 en fonction de la nature chimique du marqueur. L'optimisation des séparations en EC-LIF montre que la nature chimique même des espèces introduites pour la préparation du tampon de séparation a un impact très important sur la qualité de l'analyse.

La validation analytique des méthodes développées montre que les méthodologies en EC-LIF sont justes, linéaires et répétables pour les peptides marqués au FQ et au NDA. Le marquage au NDA propose les meilleures limites de détection et quantification mais elles restent supérieures à celles obtenues en détection spectrométrique d'absorption. Concernant l'étude des peptides marqués par le TAMRA-SE, nous les avons également analysés sur un ensemble instrumental dédié à la microfluidique. Les résultats, tant pour les peptides seuls que pour le mélange de peptides natif et mutant, sont décevants d'un point de vue analytique. L'optimisation analytique sur ces systèmes miniaturisés nécessiterait un investissement en temps bien plus important pour pouvoir atteindre la qualité des résultats obtenus en électrophorèse capillaire conventionnelle. Néanmoins ces quelques résultats valident l'installation et nos choix en termes d'instrumentation pour ce poste qui est maintenant à la disposition des autres chercheurs du laboratoire.

Concernant les perspectives de ces travaux de recherches, il faut consolider les étapes préparatives et notamment démultiplier les analyses des fluides biologiques issus des patients comme le sérum. Il est donc souhaitable de renforcer les interactions entre les biochimistes et les cliniciens de l'hôpital et les analystes de l'Université. Ce travail de fond devra à court terme être standardisé et donc validé analytiquement concernant les protocoles de prélèvement, de séparation et digestion sur gel, pour finalement réaliser et interpréter l'analyse électropho-

rétiq. Les mesures en spectrométrie de masse qui nous ont permis d'apporter des preuves solides en termes d'identification doivent également perdurer. C'est d'ailleurs, l'une des acquisitions récentes de l'équipe du Professeur Taverna qui dispose d'une électrophorèse capillaire couplée avec la spectrométrie de masse. L'idée ici est de pouvoir reprendre les résultats obtenus avec la carte peptidique et de généraliser nos analyses à d'autres mutations que la TTR Thr49Ala ici étudiée.

Un autre objectif, également entamé dans ce travail, concerne notre souhait de fournir au monde hospitalier un dispositif analytique simple et compact pour effectuer un suivi régulier de l'évolution des patients atteints de la polyneuropathie amyloïde familiale. Le poste d'analyse sur puce, installé dans le cadre de ces travaux, représente un ensemble instrumental complexe et performant d'un point de vue analytique. Ce dernier est adaptable et adapté à la recherche académique pour mettre au point une analyse quantitative et qualitative. Pourtant il est exclu de transférer ce type d'instrumentation qui requiert un personnel spécialisé dans un milieu hospitalier. Il est donc nécessaire dans un premier temps de développer des méthodologies analytiques robustes et fiables avec une réelle réflexion concernant sa transposition vers le monde médical.

D'un point de vue personnel ces quatre années ont été intenses en termes de recherche expérimentale. J'ai également vécu une aventure humaine enrichissante au sein de l'institut Galien Paris sud. Je retire une certaine fierté concernant ma contribution à l'obtention de la mention « projet phare » du projet ANR DIMIPOLE. Les exigences du métier de chercheur sont aujourd'hui, dans mon esprit, bien différentes de celle que j'imaginai avant de me lancer dans ce doctorat. Au-delà des aptitudes techniques, la communication et le travail d'équipe représentent une part essentielle de ce métier. Je souhaite à l'avenir augmenter ma culture scientifique et mes capacités en termes de communication tout en conservant la rigueur des chimistes analystes qui me seront nécessaires dans ma vie professionnelle future.

Annexe A

Procédures d'analyse SDS-PAGE, de digestion en gel et récapitulatif des résultats de MS

I Analyse de la TTR sur gel de polyacrylamide en présence de SDS

Préparation des tampons et des réactifs pour la migration

- ▷ Tampon Tris 1 M pH= 6,8 : 30,3g de Tris (PM=121,14)+200 ml H₂O. Ajuster le pH avec du HCl 37%. Puis ajouter H₂O QSP 250 mL. Stocker à +4°C
- ▷ Tampon Tris 1 M pH= 8,8 : 60,6g de Tris+400 ml H₂O. Ajuster le pH avec du HCl 37%. Puis ajouter H₂O QSP 400 mL. Stocker à +4°C
- ▷ Tampon électrophorèse 10X (pH= 8,6) : 30 g de Tris+ 145 g de glycine+ H₂O QSP 1L (pH à vérifier après quelques jours à +4°C)
- ▷ Solution d'Ammonium persulfate (APS) 10% : 1 g dans 10 mL H₂O à fractionner en 11 aliquots de 900 µL à placer à -20°C
- ▷ 6X sample buffer (bleu) (SB6X) :

	Pour 10 mL	Composition 6X
Glycérol 100%	6 mL	60% glycérol
Tris 1M pH= 6,8	3 mL	300 mM Tris pH= 6,8
EDTA 0,25 M (2,365 g/25 mL)	240 µL	6mM EDTA
SDS	1,2 g	12% SDS
2-mercaptoéthanol	600 µL	864 mM 2-mercaptoéthanol
Bleu de bromophénol	Quelques grains	0,05% bleu de bromophénol

Aliquoter par 200 µL et conserver à -20°C

Préparation d'un gel de polyacrylamide

- ▷ Préparer le tampon de migration 1X à partir du tampon électrophorèse 10X conservé en chambre froide : 100 mL de tampon de migration 10X + 10 mL SDS 10% + H₂O QSP 1L
- ▷ Monter le système de coulage du gel. Choisir les spacers de 1 mm. Vérifier l'absence de fuite par ajout d'eau distillée. Enlever l'eau distillée et assécher avec du papier Whatman
- ▷ Pour le gel de séparation (15%), mélanger dans l'ordre :
 1. 15 mL de Tris 1 M pH=8,8
 2. 15 mL de solution Acrylamide-Bis acrylamide 37,5/1 (solution 40%)
 3. 9,8 mL d' H 2 O
 4. 200 µL de SDS 20%
 5. 600 µL d'APS 10%
 6. 40 µL de TEMED

Les deux dernières solutions sont à ajouter au dernier moment. Il faut bien homogénéiser par retournement doux afin d'éviter les bulles.

- ▷ Couler immédiatement le gel de séparation entre deux plaques en verre aux $\frac{3}{4}$ de la hauteur et ajouter délicatement 2 mL de butanol saturé d'eau pour le haut du gel. Garder le reste de gel afin de vérifier la prise en masse. Laisser polymériser 30 min à 1 h.

- ▷ Attendre la prise en masse du gel de séparation et enlever le butanol par retournement. Rincer plusieurs fois à l'eau distillée pour enlever le butanol, puis enlever l'eau distillée et assécher avec une bande de papier Whatman
- ▷ Pour le gel de concentration aussi appelé « stacking gel » (4%), mélanger dans l'ordre :
 1. 1500 μL de Tris 1 M pH=6,8
 2. 1360 μL de solution Acrylamide-Bisacrylamide 37,5/1 (solution 40%)
 3. 9 mL d' H₂O
 4. 60 μL de SDS 20%
 5. 200 μL d'APS 10%
 6. 40 μL de TEMED

Les deux dernières solutions sont à ajouter au dernier moment. Il faut bien homogénéiser par retournement doux afin d'éviter les bulles.

Couler immédiatement le gel de concentration entre les deux plaques jusqu'en haut et aussitôt glisser le peigne correspondant à l'espacement des plaques. Garder le reste de gel pour vérifier la prise en masse. Laisser polymériser 20 min. Juste avant migration, retirer délicatement le peigne sous un jet d'eau doux pour maintenir les puits en place.

Préparation des échantillons

Répartir la solution protéique à faire migrer en autant d'aliqots que de puits à faire migrer. Ajouter dans chaque aliqot, une cinquième du volume de SB6X. Vortexer puis centrifuger brièvement. Percer un petit trou dans le capuchon de chaque tube. Faire bouillir 12 min au bain marie sec. Centrifuger brièvement.

Migration

- ▷ Monter les plaques sur le système de migration.
- ▷ Déposer les échantillons à l'aide de cônes à pointe effilée.
- ▷ Déposer le marqueur de poids moléculaire de part et d'autre du gel. Pour la TTR le marqueur choisi est Prostaïned Protein Ladder 06P60111 de Euromedex

- ▷ Relier le système à un générateur et faire migrer à 50mA (100mA si deux gels en parallèle)

Après la migration

Démouler le gel d'acrylamide, découper afin d'éliminer le gel de concentration. Séparer dans deux bacs différents les parties du gel qui seront colorés par le bleu de Coomassie.

Rincer les gels 3 fois pendant 5 minutes à l'eau déionisée pour enlever le SDS. Les parties du gel à colorer sont recouvertes de bleu de Coomassie pendant 1h puis décolorées à l'eau distillée pendant 45min au minimum. Découper le gel et le placer dans un tube Falcon stérile.

II Digestion trypsique en gel de la TTR

- ▷ Préparation du gel

1. Excision des bandes découpées en carrés de $\leq 1 \text{ mm}^2$.
2. Dépôt des carrés dans un tube de 1,5 mL.
3. Lavage 5 min avec 200 μL de bicarbonate d'ammonium 0,1 M pH 8,5.
4. Élimination de la phase liquide.
5. Passage du tube au vortex.
6. Centrifugation du tube.
7. Lavage 5 min avec 200 μL d'acétonitrile.
8. Élimination de la phase liquide.
9. Répéter les étapes 3 à 6, deux fois supplémentaires.

- ▷ Digestion à la trypsine et extraction des peptides

1. Ajouter 196 μL de bicarbonate d'ammonium 0,1 M pH 8,5.
2. Ajouter un volume de trypsine à 0,4 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ de façon à obtenir un rapport enzyme/substrat égal à 1/10
3. Passer le tube au vortex.
4. Centrifuger le tube.

5. Incuber à 37°C toute une nuit.
6. Passer le tube au vortex.
7. Centrifuger le tube.
8. Récupérer la phase liquide.
9. Ajouter 200 µL de solution d'acétonitrile/eau 70/30 0,1% acide formique.
10. Laisser 5 min.
11. Passer du tube au vortex.
12. Centrifuger du tube.
13. Récupérer la phase liquide et la mettre avec celle de l'étape 8.
14. Ajouter 200 µL d'acétonitrile.
15. Laisser 5 min.
16. Passer le tube au vortex.
17. Centrifuger le tube
18. Récupérer la phase liquide et la mettre avec celle des étapes 8 et 13.
19. Évaporer le tube à sec au SpeedVac
20. Reprendre le culot dans 30 µL de solution d'acétonitrile/eau 70/30 0,1% acide formique.

III Tableau récapitulatif des analyses en spectrométrie de masse de l'échantillon de TTR issu de patient

Masse [M+H] ⁺ théorique	Séquence	MALDI-TOF		ESI-LTQ-Orbitrap		Masse [M+nH/n] ⁺⁺
		CHCA (1µL)	6-ATT (1µL)	Infusion (5µL)	LC-MS/MS (10µL)	
3830,7555	<u>A</u> ADDTWEFPFASGKTSESGELHGLTTEEEFVEGIYK	*	*	*	*	*
3140,5157	TSESGELHGLTTEEEFVEGIYKVEIDTK	✓ (en +)	✓ (en -)	*	*	*
3046,6389	LLLLCLAGLVFVSEAGPTGTESTKCPMLVK	*	*	*	*	*
3015,4747	SYWKALGISPFHEHAEVVFTANDSGPR	*	*	*	*	*
2957,5586	MASHRLLLLCLAGLVFVSEAGPTGTGESK	*	*	*	*	*
2607,3062	ALGISPFHEHAEVVFTANDSGPRR	*	*	*	*	*
2645,3821	<u>RYTIAALLSPYSYSTTAVV</u> TNPKE	✓✓ (en +)	✓✓ (en +) ✓ (en -)	*	✓✓✓	882,4673 (2+) 1323,1959 (3+)
2516,3395	<u>RYTIAALLSPYSYSTTAVV</u> TNPKE	✓ (en +)	✓ (en +)	*	✓✓✓	1258,6742 (2+) 839,4511 (3+)
2489,2810	<u>YTIAALLSPYSYSTTAVV</u> TNPKE	*	✓ (en +/-)	*	✓✓✓	1245,1431 (2+) 830,4328 (3+)
2455,1510	TSESGELHGLTTEEEFVEGIYK	*	*	*	✓✓✓	1228,0809 (2+) 819,0562 (3+)
2451,2051	ALGISPFHEHAEVVFTANDSGPR	✓✓✓ (en +)	✓✓✓ (en +/-)	✓✓✓	✓✓✓	817,7401 (3+) inf. 1226,1091 (2+) 817,7401 (3+)
2375,2890	LLLLCLAGLVFVSEAGPTGTGESK	*	*	*	*	*
2360,2384	YTIAALLSPYSYSTTAVVTNPKE	*	✓ (en +)	*	✓✓✓	1180,6226 (2+) 787,4175 (3+)
2041,0488	<u>ALLSPYSYSTTAVV</u> TNPKE	*	*	*	✓✓✓	1021,0296 (2+)
1912,0062	<u>ALLSPYSYSTTAVV</u> TNPKE	*	*	*	✓✓✓	956,5058 (2+)
2020,1450	VLDAVRGSPAINVAVHVF	*	*	*	*	*
1522,7172	KAADDTWEFPFASGK	*	*	*	✓✓✓	761,8644 (2+)-
1394,6222	AADDTWEFPFASGK	*	*	*	✓✓✓	1393,6175 (2+)
1494,8539	GSPAINVAVHVF	*	*	*	*	*
1366,7589	GSPAINVAVHVF	✓✓✓ (en +)	✓✓✓ (en +) ✓✓ (en -)	*	✓✓✓	683,8862 (2+) 456,2580 (3+)
1343,7537	CPLMKVLDVAVR	*	*	*	*	*
1222,7055	PAINVAVHVF	*	*	*	✓✓✓	408,2399(3+)
1268,6521	VEIDTKSYWK	*	*	*	*	*
704,3825	VEIDTK	✓ (en +)	*	✓	*	704,3830 (1+)
690,3677	CPLMK	*	*	*	*	*
672,4039	VLDVAVR	*	*	*	*	*
601,2875	MASHR	*	*	*	*	*
583,2875	SYWK	*	*	*	*	*

Italique: semi-tryptique

Souligné: 1 clivage manqué

Souligné: 2 clivages manqués

Italique+souligné: 1 clivage manqué + semi-tryptique

IV Analyse NanoLC-MS/MS

Les analyses en NanoLC-MS/MS ont été effectuées sur un système chromatographique à double gradient UltiMate 3000 (Dionex).

Dans ce qui suit, le solvant A est un mélange eau/acétonitrile/acide formique, (98/2/0.1 v/v/v) et le solvant B est un mélange de eau/acétonitrile/acide formique, (20/80/0.1, v/v/v). Environ 1 à 3 pmol de l'échantillon de TTR a été théoriquement injecté sur une pré-colonne C18 (Acclaim, PepMap C18 5 mm de longueur × 300 µm ID, taille 5 µm, 100 Å de porosité,

Dionex). Après élimination des sels pendant 5 min avec le solvant A, la séparation des peptides a été réalisée sur une colonne capillaire C18 (Acclaim PepMap C18, 15 cm de longueur \times 75 μm DI \times 3 μm de taille de particule la porosité 100 Å, Dionex avec un gradient à partir de 100 % de solvant A, rampe de 70 % de solvant B sur 50 min, puis de 100% de solvant B en 2 min (tenue 10 min) , et enfin la diminution de 100% de solvant A en 3 min . La colonne est finalement ré-équilibrée avec 100% de solvant A pendant 15 min. L'éluant LC a été pulvérisée dans l'instrument avec une pointe d'émetteur de verre (Pico-pointe, FS360-50-15- CE-20 - C10.5, New Objective, Woburn, MA).

Annexe B

Protocoles et outils

I Protocole de marquage des peptides par le NDA

Dans les conditions optimales :

- ▷ 50µL de peptide (0.2mM)
- ▷ 150µL de tampon borate pH= 9.5, 70mM.
- ▷ 100µL de KCN à 4mM dans le tampon borate pH= 9.5, 70mM
- ▷ 100µL NDA 4mM dans le méthanol

Lors des différentes optimisations, les concentrations des solutions ont été modifiées

II Protocole de dessalage des peptides par le NDA

Avant de faire ces analyses en MALDI-TOF, un dessalage des solutions a été effectué, en utilisant un embout Zip-Tip C18 (Millipore, USA). Tout d'abord, un lavage de la phase avec de l'acétonitrile (ACN) à trois reprises. Ensuite un conditionnement est fait par une solution d'eau acidifiée (0.1%TFA). Puis, un chargement de la phase par l'échantillon est effectué en faisant une dizaine d'aspirations refoulements dans la solution du peptide marqué. Ensuite, un lavage de la phase est effectué afin de dissoudre les sels présents dans l'échantillon, en utilisant de l'eau acidifiée (1%TFA). Enfin, les peptides marqués sont élués en utilisant une solution d'eau/ACN 35/65.

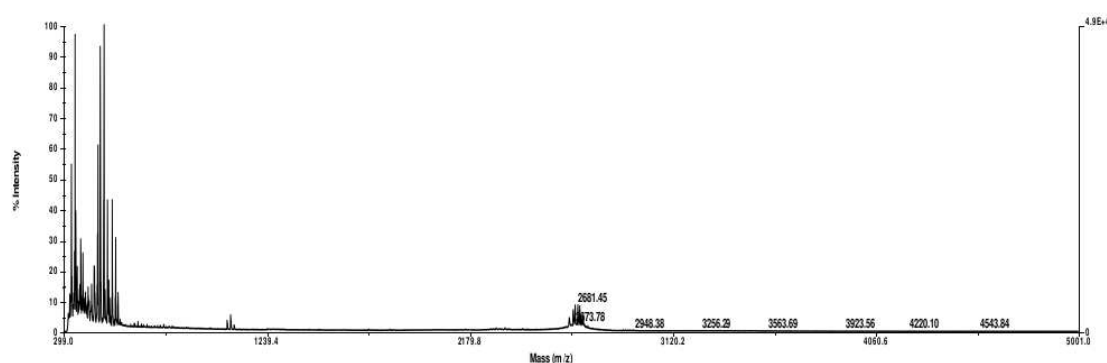
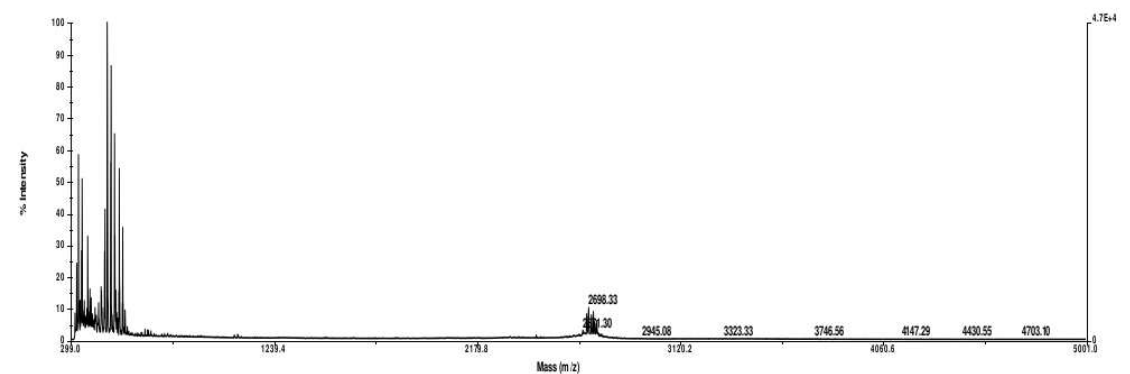
III Protocole de marquage des peptides par le FQ

100 μ l de FQ dans le méthanol (10mM) sont ajoutés à 50 μ L de peptide 0,2mM dans le tampon borate (pH=9, 40mM). A ce mélange on ajoute 50 μ L de KCN 10mM dans le borate (pH=9.3, 2.5mM). Le tout est ensuite mis dans un bain marie pendant 15 min à 55°C à l'abri de la lumière (conditions optimales). Lors de l'optimisation de la méthode de marquage, ce protocole a été modifié en faisant varier le temps et la température d'incubation : de 5 à 30min et de 45°C à 65°C.

Dans le cas où on dérive un mélange : 100 μ l de FQ dans le méthanol (10mM) sont ajoutés à 25 μ L de PN mélangée à 25 μ L de PM (les deux solutions sont à 0,2mM dans le tampon borate pH=9, 40mM). A ce mélange on ajoute 50 μ L de KCN 10mM dans le borate (pH=9.3, 2.5mM). Ce mélange est incubé pendant 15 min à 55°C.

Pour la linéarité, les mélanges ont été effectués avec le même protocole décrit précédemment (mêmes volumes) mais en faisant varier la concentration du peptide de 0.1 à 0.5mM.

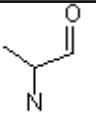
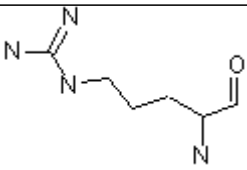
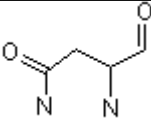
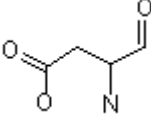
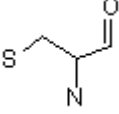
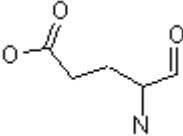
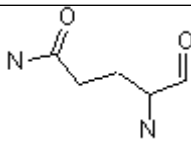
IV Spectre de masse MALDI-TOF entre 300 et 5000 m/z


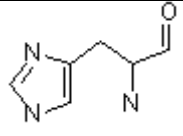
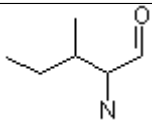
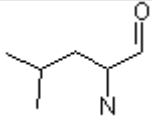
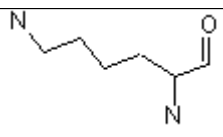
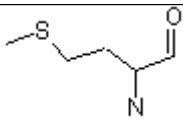
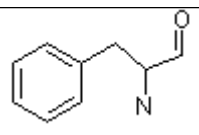
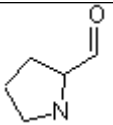
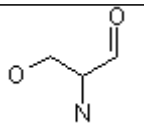


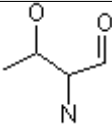
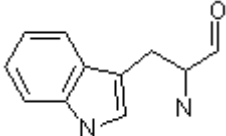
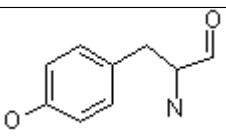
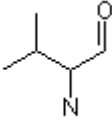
Analyse en spectrométrie de masse du PN dérivé par le FQ (a) PM dérivé par le FQ (b) Conditions : matrice CHCA à 10mg/ mL dans acétonitrile/eau 50/ 50 (v/v) 0,1% TFA. Echantillon : 1 μ L de solution dérivée de peptide à 200 mM + 1 μ L de matrice. Mode réflecteur. Délai d'extraction : 450 nsec

V Tableau de calcul de masse des peptides résidus d'acides aminés

Les données dans ce tableau correspondent aux résidus d'acides aminés. Pour le calcul de la masse d'un peptide ou d'une protéine neutre, la somme des masses des résidus ainsi que les masses des groupes de terminaison (par exemple H à l'extrémité N-terminale et OH en position C-terminale) doit être faite.

Résidu	Code à 1 lettre	Masse mono-isotopique	Masse moyenne	Structure
Alanine C_3H_5NO	A	71,03712	71,08	
Arginine $C_6H_{12}N_4O$	R	156,10112	156,19	
Asparagine $C_4H_6N_2O_2$	N	114,04293	114,10	
Acide Aspartique $C_4H_5NO_3$	D	115,02695	115,09	
Cysteine C_3H_5NOS	C	103,00919	103,14	
Acide Glutamique $C_5H_7NO_3$	E	129,04260	129,12	
Glutamine $C_5H_8N_2O_2$	Q	128,05858	128,13	

Glycine C_2H_3NO	G	57,02147	57,05	
Histidine $C_6H_7N_3O$	H	137,05891	137,14	
Isoleucine $C_6H_{11}NO$	I	113,08407	113,16	
Leucine $C_6H_{11}NO$	L	113,08407	113,16	
Lysine $C_6H_{12}N_2O$	K	128,09497	128,17	
Methionine C_5H_9NOS	M	131,04049	131,19	
Phenylalanine C_9H_9NO	F	147,06842	147,18	
Proline C_5H_7NO	P	97,05277	97,12	
Serine $C_3H_5NO_2$	S	87,03203	87,08	

Thréonine $C_4H_7NO_2$	T	101,04768	101,10	
Tryptophane $C_{11}H_{10}N_2O$	W	186,07932	186,21	
Tyrosine $C_9H_9NO_2$	Y	163,06333	163,18	
Valine C_5H_9NO	V	99,06842	99,13	

VI Dérivation des peptides avec FITC

45 mL de FITC (2,5 mM) dilué dans l'acétone ont été ajoutés à 450 mL de solution de peptide à 0,2 mM en tampon borate (pH 9, 40 mM). La solution obtenue est alors laissée dans l'obscurité une nuit à température ambiante.

VII Dérivation des peptides avec NHS fluoresceine

Une solution de NHS Fluoresceine dans le DMSO est préparée à 2mol/L. Les peptides sont préparés à une concentration de 8.14 mol/L dans un tampon borate pH = 8.5, 50 mM. A 200 μ L de peptide est ajouté 1.2 μ L de la solution de NHS Fluoresceine. La solution obtenue est alors laissée dans l'obscurité 1h à température ambiante.

VIII Rinçage du capillaire pour l'analyse des solutions de peptides marqués par le NHS-Fluoresceine

Méthode 1				Méthode 2			
Opération	Inlet	Outlet	Durée	Opération	Inlet	Outlet	Durée
Rinçage	NaOH (1M)	Poubelle	3 min	Rinçage	NaOH (1M)	Poubelle	5 min
Rinçage	Eau	Poubelle	5 min	Rinçage	Eau	Poubelle	5 min
Rinçage	Tampon	Poubelle	5 min	Rinçage	DMSO	Poubelle	5 min
-	-	-	-	Rinçage	Eau	Poubelle	5 min
-	-	-	-	Rinçage	Tampon	Poubelle	5 min
Injection	Échantillon	Poubelle	10 sec	Injection	Échantillon	Poubelle	10 sec
Séparation	Tampon	Tampon	40min	Séparation	Tampon	Tampon	40 min
Rinçage	Eau	Poubelle	2 min	Rinçage	Eau	Poubelle	5 min

Méthodes de rinçage du capillaire pour l'analyse EC LIF des solutions de peptides incubées par le NHS-fluoresceine

IX Dérivation des peptides avec TAMRA-SE

17,2µl de solution de TAMRA-SE dans du DMSO sont ajoutés à 40 µl de solution de peptide dans du tampon borate. A ce mélange, on ajoute 20 µl de tampon borate. La solution est ensuite incubée pendant 1h sous agitation vigoureuse à température ambiante.

X Rinçages de la puce

Le préconditionnement et les rinçages de la puce en verre se font comme suit :

- ▷ 10 min Na OH 1M
- ▷ 5 min eau
- ▷ 10 min NaOH 0.1 M
- ▷ 5 min eau
- ▷ 10 min Tampon

En cas de fluorescence résiduelle des séries de rinçages de 10 minutes sont ajoutées, jusqu'à disparition de la fluorescence.

Bibliographie

- [1] A. Jaccard et J-P. Femand : Amyloses. *EMC-Hématologie*, 1:46–58, 2004. I, 1.1, I
- [2] Gilles Grateau, Jérôme Verine, Marc Delpech et Madeleine Ries : Les amyloses, un modèle de maladie du repliement des protéines. *M/S : médecine sciences*, 21(6-7):627–633, 2005. I
- [3] N. Magy : Amylose AA : données actuelles sur la physiopathologie. *La Revue de Médecine Interne*, 25(2):129–134, 2004. I
- [4] N. Magy-Bertrand : Les amyloses à transthyrétine. *La Revue de Médecine Interne*, 28(5): 306–313, 2007. I
- [5] Christopher P. Jaronec, Cait E. MacPhee, Nathan S. Astrof, Christopher M. Dobson et Robert G. Griffin : Molecular conformation of a peptide fragment of transthyretin in an amyloid fibril. *PNAS*, 99(26):16748–16753, 2002. I
- [6] Rabia Sarroukh, Erik Goormaghtigh, Jean-Marie Ruyschaert et Vincent Raussens : ATR-FTIR : a “rejuvenated” tool to investigate amyloid proteins. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, 1828(10):2328–2338, 2013. I
- [7] Melanie R Nilsson : Techniques to study amyloid fibril formation in vitro. *Methods*, 34(1):151–160, 2004. I
- [8] Laure-Hélène Noël : Amylose systémique : diagnostic en pratique. *Néphrologie & Thérapie*, 6(2):88–96, 2010. I

- [9] Petrea Frid, Sergey V. Anisimov et Natalija Popovic : Congo red and protein aggregation in neurodegenerative diseases. *Brain Research Reviews*, 53(1):135–160, 2007. I
- [10] Charlotte Nerelius, Michael Fitzen et Jan Johansson : Amino acid sequence determinants and molecular chaperones in amyloid fibril formation. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 396(1):2–6, 2010. 1.1
- [11] Maarit Tanskanen, Terhi Peuralinna, Tuomo Polvikoski, Irma-Leena Notkola, Raimo Sulkava, John Hardy, Andrew Singleton, Sari Kiuru-Enari, Anders Paetau, Pentti J. Tienari et Liisa Myllykangas : Senile systemic amyloidosis affects 25% of the very aged and associates with genetic variation in *alpha2-macroglobulin* and *tau* : A population-based autopsy study. *Annals of Medicine*, 40(3):232–239, 2008. II, II.3.1
- [12] Elvin A. Kabat, Dan H. Moore et Harold Landow : AN ELECTROPHORETIC STUDY OF THE PROTEIN COMPONENTS IN CEREBROSPINAL FLUID AND THEIR RELATIONSHIP TO THE SERUM PROTEINS 1. *J Clin Invest*, 21(5):571–577, 1942. II.1
- [13] H. E. Schultze, M Schönenberger et G Schwick : Über ein präalbumin des menschlichen serums. pages 267–84, 1956. II.1
- [14] Yoshikazu Kanda, DeWitt S. Goodman, Robert E. Canfield et Francis J. Morgan : The amino acid sequence of human plasma prealbumin. *J. Biol. Chem.*, 249(21):6796–6805, 1974. II.1, 1.2
- [15] D. S. Goodman, T. Peters, J. Robbins et G. Schwick : Prealbumin becomes transthyretin. nomenclature committee-IUB and JCBN newsletter. *J Biol Chem*, 256:12–4, 1981. II.1
- [16] Margaret R. Wallace, Susan L. Naylor, Barbara Kluge-Beckerman, George L. Long, Lisa McDonald, Thomas B. Shows et Merrill D. Benson : Localization of the human prealbumin gene to chromosome 18. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 129(3):753–758, 1985. II.1

-
- [17] Masamitsu Kanai, Amiram Raz et DeWitt S. Goodman : Retinol-binding protein : the transport protein for vitamin a in human plasma. *J Clin Invest*, 47(9):2025–2044, 1968. II.1
- [18] Steven M. Johnson, Stephen Connelly, Colleen Fearn, Evan T. Powers et Jeffery W. Kelly : The transthyretin amyloidoses : From delineating the molecular mechanism of aggregation linked to pathology to a regulatory-agency-approved drug. *Journal of Molecular Biology*, 421(2–3):185–203, 2012. II.1
- [19] G. Féraud et Y. Ingenbleek : Place actuelle de la transthyréine en biologie clinique. *Annales de Biologie Clinique*, 61(3):358–362, 2003. II.1
- [20] Mario Nuvolone, Laura Obici et Giampaolo Merlini : Transthyretin-associated familia amyloid polyneuropathy- current and emerging therapies. 2012. II.1, II.3
- [21] Gerhard Schreiber et Samantha J. Richardson : The evolution of gene expression, structure and function of transthyretin. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B : Biochemistry and Molecular Biology*, 116(2):137–160, 1997. II.1
- [22] J.A. Hamilton et M.D. Benson : Transthyretin : a review from a structural perspective. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 58(10):1491–1521, 2001. II.1
- [23] Merrill D. Benson et John C. Kincaid : The molecular biology and clinical features of amyloid neuropathy. *Muscle and Nerve*, 36(4):411–423, 2007. 1.3
- [24] Shreena Shah, Jason Dungu et Simon William Dubrey : Senile cardiac amyloidosis : an underappreciated cause of heart failure. *BMJ Case Rep*, 2013, 2013. II.2
- [25] Lawreen Heller Connors, Amareth Lim, Tatiana Prokaeva, Violet A. Roskens et Catherine E. Costello : Tabulation of human transthyretin (TTR) variants, 2003. 2003. II.3
- [26] Hilal A Lashuel et Peter T Lansbury : Are amyloid diseases caused by protein aggregates that mimic bacterial pore-forming toxins ? *Quarterly reviews of biophysics*, 39(02):167–201, 2006. 1.4
-

- [27] Corino Andrade : A peculiar form of peripheral neuropathy familiar atypical generalized amyloidosis with special involvement of the peripheral nerves. *Brain*, 75(3): 408–427, 1952. II.3
- [28] S Araki, S Mawatari, M Ohta, A Nakajima et Y Kuroiwa : Polyneuritic amyloidosis in a japanese family. *Arch Neurol*, 18(6):593–602, 1968. II.3
- [29] R Andersson : Familial amyloidosis with polyneuropathy. a clinical study based on patients living in northern sweden. *Acta Med. Scand. Suppl.*, 590:1–64, 1976. II.3
- [30] David Adams, Michel Slama et Didier Samuel : Transplantation hépatique dans les neuropathies amyloïdes familiales. *La Presse Médicale*, 39(1):17–25, 2010. II.3.1, a)
- [31] Violaine Planté-Bordeneuve et Gerard Said : Familial amyloid polyneuropathy. *The Lancet Neurology*, 10(12):1086–1097, 2011. II.3.1
- [32] Kunio Li, Robert A. Kyle et Dyck Peter J. : Immunohistochemical characterization of amyloid proteins in sural nerves and clinical associations in amyloid neuropathy. *American Journal of Pathology*, 141(1), 1992. II.3.2
- [33] S. Fujihara : Differentiation of amyloid fibril proteins in tissue sections two simple and reliable histological methods applied to fifty-one cases of systemic amyloidosis. *Pathology International*, 32(5):771–782, 1982. II.3.2
- [34] Violaine Planté-Bordeneuve, A Ferreira, T Lalu, Cécile Zaros, Catherine Lacroix, David Adams et Gérard Said : Diagnostic pitfalls in sporadic transthyretin familial amyloid polyneuropathy (ttr-fap). *Neurology*, 69(7):693–698, 2007. II.3.2
- [35] Lawreen Heller Connors, Thomas Ericsson, James Skare, Lee Anna Jones, W David Lewis et Martha Skinner : A simple screening test for variant transthyretins associated with familial transthyretin amyloidosis using isoelectric focusing. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Basis of Disease*, 1407(3):185–192, 1998. II.3.2

- [36] Shinichi Ikegawa, Sumio Tanase, Shukuro Araki et Yoshimasa Morino : Quantitative detection of a variant prealbumin associated with type 1 familial amyloidotic polyneuropathy (japanese type) by high performance liquid chromatography. *Clinica chimica acta*, 167(2):165–172, 1987. II.3.2
- [37] Yukio Ando, Per-Ingvar Ohlsson, Ole Suhr, Nils Nyhlin, Taro Yamashita, Gösta Holmgren, Åke Danielsson, Ola Sandgren, Makoto Uchino et Masayuki Ando : A new simple and rapid screening method for variant transthyretin-related amyloidosis. *Biochemical and biophysical research communications*, 228(2):480–483, 1996. II.3.2
- [38] R. Théberge, L. H. Connors, M. Skinner et C. E. Costello : Detection of transthyretin variants using immunoprecipitation and matrix-assisted laser desorption/ionization bioreactive probes : a clinical application of mass spectrometry. *Journal the American Society for Mass Spectrometry*, 11(2), 2000. II.3.2
- [39] D. Dogruel, P. Williams et R. W. Nelson : Rapid tryptic mapping using enzymically active mass spectrometer probe tips. *Analytical Chemistry*, 67(23):4343–4348, 1995. II.3.2
- [40] C.J. Klein, J.A. Vrana, J.D. Theis et al : MAss spectrometric–based proteomic analysis of amyloid neuropathy type in nerve tissue. *Arch Neurol*, 68(2):195–199, 2011. II.3.2
- [41] R. Théberge, L. H. Connors, J. Skare, M. Skinner et C. E. Costello : Characterization of transthyretin mutants from serum using immunoprecipitation, lc/electrospray ionization and matrix assisted laser desorption/ionization mass spectrometry. *Anal. Chem.*, 71:452–459, 1999. II.3.2
- [42] R. Théberge et al. : Proceedings of the 46th conference on mass spectrometry and allied topics. page 156. Orlando, FL, 1998. II.3.2
- [43] Taro Yamashita, Yukio Ando, Ole B. Suhr, Masaaki Nakamura, Naomi Sakashita, Per-Ingvar Ohlsson, Hisayasu Terazaki, Konen Obayashi, Makoto Uchino et Masayuki Ando : A new diagnostic procedure to detect unknown transthyretin (TTR) muta-

- tions in familial amyloidotic polyneuropathy (FAP). *Journal of the Neurological Sciences*, 173(2):154–159, 2000. II.3.2
- [44] Jacques-Eric Gottenberg, Florence Merle-Vincent, Fabrice Bentaberry, Yannick Allanore, Francis Berenbaum, Bruno Fautrel, Bernard Combe, Antoine Durbach, Jean Sibilia, Maxime Dougados et Xavier Mariette : Anti-tumor necrosis factor α therapy in fifteen patients with aa amyloidosis secondary to inflammatory arthritides : A followup report of tolerability and efficacy. *Arthritis Rheum*, 48:2019–2024, 2003. II.3.2
- [45] David Adams, Didier Samuel et Michel Slama : Traitement des neuropathies amyloïdes héréditaires. *La Presse Médicale*, 41(9, Part 1):793–806, 2012. II.3.3, 1.7, 1.8
- [46] Gösta Holmgren, Lars Steen, Jan Ekstedt, Carl-Gustav Groth, B.-G. Ericzon, Siv Eriksson, Oluf Andersen, Ingvar Karlberg, Gunnela Nordén, Masamitsu Nakazato, Philip Hawkins, Suzanne Richardson et Mark Pepys : Biochemical effect of liver transplantation in two swedish patients with familial amyloidotic polyneuropathy (FAP-met30). *Clinical Genetics*, 40(3):242–246, 1991. a)
- [47] Gustaf Herlenius, Henryk E. Wilczek, Marie Larsson et Bo-Göran Ericzon : Ten years of international experience with liver transplanta... : Transplantation. *Transplantation*, 77(1):64–71, 2004. a)
- [48] Merrill D. Benson : Liver transplantation and transthyretin amyloidosis. *Muscle and Nerve*, 47(2):157–162, 2013. a)
- [49] Haruki Koike, Rina Hashimoto, Minoru Tomita, Yuichi Kawagashira, Masahiro Iijima, Tomohiko Nakamura, Hirohisa Watanabe, Hideya Kamei, Tetsuya Kiuchi et Gen Sobue : Impact of aging on the progression of neuropathy after liver transplantation in transthyretin Val30Met amyloidosis. *Muscle & Nerve*, 46(6):961–964, 2012. a)
- [50] Yuki Ohya, Sadahisa Okamoto, Masayoshi Tasaki, Mitsuharu Ueda, Hirofumi Jono, Konen Obayashi, Kazuhisa Takeda, Hideaki Okajima, Katsuhiko Asonuma, Ryuhei Hara,

- Hidenobu Tanihara, Yukio Ando et Yukihiko Inomata : Manifestations of transthyretin-related familial amyloidotic polyneuropathy : Long-term follow-up of Japanese patients after liver transplantation. *Surg Today*, 41(9):1211–1218, 2011. a)
- [51] Ana-Paula Barreiros, Felix Post, Maria Hoppe-Lotichius, Reinhold P. Linke, Christian F. Vahl, Hans-Joachim Schäfers, Peter R. Galle et Gerd Otto : Liver transplantation and combined liver-heart transplantation in patients with familial amyloid polyneuropathy : A single-center experience. *Liver Transplantation*, 16(3):314–323, 2010. a)
- [52] David Adams : Recent advances in the treatment of familial amyloid polyneuropathy. *Ther Adv Neurol Disord*, 6(2):129–139, 2013. a)
- [53] Greta J. Mirov, Zhihong Lai, Hilal A. Lashuel, Scott A. Peterson, Candace Strang et Jeffery W. Kelly : Inhibiting transthyretin amyloid fibril formation via protein stabilization. *PNAS*, 93(26):15051–15056, 1996. b)
- [54] Paul W Baures, Vibha B Oza, Scott A Peterson et Jeffery W Kelly : Synthesis and evaluation of inhibitors of transthyretin amyloid formation based on the non-steroidal anti-inflammatory drug, flufenamic acid. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 7(7):1339–1347, 1999. b)
- [55] Nelson Ferreira, Maria João Saraiva et Maria Rosário Almeida : Natural polyphenols inhibit different steps of the process of transthyretin (TTR) amyloid fibril formation. *FEBS Letters*, 585(15):2424–2430, 2011. b)
- [56] Raghu Pullakhandam, P.N.B.S. Srinivas, Madhavan K. Nair et G. Bhanuprakash Reddy : Binding and stabilization of transthyretin by curcumin. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 485(2):115–119, 2009. b)
- [57] Nelson Ferreira, Isabel Cardoso, Maria Rosario Domingues, Rui Vitorino, Margarida Bastos, Guangyue Bai, Maria Joao Saraiva et Maria Rosario Almeida : Binding of epigallocatechin-3-gallate to transthyretin modulates its amyloidogenicity. *FEBS letters*, 583(22):3569–3576, 2009. b)

- [58] Maria Rosário Almeida, Bárbara Macedo, Isabel Cardoso, Isabel Alves, Gregorio Valencia, Gemma Arsequell, Antoni Planas et Maria João Saraiva : Selective binding to transthyretin and tetramer stabilization in serum from patients with familial amyloidotic polyneuropathy by an iodinated diflunisal derivative. *Biochemical Journal*, 381(2):351, 2004. b)
- [59] Gerard Said, Seden Gripon et Peter Kirkpatrick : Tafamidis. *Nat Rev Drug Discov*, 11(3):185–186, 2012. 1.5
- [60] Takayuki Kurosawa, Shuichi Igarashi, Masatoyo Nishizawa et Osamu Onodera : Selective silencing of a mutant transthyretin allele by small interfering RNAs. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 337(3):1012–1018, 2005. b)
- [61] David Adams, Cécile Cauquil et Marie Theaudin : Neuropathies amyloïdes héréditaires : aspects thérapeutiques. *Bulletin de l'Académie nationale de médecine*, 196(7):1333–1345, 2012. b)
- [62] Myriam Taverna et Isabelle Le Potier : Electrophorèse capillaire principe. *Techniques de l'Ingénieur*, P 3 365, 2003. I
- [63] Xiangchun Xuan : Joule heating in electrokinetic flow. *Electrophoresis*, 29(1):33–43, 2008. I.3.1
- [64] Christopher J Evenhuis et Paul R Haddad : Joule heating effects and the experimental determination of temperature during ce. *Electrophoresis*, 30(5):897–909, 2009. I.3.1
- [65] Pier Giorgio Righetti, Cecilia Gelfi, Alessandra Bossi, Erna Olivieri, Laura Castelletti, Barbara Verzola et Alexander V Stoyanov : Capillary electrophoresis of peptides and proteins in isoelectric buffers : An update. *Electrophoresis*, 21(18):4046–4053, 2000. I.3.1
- [66] Simo P Porras et Ernst Kenndler : Are the asserted advantages of organic solvents in capillary electrophoresis real? a critical discussion. *Electrophoresis*, 26(17):3203–3220, 2005. I.3.1

-
- [67] Charles A Lucy, Amy M MacDonald et Makedonka D Gulcev : Non-covalent capillary coatings for protein separations in capillary electrophoresis. *Journal of Chromatography A*, 1184(1):81–105, 2008. I.3.2
- [68] Václav Kašička : Recent developments in capillary and microchip electroseparations of peptides (2011–2013). *Electrophoresis*, 35(1):69–95, 2014. I.3.2
- [69] Vladislav Dolník : Capillary zone electrophoresis of proteins. *Electrophoresis*, 18(12-13): 2353–2361, 1997. I.3.2
- [70] Hanno Stutz : Protein attachment onto silica surfaces—a survey of molecular fundamentals, resulting effects and novel preventive strategies in ce. *Electrophoresis*, 30(12): 2032–2061, 2009. I.3.2
- [71] Vladislav Dolník : Capillary electrophoresis of proteins 2003–2005. *Electrophoresis*, 27(1):126–141, 2006. I.3.2
- [72] Yan He, Colleen Isele, Weiyang Hou et Margaret Ruesch : Rapid analysis of charge variants of monoclonal antibodies with capillary zone electrophoresis in dynamically coated fused-silica capillary. *Journal of separation science*, 34(5):548–555, 2011. I.3.2
- [73] Fuhu Cao, Zhaofeng Luo, Dan Zhou, Rongju Zeng et Yanmei Wang : Hydroxyethylcellulose-graft-poly (2-(dimethylamino) ethyl methacrylate) as physically adsorbed coating for protein separation by ce. *Electrophoresis*, 32(10):1148–1155, 2011. I.3.2
- [74] Amy M MacDonald et Charles A Lucy : Highly efficient protein separations in capillary electrophoresis using a supported bilayer/diblock copolymer coating. *Journal of Chromatography A*, 1130(2):265–271, 2006. I.3.2
- [75] Dan Zhou, Lin Tan, Lina Xiang, Rongju Zeng, Fuhu Cao, Xiaoxi Zhu et Yanmei Wang : Brush-like copolymer as a physically adsorbed coating for protein separation by capillary electrophoresis. *Journal of separation science*, 34(14):1738–1745, 2011. I.3.2
-

- [76] Shigeru Terabe, Koji Otsuka, Kunimichi Ichikawa, Akihiro Tsuchiya et Teiichi Ando : Electrokinetic separations with micellar solutions and open-tubular capillaries. *Anal. Chem.*, 56(1):111–113, 1984. I.4.2
- [77] Stellan Hjerten et Ming-de Zhu : Adaptation of the equipment for high-performance electrophoresis to isoelectric focusing. *Journal of Chromatography A*, 346:265–270, 1985. I.4.3
- [78] Zaifang Zhu, Joann J Lu et Shaorong Liu : Protein separation by capillary gel electrophoresis : A review. *Analytica chimica acta*, 709:21–31, 2012. I.4.4
- [79] James P Landers : *Handbook of capillary and microchip electrophoresis and associated microtechniques*. CRC press, 2007. I.4.5
- [80] C. Blessum, J. O. Jeppsson, F. Aguzzi, H. Bernon et J. Bienvenu : L'électrophorèse capillaire : principe et applications au laboratoire de biologie clinique. *Annales de Biologie Clinique*, 57(6):643–57, 1999. I.4.5
- [81] Eunmi Ban et Eun Joo Song : Recent developments and applications of capillary electrophoresis with laser-induced fluorescence detection in biological samples. *Journal of Chromatography B*, 929:180–186, 2013. a)
- [82] Yang-Wei Lin et Tai-Chia Chiu : Laser-induced fluorescence technique for DNA and proteins separated by capillary electrophoresis. *Journal of Chromatography B*, 793:37–48, 2003. a)
- [83] Christine E. MacTaylor et Andrew G. Ewing : Critical review of recent developments in fluorescence detection for capillary electrophoresis. *Electrophoresis*, 18(12-13): 2279–2290, 1997. a)
- [84] Joop C. M. Waterval et Henk Lingman : Derivatisation trends in capillary electrophoresis. *Electrophoresis*, 21:4029–4045, 2000. b)
- [85] Stéphanie Descroix et Isabelle Le Potier : In-capillary non-covalent labeling of insulin and one gastrointestinal peptide for their analyses by capillary electrophoresis with

- laser-induced fluorescence detection. *Journal of Chromatography A*, 1087:203–209, 2005.
- b)
- [86] Lian Ji Jin, Braden C Giordano et James P Landers : Dynamic labeling during capillary or microchip electrophoresis for laser-induced fluorescence detection of protein-sds complexes without pre-or postcolumn labeling. *Analytical chemistry*, 73(20):4994–4999, 2001. b)
- [87] Ana M. Garcia-Campana, Myriam Taverna et Hugette Fabre : LIF detection of peptides and proteins in CE. *Electrophoresis*, 28:208–232, 2007. b), b), 3
- [88] Willy J. M. Underberg et Joop C. M. Waterval : Derivatization trends in capillary electrophoresis : An update. *Electrophoresis*, 23(22-23):3922–3933, 2002. b)
- [89] Heleen A. Bardelmeijer, Joop C. M. Waterval, Henk Lingeman, Ron van 't Hof, Auke Bult et Willy J. M. Underberg : Pre-, on- and post-column derivatization in capillary electrophoresis. *Electrophoresis*, 18(12-13):2214–2227, 1997. b)
- [90] Marlene Lacroix, Véréna Poinot, Clara Fournier et François Couderc : Laser-induced fluorescence detection schemes for the analysis of proteins and peptides using capillary electrophoresis. *Electrophoresis*, 26(13):2608–2621, 2005. b), 3
- [91] JL Riggs, RJ Seiwald, JH Burckhalter, Cora M Downs et TG Metcalf : Isothiocyanate compounds as fluorescent labeling agents for immune serum. *The American journal of pathology*, 34(6):1081, 1958. b)
- [92] Detlev Belder, Kamal Tolba et Stefan Nagl : Rapid quantitative determination of ephedra alkaloids in tablet formulations and human urine by microchip electrophoresis. *Electrophoresis*, 32:440–447, 2011. b)
- [93] Elena Heister, Vera Neves, Carmen Țîlmaciu, Kamil Lipert, Vanesa Sanz Beltrán, Helen M Coley, S Ravi P Silva et Johnjoe McFadden : Triple functionalisation of single-walled carbon nanotubes with doxorubicin, a monoclonal antibody, and a fluorescent marker for targeted cancer therapy. *Carbon*, 47(9):2152–2160, 2009. b)

- [94] Romain Verpillot, Hermann Esselmann, Mohamad Reza Mohamadi, Hans Klafki, Florence Poirier, Stefan Lehnert, Markus Otto, Jens Wiltfang, Viovy Jean-Louis et Myriam Taverna : Analysis of amyloid- β peptides in cerebrospinal fluid samples by capillary electrophoresis coupled with LIF detection. *Anal. Chem.*, 83(5):1696–1703, 2011. b)
- [95] Kiarach Mesbah, Farid Oukacine, Stefan Lehnert, Markus Otto et Myriam Taverna : On-line capillary electrophoresis derivatization method for high sensitivity analysis of ubiquitin in filtered cerebrospinal fluid. *Electrophoresis*, 34(18):2733–2739, 2013. b)
- [96] Ramon A Evangelista, Alfred Pollak, Brian Allore, Ave F Templeton, Robert C Morton et Eleftherios P Diamandis : A new europium chelate for protein labelling and time-resolved fluorometric applications. *Clinical biochemistry*, 21(3):173–178, 1988. b)
- [97] Sebastian Brauch, Michael Henze, Bianca Osswald, Kai Naumann, Ludger A Wessjohann, Sander S van Berkel et Bernhard Westermann : Fast and efficient mcr-based synthesis of clickable rhodamine tags for protein profiling. *Organic & biomolecular chemistry*, 10(5):958–965, 2012. b)
- [98] Oluwatosin O Dada, David C Essaka, Ole Hindsgaul, Monica M Palcic, Jillian Pendergast, Ronald L Schnaar et Norman J Dovichi : Nine orders of magnitude dynamic range : picomolar to millimolar concentration measurement in capillary electrophoresis with laser induced fluorescence detection employing cascaded avalanche photodiode photon counters. *Analytical chemistry*, 83(7):2748–2753, 2011. b)
- [99] Anette Brunner, Yoshiharn Minamitake et Achim Göpferich : Labelling peptides with fluorescent probes for incorporation into degradable polymers. *European journal of pharmaceuticals and biopharmaceutics*, 45(3):265–273, 1998. b)
- [100] Oluwatosin O Dada, Bonnie J Hugel et Norman J Dovichi : Simplified sheath flow cuvette design for ultrasensitive laser induced fluorescence detection in capillary electrophoresis. *Analyst*, 137(13):3099–3101, 2012. b)
- [101] Audrey Rodat-Boutonnet, Pierre Naccache, Arnaud Morin, Jacques Fabre, Bernard

- Feurer et François Couderc : A comparative study of led-induced fluorescence and laser-induced fluorescence in sds-cge : Application to the analysis of antibodies. *Electrophoresis*, 33(12):1709–1714, 2012. b)
- [102] Mark Larance, Yasmeen Ahmad, Kathryn J Kirkwood, Tony Ly et Angus I Lamond : Global subcellular characterization of protein degradation using quantitative proteomics. *Molecular & Cellular Proteomics*, 12(3):638–650, 2013. b)
- [103] Charles R. Warren : Rapid and sensitive quantification of amino acids in soil extracts by capillary electrophoresis with laser-induced fluorescence. *Soil Biology and Biochemistry*, 40(4):916–923, 2008. b), 3.16, II.1
- [104] David A. Michels, Lowell J. Brady, Amy Guo et Alain Balland : Fluorescent derivatization method of proteins for characterization by capillary electrophoresis- sodium dodecyl sulfate with laser-induced fluorescence detection. *Anal. Chem.*, 79(15):5963–5971, 2007. b)
- [105] Siao-Wei Su, Yu-Chen Liao et Chen-Wen Whang : Analysis of alendronate in human urine and plasma by magnetic solid-phase extraction and capillary electrophoresis with fluorescence detection. *Journal of Separation Science*, 35:681–687, 2012. b), I.1
- [106] Georges Rammouz, Marlène Lacroix, Jean Christophe Garrigues, Véréna Poinot et François Couderc : The use of naphthalene-2, 3-dicarboxaldehyde for the analysis of primary amines using high-performance liquid chromatography and capillary electrophoresis. *Biomedical Chromatography*, 21(12):1223–1239, 2007. b), 3.2
- [107] Valérie Sauvinet, Sandrine Parrot, Nadia Benturquia, Eva Bravo-Moratón, Bernard Renaud et Luc Denoroy : In vivo simultaneous monitoring of gamma-aminobutyric acid, glutamate, and l-aspartate using brain microdialysis and capillary electrophoresis with laser-induced fluorescence detection : Analytical developments and in vitro/in vivo validations. *Electrophoresis*, 24(18):3187–3196, 2003. b)
- [108] Devanand M. Pinto, Edgar A. Arriaga, Doug Craig, Jordanka Angelova, Neepun

- Sharma, Hossein Ahmadzadeh, Norman J. Dovichi et Camille A. Boulet : Picomolar assay of native proteins by capillary electrophoresis precolumn labeling, submicellar separation, and laser-induced fluorescence detection. *Anal. Chem.*, 69(15):3015–3021, 1997. b)
- [109] Veronika Solinova, Vaclav Kasicka, Dusan Koval, Tomislav Barth, Alice Ciencialova et Lenka Zakova : Analysis of synthetic derivatives of peptide hormones by capillary zone electrophoresis and micellar electrokinetic chromatography with ultraviolet-absorption and laser-induced fluorescence detection. *Journal of Chromatography B*, 808(1):75–82, 2004. b)
- [110] Eric T. Wise, Navjot Singh et Barry L. Hogan : Argon-laser-induced fluorescence detection in sodium dodecyl sulfate-capillary gel electrophoretic separations of proteins. *Journal of Chromatography A*, 746(1):109–121, 1996. b)
- [111] Hongyi Zhang, Isabelle Le Potier, Claire Smadja, Jiyou Zhang et Myriam Taverna : Fluorescent detection of peptides and amino acids for capillary electrophoresis via on-line derivatization with 4-fluoro-7-nitro-2,1,3-benzoxadiazole. *Anal Bioanal Chem*, 386(5):1387–1394, 2006. b)
- [112] Jose A. Olivares, Nhung T. Nguyen, Clement R. Yonker et Richard D. Smith : On-line mass spectrometric detection for capillary zone electrophoresis. *Anal. Chem.*, 59(8):1230–1232, 1987. I.5.3
- [113] Soraya Fermas, Florence Gonnet, Anne Varenne, Pierre Gareil et Régis Daniel : Frontal analysis capillary electrophoresis hyphenated to electrospray ionization mass spectrometry for the characterization of the antithrombin/heparin pentasaccharide complex. *Analytical chemistry*, 79(13):4987–4993, 2007. I.5.3
- [114] Tomas Rejtar, Ping Hu, Peter Juhasz, Jennifer M Campbell, Marvin L Vestal, Jan Preisler et Barry L Karger : Off-line coupling of high-resolution capillary electrophoresis to maldi-tof and tof/tof ms. *Journal of proteome research*, 1(2):171–179, 2002. I.5.3

-
- [115] Haiying Zhang et Richard M Caprioli : Capillary electrophoresis combined with matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry ; continuous sample deposition on a matrix-precoated membrane target. *Journal of mass spectrometry*, 31(9):1039–1046, 1996. I.5.3
- [116] Yanming An, Jonathan W Cooper, Brian M Balgley et Cheng S Lee : Selective enrichment and ultrasensitive identification of trace peptides in proteome analysis using transient capillary isotachopheresis/zone electrophoresis coupled with nano-esi-ms. *Electrophoresis*, 27(18):3599–3608, 2006. I.5.3
- [117] Michael Karas, Doris Bachmann et Franz Hillenkamp : Influence of the wavelength in high-irradiance ultraviolet laser desorption mass spectrometry of organic molecules. *Analytical Chemistry*, 57(14):2935–2939, 1985. II.1.1
- [118] Michael Karas, Doris Bachmann, U el Bahr et F Hillenkamp : Matrix-assisted ultraviolet laser desorption of non-volatile compounds. *International journal of mass spectrometry and ion processes*, 78:53–68, 1987. II.1.1
- [119] M Karas, A Ingendoh, U Bahr et F Hillenkamp : Ultraviolet–laser desorption/ionization mass spectrometry of femtomolar amounts of large proteins. *Biological Mass Spectrometry*, 18(9):841–843, 1989. II.1.1
- [120] Marie-Claude Menet : Principes de la spectrométrie de masse. *Revue Francophone des Laboratoires*, 2011(437):41–53, 2011. II.1.2
- [121] Myriam Mokadam : Couplage de l'électrophorèse capillaire avec la spectrométrie de masse via une interface à électronébulisation : compréhension des phénomènes à l'interface et développement de nouvelles méthodologies pour des échantillons complexes et pour les séparations par focalisation isoélectrique. Mémoire de D.E.A., Université de Pierre et Marie Curie, 2008. II.1.2
- [122] Scott A McLuckey et Douglas E Goeringer : Special feature : Tutorial slow heating
-

methods in tandem mass spectrometry. *Journal of Mass Spectrometry*, 32(5):461–474, 1997.

II.2.2

- [123] Ibrahim Habib : Séparations electrocinétiques de peptides d'intérêt pour le diagnostic de la polyneuropathie amyloïde familiale. Mémoire de D.E.A., Université Paris-sud, 2009. I.1
- [124] Isabelle Le Potier et Gisèle Frank : In-capillary derivatization approach applied to the analysis of insulin by capillary electrophoresis with laser-induced fluorescence detection. *Journal of Chromatography A*, 1046:271–276, 2004. II, I.2.2
- [125] J L Kinsey : Laser-induced fluorescence. *Annual Review of Physical Chemistry*, 28(1): 349–372, 1977. 3
- [126] Kiarach Mesbah, Romain Verpillot, François de l'Escaille, Jean Bernard Falmagne et Myriam Taverna : Contribution of CE to the analysis of protein or peptide biomarkers. In Nicola Volpi et Francesca Maccari, éditeurs : *Capillary Electrophoresis of Biomolecules*, numéro 984, pages 167–190. Humana Press, 2013. 3
- [127] Éva Szökő et Tamás Tábi : Analysis of biological samples by capillary electrophoresis with laser induced fluorescence detection. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 53(5):1180–1192, 2010. 3
- [128] Vaclav Kasicka : Capillary electrophoresis of peptide. *Electrophoresis*, 20:3084, 1999. 3
- [129] Raul Garrido-Medina, Angel Puerta, Cristina Pelaez-Lorenzo, Zuly Rivera-Monroy, Andras Guttman, Jose Carlos Diez-Masa et Mercedes de Frutos : Capillary electrophoresis with laser-induced fluorescence detection of proteins from two types of complex sample matrices : Food and biological fluids. In Nicola Volpi et Francesca Maccari, éditeurs : *Capillary Electrophoresis of Biomolecules*, numéro 984, pages 207–225. Humana Press, 2013. 3
- [130] Stephen C. Beale, You-Zung Hsieh et Milos Novotny : Application of 3-(2-furoyl)quinoline-2-carbaldehyde as a fluorogenic reagent for the analysis of pri-

- mary amines by liquid chromatography with laser-induced fluorescence detection. *Journal of Chromatography A*, 499:579, 1990. A
- [131] Mark C. Roach et Marlin D. Harmony : Determination of amino acids at subfemtomole levels by high-performance liquid chromatography with laser-induced fluorescence detection. *Anal. Chem.*, 59(3):411–415, 1987. A
- [132] Pierre De Montigny, John F. Stobaugh, Richard S. Givens, Robert G. Carlson, Kasturi Srinivasachar, Larry A. Sternson et Takeru Higuchi : Naphthalene-2,3-dicarboxyaldehyde/cyanide ion : a rationally designed fluorogenic reagent for primary amines. *Anal. Chem.*, 59(8):1096–1101, 1987. A, I, I.2, I.2.4
- [133] Ncediwe Ndube, Liana van der Westhuizen, Ivan R. Green et Gordon S. Shephard : HPLC determination of fumonisin mycotoxins in maize : A comparative study of naphthalene-2,3-dicarboxyaldehyde and o-phthalaldehyde derivatization reagents for fluorescence and diode array detection. *Journal of Chromatography B*, 879(23):2239–2243, 2011. A
- [134] Edgar A. Arriaga, Yanni Zhang et Norman J. Dovichi : Use of 3-(p-carboxybenzoyl)quinoline-2-carboxaldehyde to label amino acids for high-sensitivity fluorescence detection in capillary electrophoresis. *Analytica Chimica Acta*, 299(3): 319–326, 1995. A
- [135] Shen Hu et Paul C.H Li : Micellar electrokinetic capillary chromatographic separation and fluorescent detection of amino acids derivatized with 4-fluoro-7-nitro-2,1,3-benzoxadiazole. *Journal of Chromatography A*, 876(1–2):183–191, 2000. A
- [136] Nathalie Siri, Marlene Lacroix, Jean-Christophe Garrigues, Véréna Poinot et François Couderc : HPLC-fluorescence detection and MEKC-LIF detection for the study of amino acids and catecholamines labelled with naphthalene-2,3-dicarboxyaldehyde. *Electrophoresis*, 27(22):4446–4455, 2006. I.1
- [137] Mei-Tsu Chiang, Sarah Y. Chang et Chen-Wen Whang : Analysis of baclofen by capillary

- electrophoresis with laser-induced fluorescence detection. *Journal of Chromatography A*, 877(1-2):233–237, 2000. I.1, I.1
- [138] Marlène Lacroix, Jean-Christophe Garrigues et François Couderc : Reaction of naphthalene-2,3-dicarboxaldehyde with enkephalins for LC-Fluorescence and LC-MS analysis : Conformational studies by molecular modeling and H/D exchange mass spectrometry. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*, 18(9):1706–1713, 2007. I.1
- [139] Li-Yao Zhang et Meng-Xiang Sun : Determination of histamine and histidine by capillary zone electrophoresis with pre-column naphthalene-2,3-dicarboxaldehyde derivatization and fluorescence detection. *Journal of Chromatography A*, 1040:133–140, 2004. I.1, I.2, I.2.2
- [140] Takao Kawasaki, Takeru Higuchi, Kazuhiro Imai et Osborne S. Wong : Determination of dopamine, norepinephrine, and related trace amines by prechromatographic derivatization with naphthalene-2,3-dicarboxaldehyde. *Analytical Biochemistry*, 180:279–285, 1989. I.1
- [141] Li-Yao Zhang et Meng-Xiang Sun : Fast determination of glutathione by capillary electrophoresis with fluorescence detection using beta-cyclodextrin as modifier. *Journal of Chromatography B*, 877:4051–4054, 2009. I.1
- [142] Anastasia Zotou et Maria Notou : Study of the naphthalene-2,3-dicarboxaldehyde pre-column derivatization of biogenic mono- and diamines in mixture and fluorescence-hplc determination. *Analytical Bioanalytical Chemistry*, 403:1039–1048, 2012. I.1
- [143] Chang-Zhu Yu, You-Zhao He, Guo-Ni Fu, Hai-Yang Xie et Wu-Er Gan : Determination of kanamycin a, amikacin and tobramycin residues in milk by capillary zone electrophoresis with post-column derivatization and laser-induced fluorescence detection. *Journal of Chromatography B*, 877:333–338, 2009. I.1
- [144] Luc Denoroy, Sandrine Parrota, Louis Renaud, Bernard Renaud et Luc Zimmera : In-capillary derivatization and capillary electrophoresis separation of amino acid neu-

-
- rotransmitters from brain microdialysis samples. *Journal of Chromatography A*, 1025: 144–149, 2008. I.1
- [145] SM Lunte et OS Wong : Naphtalenedialdehyde-cyanide : a versatile fluorogenic reagent for the analysis of peptide and other primary amines. *LC-GC*, 7:908–916, 1989. I.2, I.2.3, I.2.4
- [146] Tao Hu, Hong Zuo, Christopher M. Riley, John F. Stobaugh et Susan M. Lunte : Determination of alpha-difluoromethylornithine in blood by microdialysis sampling and capillary electrophoresis with uv detection. *Journal of Chromatography A*, 716:381–388, 1995. I.2
- [147] Roza Wojcik, Kristian E. Swearingen, Jane A. Dickerson, Emily H. Turner, Lauren M. Ramsay et Norman J. Dovichi : Reaction of fluorogenic reagents with proteins : I. mass spectrometric characterization of the reaction with 3-(2-furoyl)quinoline-2-carboxaldehyde, chromeo p465, and chromeo p503. *Journal of Chromatography A*, 1194(2):243–248, 2008. II.1
- [148] Maria Teresa Veledo, Mercedes de Frutos et Jose Carlos Diez-Masa : Amino acids determination using capillary electrophoresis with on-capillary derivatization and laser-induced fluorescence detection. *Journal of Chromatography A*, 1079(1–2):335–343, 2005. II.1
- [149] Zsolt Wagner, Tamas Tabi, Gergely Zachar, Andras Csillag et Eva Szoko : Comparison of quantitative performance of three fluorescence labels in ce/lif analysis of aspartate and glutamate in brain microdialysate. *Electrophoresis*, 32:2816–2822, 2011. I
- [150] Martine Poitevin, Yuliya Shakalisava, Sandrine Miserere, Gabriel Peltre, Jean-Louis Viovy et Stephanie Descroix : Evaluation of microchip material and surface treatment options for IEF of allergenic milk proteins on microchips. *Electrophoresis*, 30(24): 4256–4263, 2009. I
-

- [151] Jose H. Espinal, Jorge E. Gómez et Junior E. Sandoval : Closer look at the operating definition of protein recovery in CE. *Electrophoresis*, 34(8):1141–1147, 2013. I
- [152] Gyorgy Vamosi, Christoph Gohike et Robert M. Clegg : Fluorescence characteristics of 5-carboxytetramethylrhodamine linked covalently to the 5' end of oligonucleotides : Multiple conformers of single-stranded and double-stranded dye-dna complexes. *Biophysical Journal*, 71:972–994, 1996. II
- [153] Kaiying Liu, Hui Wang, Jiling Bai et Li Wang : Home-made capillary array electrophoresis for high-throughput amino acid analysis. *Analytica chimica acta*, 622(1):169–174, 2008. II
- [154] Rosario Zamora, Manuel Alaiz et Francisco J. Hidalgo : Modification of histidine residues by 4,5-epoxy-2-alkenals. *Chem. Res. Toxicol.*, 12(7):654–660, 1999. II
- [155] Alexander Leitner et Wolfgang Lindner : Probing of arginine residues in peptides and proteins using selective tagging and electrospray ionization mass spectrometry. *Journal of mass spectrometry*, 38(8):891–899, 2003. II
- [156] Andrew J. de Mello et Nigel Beard : Dealing with 'real' samples : sample pre-treatment in microfluidic systems. *Lab on a Chip*, 2003. 4.11
- [157] Alexander Kelly, Horng D. Ou, Richard Withers et Volker Dotsch : Low-conductivity buffers for high-sensitivity nmr measurements. *Journal of American Chemical Society*, 2002. III
- [158] Mathilde Faure, Sonia Korchane, Isabelle Le Potier, Antoine Pallandre, Claude Deslouis, Anne Marie Hagiri-Gosnet et Jean Gamby : Investigating of labeling and detection of transthyretin synthetic peptide derivatized with naphthalene-2,3-dicarboxaldehyde. *Talanta*, 2013. IV
- [159] Sonia Korchane, Antoine Pallandre, Cedric Przybylski, Christian Poüs, Florence Gonnet, Régis Daniel et Isabelle Le Potier : Derivatization strategies for ce-lif analysis of

- biomarkers : Toward a clinical diagnostic of familial transthyretin amyloidosis. *Electrophoresis*, 2014. IV
- [160] Eric K. Sackmann, Anna L. Fulton et Beebe David J. : The present and future role of microfluidics in biomedical research. *Nature*, 2014. B
- [161] Long Que, Chester G. Wilson et Yogesh B. et Gianchandani : Microfluidic electrodischarge devices with integrated dispersion optics for spectral analysis of water impurities. *Microelectromechanical Systems, Journal of*, 2005. B
- [162] P. Roblin et D. A. Barrow. : Microsystems technology for remote monitoring and control in sustainable agricultural practices. *Journal of Environmental Monitoring*, 2000. B
- [163] A. Manz, N. Graber et H. Widmer : Miniaturized total chemical analysis systems : a novel concept for chemical sensing. *Sensors and actuators B : Chemical*, 1990. B
- [164] Ryan T. Kelly, Yi Li et Adam T. Woolley. : Phase-changing sacrificial materials for interfacing microfluidics with ion-permeable membranes to create on-chip preconcentrators and electric field gradient focusing microchips. *Analytical chemistry*, 2006. B
- [165] Cong Yu, Frantisek Davey, Mark H. and Svec et J. M. Fréchet : Monolithic porous polymer for on-chip solid-phase extraction and preconcentration prepared by photoinitiated in situ polymerization within a microfluidic device. *Analytical Chemistry*, 2001. B
- [166] N. Gottschlich, C. T. Culbertson, T. E. McKnight, S. C. Jacobson et J. M. Ramsey : Integrated microchip-device for the digestion, separation and postcolumn labeling of proteins and peptides. *Journal of Chromatography B : Biomedical Sciences and Applications*, 2000. B