



HAL
open science

Développement du couplage électrophorèse capillaire - spectrométrie de masse haute sensibilité : application à la caractérisation fine de protéines

Rabah Gahoual

► **To cite this version:**

Rabah Gahoual. Développement du couplage électrophorèse capillaire - spectrométrie de masse haute sensibilité : application à la caractérisation fine de protéines. Chimie analytique. Université de Strasbourg, 2014. Français. NNT : 2014STRAF040 . tel-01126909

HAL Id: tel-01126909

<https://theses.hal.science/tel-01126909v1>

Submitted on 6 Mar 2015

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.



UNIVERSITÉ DE STRASBOURG



ÉCOLE DOCTORALE DES SCIENCES CHIMIQUES

THÈSE

présentée par

Rabah GAHOUAL

soutenue le : 29 Septembre 2014

pour obtenir le grade de : **Docteur de l'université de Strasbourg**

Discipline/ Spécialité : chimie analytique et spectrométrie de masse

Développement du couplage électrophorèse capillaire – spectrométrie de masse haute sensibilité : application à la caractérisation fine de protéines

THÈSE dirigée par :

Dr. Emmanuelle LEIZE-WAGNER

Directrice de recherche, Université de Strasbourg

RAPPORTEURS :

Pr. Manfred WUHRER

Rapporteur externe, Université d'Amsterdam

Dr. Gérard BOLBACH

Rapporteur externe, Université Pierre et Marie Curie

AUTRES MEMBRES DU JURY :

Pr. Petra HELLWIG

Présidente du jury, Université de Strasbourg

Dr. Alain BECK

Examinateur, Centre d'immunologie Pierre Fabre

Dr. Yannis FRANCOIS

Examinateur, Université de Strasbourg

A mon père, ma mère, mes frères et sœur

A ma tante Habiba

"La science ne s'acquiert que par l'étude, la constance, et par un travail opiniâtre"
(Proverbe arabe)

Remerciements et avant-propos

Bien au-delà d'une activité de recherche ou une formation à la recherche scientifique, le doctorat est une expérience de vie à part entière, dont l'aboutissement est la reconnaissance de son travail personnel de recherche par ses pairs. A l'instar d'un parcours initiatique, celui-ci est d'une rare intensité. J'ai eu la chance et le privilège de passer trois années exceptionnellement agréables et enrichissantes, aussi bien sur le plan intellectuel qu'humain. Je tenais avant tout à remercier les personnes que j'ai côtoyées et qui m'ont soutenu tout au long de ma thèse car cela n'aurait pu être possible sans eux.

Je tiens tout d'abord à remercier le Dr. Gérard BOLBACH, le Pr. Petra HELLWIG ainsi que le Pr. Manfred WUHRER d'avoir acceptés d'évaluer les travaux que j'ai pu réaliser durant ma thèse.

Je souhaite exprimer ma plus profonde gratitude et mon respect à Emmanuelle LEIZE-WAGNER pour m'avoir accueilli au sein de son laboratoire, pour avoir encadré mes travaux de thèse mais aussi pour son soutien inconditionnel. Je tenais à la remercier pour la considération et la confiance qu'elle a su me témoigner, j'ai eu l'occasion d'apprendre énormément à ses côtés que ce soit sur le plan scientifique mais également bien au-delà.

Je tiens à exprimer mes remerciements les plus sincères à Yannis-Nicolas FRANCOIS pour son encadrement tout au long de ma thèse et pour la confiance qu'il m'a accordé durant mon séjour au laboratoire. Merci pour son soutien au quotidien, surtout dans les moments de galère, pour m'avoir guidé et canalisé mes efforts. Dieu sait si certains jours c'était nécessaire. Il a su faire preuve de beaucoup de considérations à mon égard, gardant à l'esprit ce qui aux yeux du thésard que j'étais est important. Il a su faire preuve d'altruisme et m'a mis en avant ce qui pour moi à une grande signification. Durant ces trois années, nous avons passé beaucoup de moments agréables et pas mal voyagé. Tout de même, nous avons pu admirer une sculpture en sucre de 10 mètres de haut représentant une femme en forme de sphynx dans une usine désaffectée de Brooklyn (Kara Walker – « A Subtlety »). Je doute que n'importe qui aurait accepté ainsi de m'accompagner.

J'ai eu la chance d'avoir deux encadrants de grande qualité et qui ont fait preuve d'une immense générosité à mon égard. Ils ont su, chacun à leur manière, m'apporter des choses différentes et tout à fait complémentaires. Je suis fier d'avoir travaillé sous leur direction et j'espère avoir pu être à la hauteur de leurs attentes. Maintenant que ces trois années sont derrière moi, je ne peux m'empêcher de penser que lorsque je suis arrivé au laboratoire, je n'étais qu'un enfant. J'ai mûri et cela grâce à vous deux, merci infiniment, je ne l'oublierai jamais.

Je souhaite également remercier Alain BECK et Jean-Marc BUSNEL avec qui j'ai eu l'occasion de collaborer durant ces travaux de thèse. Ce fut un plaisir, j'espère partager, d'avoir eu l'occasion de travailler avec des personnes de grandes qualités. Je les remercie également d'avoir accepté de prendre part au jury de thèse, leur présence m'honore.

Le laboratoire occupe une place centrale dans la vie du doctorant - lieu de vie - à la fois entre le lieu de travail et le foyer. Celui qui m'a accueilli pour mon doctorat a connu de nombreux changements, tout d'abord son nom mais pas seulement. Je voulais par conséquent remercier l'ensemble des personnes composant le LSMIS pour leur accueil chaleureux et la bonne humeur qu'elles apportent à la vie du laboratoire et surtout pour m'avoir supporté : merci à Noëlle, Armelle et Nathalie pour leurs précieux conseils. Merci également à Reynald et Maxime.

Lorsque j'ai débuté au laboratoire, j'ai été accueilli par un autre doctorant qui travaillé également sur l'électrophorèse capillaire. Cette rencontre a été déterminante, depuis nous avons travaillé ensemble et nous nous sommes retrouvés à minuit au laboratoire à finir nos expériences en écoutant du Dr. Dre ; bref il est devenu un ami. Merci pour tout Michaël, je suis heureux d'avoir fait ta connaissance, ce n'est que le début de l'histoire pour nous, toi-même tu sais.

Une pensée me vient pour les doctorants qui ont partagé avec moi cette expérience particulière. Cécile (la blonde), Nha-Thi (toujours motivée pour aller manger) et Margaux (plutôt café). Nous avons pu partager pas mal de délires ensemble, j'ai vraiment apprécié travailler à vos côtés et je vous souhaite beaucoup de réussite pour vos thèses respectives, et pour le reste aussi. Merci également à Marianne (from Beiruth aka je m'en fous !), j'ai apprécié pouvoir faire ta connaissance et celle de la cuisine libanaise, j'espère que tu as apprécié ton passage au laboratoire.

Je souhaite remercier Hélène NIERENGARTEN pour son aide durant ma thèse, pour ses conseils toujours très avisés et pour tout ce que j'ai pu apprendre auprès d'elle sur la spectrométrie de masse. Merci à Mélanie LEBRETON, ma partenaire aussi à l'escalade, je ne pense pas que j'y serai retourné si tu ne m'avais pas motivé c'était vraiment sympa. Merci pour la bonne humeur que tu as pu apporter au laboratoire.

Je souhaite aussi remercier Philippe HAMMANN, Lauriane KUHN, Johana CHICHER et Philippe WOLFF de la plateforme protéomique de l'IMBC. Merci de m'avoir laissé l'occasion de jouer avec vos machines, votre dynamisme m'a beaucoup inspiré durant mes travaux de thèse et cela a été un vrai plaisir de pouvoir travailler avec vous.

Durant ces trois années j'ai également eu l'opportunité d'enseigner à l'université. Même si je m'en doutais déjà, j'ai pu mesurer à quel point l'enseignement est une activité enrichissante. Je tiens à remercier Laura Bom pour m'avoir dépanné de si nombreuses fois quand j'en avais besoin et pour sa bonne humeur.

Je remercie également le personnel de Beckman Coulter et d'AB sciex pour le soutien qu'ils ont apporté au laboratoire durant mes travaux de thèse. Je souhaite en particulier remercier Michel ANSELME pour toute l'aide qu'il nous a fourni et pour sa grande gentillesse. Je remercie également Edna BETGOVARGEZ et Hans DEWALD pour nous avoir fait confiance et pour leur soutien.

Cela fait maintenant un certain nombre d'années que j'ai quitté ma Provence natale pour vivre à Strasbourg, depuis ce temps j'ai eu l'occasion de rencontrer des personnes qui aujourd'hui me sont chères, je voulais ainsi remercier mes compagnons Strasbourgeois Antoine (Le Grand Sifflet), Julien (Papa Ours), Flavie, Pierre (Casper), Jean-François (Jeff, Father Moustache), Lara, Céline, Julie, Marine et Nico (Lavielus) pour tous ces bons moments passés en leur compagnie et pour leur soutien pendant ces trois années.

Je remercie mes amis d'enfance Matthieu, Yao et Vincent. Même si nos vies ont pris des chemins divergents, nous sommes restés les mêmes et c'est ça qui est bon.

Pour conclure je remercie ceux sans qui je ne serais pas grand-chose ; mon père Abdelkader, ma mère Aïcha, mes frères Kamel et Karim et ma petite soeur Farah. Je n'oublierais jamais la première fois où vous avez quitté Strasbourg me laissant pour poursuivre mes études. Qui aurait cru que cela me mènerais si loin à force de travail et de persévérance. Vous avez toujours cru en moi, vous m'avez soutenu dans tous mes choix et vous représentez une famille qui m'apporte énormément de fierté, je me lève chaque matin pour en faire autant.

Sommaire général

Sommaire général	6
Sommaire détaillé	9
Liste des abréviations	14
Liste des figures	16
Introduction générale	21
PARTIE I : Introduction et revue bibliographique	25
I - Electrophorèse capillaire (CE)	27
1. Introduction	27
2. Phénomènes physiques impliqués en électrophorèse capillaire	30
3. Différents modes de séparation en électrophorèse capillaire	35
II - Spectrométrie de masse appliquée à l'étude d'échantillons biologiques	49
1. Introduction	49
2. Spectrométrie de masse à source d'ionisation électrospray	50
III - Couplages entre la CE et la spectrométrie de masse	70
1. Introduction	70
2. Interfaces CE-ESI-MS <i>sheath-liquid</i>	71
3. Interfaces CE-ESI-MS <i>liquid junction</i>	72
4. Interfaces CE-ESI-MS <i>sheathless</i>	75
IV - Stratégies d'analyse protéomique par spectrométrie de masse	84
1. Introduction	84
2. Intérêts de la spectrométrie de masse pour l'analyse protéomique	86
3. Stratégies d'identification de peptides et de protéines par spectrométrie de masse	88
V - Anticorps monoclonaux	98
1. Introduction	98
2. Structure et caractéristiques des anticorps monoclonaux	99

3. Utilisation thérapeutique des anticorps monoclonaux	101
4. Anticorps monoclonaux biosimilaires : définition et enjeux	101
5. Utilisation de la spectrométrie de masse pour la caractérisation d'anticorps monoclonaux.....	103
PARTIE II : Mise en œuvre expérimentale	109
I - Système d'électrophorèse capillaire Beckman Coulter PA 800 plus / CESI8000	110
1. Introduction	110
2. Utilisation des capillaires CESI-MS	111
3. Compatibilité des électrolytes supports	114
4. Calculs des paramètres d'analyses	114
II - Couplage CESI-MS avec le microTOF-Q II.....	115
1. Introduction	115
2. Paramètres optimisés dans le cadre du couplage CESI-MS.....	115
3. Optimisation et acquisition MS/MS en mode automatique.....	117
III - Couplage CESI-MS avec le 5600 TripleTOF.....	120
1. Introduction	120
2. Paramètres optimisés dans le cadre du couplage CESI-MS.....	121
3. Acquisition en mode Information Dependent Acquisition (IDA).....	124
IV - Précautions inhérentes à l'utilisation du couplage CESI-MS.....	126
1. Introduction	126
2. Mise en place du couplage et démarrage des analyses	126
3. Conseils particuliers relatifs à l'utilisation du couplage CESI8000	128
PARTIE III : Résultats – Applications du couplage CESI-MS.....	131
I - Etude du couplage CESI-MS et application en tant que plateforme d'infusion nanoESI pour l'étude de complexes non-covalents biologiques	132
1. Introduction	132
2. Publications: Novel sheathless CE-MS interface as an original and powerful infusion platform for nanoESI study	135
3. Additional discussions	154

4. Conclusions.....	156
II - Caractérisation rapide et multi-niveaux d'anticorps monoclonaux par CESI-MS/MS.....	158
1. Introduction	158
2. Publication: Rapid and multi-level characterization of trastuzumab using sheathless capillary electrophoresis-tandem mass spectrometry	161
3. Conclusion	180
III - Caractérisation complète de la structure primaire et des micro-hétérogénéités d'anticorps en une seule injection par isotachophorèse et CESI-MS/MS.....	182
1. Introduction	182
2. Publication: Full antibody primary structure and micro-variant characterization in a single injection using transient isotachophoresis and sheathless capillary electrophoresis – tandem mass spectrometry	185
3. Additional discussion regarding characterization of mAbs by t-ITP CESI-MS/MS.....	200
4. Conclusion	205
IV - Evaluation de la biosimilarité d'anticorps monoclonaux par isotachophorèse transitoire et CESI-MS/MS.....	208
1. Introduction	208
2. Publication: Monoclonal antibodies biosimilarity assessment using transient isotachophoresis capillary zone electrophoresis-tandem mass spectrometry	212
3. Conclusion	232
Conclusion générale et perspectives	236
Liste des communications scientifiques.....	243
Annexes.....	247
Recueil des références bibliographiques.....	257

Sommaire détaillé

PARTIE I : Introduction et revue bibliographique.....	25
I - Electrophorèse capillaire (CE).....	27
1. Introduction	27
2. Phénomènes physiques impliqués en électrophorèse capillaire	30
2.1. Electrophorèse	30
2.2. Electroosmose	30
2.3. Paramètres importants en électrophorèse capillaire.....	33
3. Différents modes de séparation en électrophorèse capillaire.....	35
3.1. Electrophorèse capillaire de zone (CZE)	35
3.2. Isotachophorèse.....	37
3.3. Electrophorèse capillaire en gel	39
3.4. Electrochromatographie capillaire	40
3.5. Electrochromatographie en phase micellaire	40
3.6. Isoélectrofocalisation capillaire.....	42
II - Spectrométrie de masse appliquée à l'étude d'échantillons biologiques.....	49
1. Introduction	49
2. Spectrométrie de masse à source d'ionisation électrospray	50
2.1. Source électrospray	50
2.1.1. Production de gouttelettes chargées	51
2.1.2. Division des gouttelettes charges.....	51
2.1.3. Emission des ions en phase gazeuse	52
2.1.4. Intérêts des sources nano electropray.....	53
2.1.5. Nature des ions générés en ESI.....	54
2.1.6. Interprétation des spectres de masse en ESI	55
2.2. Interfaces	56
2.3. Les analyseurs de masse.....	58
2.3.1. Analyseurs quadripolaire.....	59

2.3.2.	L'analyseur à temps de vol.....	62
2.4.	Les détecteurs.....	64
2.4.1.	Types de détecteurs utilisés en MS.....	64
2.4.2.	Détecteur multiplicateur d'électrons à galette de micro-canaux	64
2.5.	Spectrométrie de masse en tandem (MS/MS)	65
2.5.1.	Définition.....	65
2.5.2.	Dissociation induite par collision.....	66
III -	Couplages entre la CE et la spectrométrie de masse	70
1.	Introduction	70
2.	Interfaces CE-ESI-MS <i>sheath-liquid</i>	71
3.	Interfaces CE-ESI-MS <i>liquid junction</i>	72
3.1.	Design original d'interface <i>liquid junction</i>	73
3.2.	Design d'interface <i>liquid junction</i> par pression.....	73
3.3.	Design d'interface <i>liquid junction</i> à micro vial	74
4.	Interfaces CE-ESI-MS <i>sheathless</i>	75
4.1.	Interfaces <i>sheathless</i> utilisant un capillaire métallisé.....	76
4.2.	Interfaces <i>sheathless</i> utilisant une connectique intra-capillaire.....	77
4.3.	Interfaces <i>sheathless</i> utilisant un capillaire poreux : l'interface CESI-MS	78
IV -	Stratégies d'analyse protéomique par spectrométrie de masse	84
1.	Introduction	84
2.	Intérêts de la spectrométrie de masse pour l'analyse protéomique	86
2.1.	Fragmentation des peptides.....	86
2.2.	Détermination de séquence peptidique : séquençage <i>de novo</i>	87
3.	Stratégies d'identification de peptides et de protéines par spectrométrie de masse	88
3.1.	Stratégie de l'empreinte peptidique massique	88
3.2.	Stratégie par spectrométrie de masse en tandem (MS/MS)	89
3.3.	Caractérisation de modifications post-traductionnelles (PTM)	90
3.3.1.	Introduction	90

3.3.2.	Principales modifications post-traductionnelles	90
3.3.3.	Glycosylation des protéines.....	92
V -	Anticorps monoclonaux	98
1.	Introduction	98
2.	Structure et caractéristiques des anticorps monoclonaux.....	99
3.	Utilisation thérapeutique des anticorps monoclonaux.....	101
4.	Anticorps monoclonaux biosimilaires : définition et enjeux	101
5.	Utilisation de la spectrométrie de masse pour la caractérisation d'anticorps monoclonaux.....	103
5.1.	Introduction	103
5.2.	Caractérisation de la séquence d'acides aminés.....	104
5.3.	Caractérisation des glycosylations	105
5.4.	Caractérisation de modifications post-traductionnelles d'intérêts.....	105
PARTIE II :	Mise en œuvre expérimentale	109
I -	Système d'électrophorèse capillaire Beckman Coulter PA 800 <i>plus</i> / CESI8000	
	110	
1.	Introduction	110
2.	Utilisation des capillaires CESI-MS	111
3.	Compatibilité des électrolytes supports	114
4.	Calculs des paramètres d'analyses.....	114
II -	Couplage CESI-MS avec le microTOF-Q II.....	115
1.	Introduction	115
2.	Paramètres optimisés dans le cadre du couplage CESI-MS.....	115
3.	Optimisation et acquisition MS/MS en mode automatique.....	117
III -	Couplage CESI-MS avec le 5600 TripleTOF.....	120
1.	Introduction	120
2.	Paramètres optimisés dans le cadre du couplage CESI-MS.....	121
3.	Acquisition en mode Information Dependent Acquisition (IDA).....	124
IV -	Précautions inhérentes à l'utilisation du couplage CESI-MS.....	126
1.	Introduction	126

2.	Mise en place du couplage et démarrage des analyses	126
3.	Conseils particuliers relatifs à l'utilisation du couplage CESI8000	128
PARTIE III : Résultats – Applications du couplage CESI-MS.....		131
I -	Etude du couplage CESI-MS et application en tant que plateforme d'infusion nanoESI pour l'étude de complexes non-covalents biologiques	132
1.	Introduction	132
2.	Publications: Novel sheathless CE-MS interface as an original and powerful infusion platform for nanoESI study	135
3.	Additional discussions	154
3.1.	Evaluation and optimization of the capillary position.....	154
3.2.	Application of the CESI-MS as an infusion platform.....	155
4.	Conclusions.....	156
II -	Caractérisation rapide et multi-niveaux d'anticorps monoclonaux par CESI-MS/MS.....	158
1.	Introduction	158
2.	Publication: Rapid and multi-level characterization of trastuzumab using sheathless capillary electrophoresis-tandem mass spectrometry	161
3.	Conclusion	180
III -	Caractérisation complète de la structure primaire et des micro-hétérogénéités d'anticorps en une seule injection par isotachophorèse et CESI-MS/MS.....	182
1.	Introduction	182
2.	Publication: Full antibody primary structure and micro-variant characterization in a single injection using transient isotachophoresis and sheathless capillary electrophoresis – tandem mass spectrometry	185
3.	Additional discussion regarding characterization of mAbs by t-ITP CESI-MS/MS.....	200
3.1.	Sample preparation	200
3.2.	Y / B fragment ions recovery	200
3.3.	Electrophoretic separation of the modified peptides	202
4.	Conclusion	205
IV -	Evaluation de la biosimilarité d'anticorps monoclonaux par isotachophorèse transitoire et CESI-MS/MS	208

1. Introduction	208
2. Publication: Monoclonal antibodies biosimilarity assessment using transient isotachopheresis capillary zone electrophoresis-tandem mass spectrometry	212
3. Conclusion	232
Annexes.....	247
Recueil des références bibliographiques.....	257

Liste des abréviations

AA : acide aminé
ADN : acide désoxyribonucléique
ARN : acide ribonucléique
BGE : électrolyte support
CE : électrophorèse capillaire
CEC : électrochromatographie capillaire
CE-ESI-MS : électrophorèse capillaire couplée à la spectrométrie de masse à source ESI
CID : dissociation induite par collision
cIEF : focalisation isoélectrique capillaire
CL : chromatographie liquide
CZE : électrophorèse capillaire de zone
Da : dalton
ECD : dissociation par capture d'électrons
EOF : flux électroosmotique
ESI : électrospray
ESI-MS : spectrométrie de masse à source d'ionisation électrospray
ETD : Dissociation par transfert d'électrons
GCE : électrophorèse capillaire en gel
GlcNac : N-acétylglucosamine
H : hauteur de plateau théorique
HC : chaîne lourde
HPLC : chromatographie liquide haute performance
IEC : chromatographie à échanges d'ions
Ig : immunoglobuline
IgG : immunoglobuline G
ISD : dissociation en source
IT : analyseur de masse de type piège à ions
ITP : isotachophorèse
t-ITP : isotachophorèse transitoire
LC : chaîne légère
LC-ESI-MS : chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse à source ESI
mAbs : anticorps monoclonaux
MALDI : matrix assisted laser desorption ionization
Man : mannose

MEKC : électrochromatographie capillaire en phase micellaire
MS : spectrométrie de masse
MS/MS : spectrométrie de masse en tandem
m/z : rapport masse sur charge
N : nombre de plateaux théoriques
nanoESI : nano électrospray
nanoLC : nano chromatographie liquide
PEG : polyéthylène glycol
PD : pharmacodynamique
PK : pharmacocinétique
PMF : approche par empreinte massique (peptide mass fingerprinting)
PFF : approche par empreinte massique des fragments (peptide fragment fingerprinting)
PTM : modification post-traductionnelle
Q : quadripôle
R&D : recherche et développement
RP-LC : chromatographie liquide en phase inverse
SEC : chromatographie à exclusion stérique
TIC : courant d'ion total
TOF : temps de vol
Tris : thrihydroxymethylamino methane
Uma : unité de masse atomique
UPLC : chromatographie liquide ultra-haute performance

Liste des figures

PARTIE I: Introduction et revue bibliographique

Figure 1. Représentation schématique du système d'électrophorèse capillaire détaillant ces principaux éléments et certains des paramètres communément utilisés.

Figure 2. Représentation schématique de la formation de la double couche dans le capillaire à l'origine de l'électrosmose, ici dans le cas d'un capillaire en silice vierge.

Figure 3. Evolution du potentiel zeta d'un capillaire en silice vierge en fonction du pH, pour différentes concentrations en KNO_3 .

Figure 4. Représentation schématique d'une séparation d'analytes chargés en électrophorèse capillaire de zone.

Figure 5. Représentation schématique du phénomène séparatif expérimenté en isotachophorèse.

Figure 6. Représentation schématique d'une séparation d'analytes chargés et neutres en électrochromatographie en phase micellaire utilisant un tensioactif de nature anionique et un capillaire en silice vierge.

Figure 7. Représentation schématique décrivant la production de gouttelettes chargées dans le processus d'ionisation en ESI.

Figure 8. Représentation schématique illustrant l'émission des ions en phase gazeuse selon le modèle de Dole.

Figure 9. Représentation schématique illustrant l'émission des ions en phase gazeuse selon le modèle d'Iribarne-Thomson.

Figure 10. Spectre de masse modèle obtenu en ESI-MS illustrant la détection de plusieurs états de charge consécutifs pour une même molécule.

Figure 11. Représentation schématique du spectromètre de masse microTOF-Q II (Bruker Daltonics) détaillant les différentes régions composant l'interface de l'instrument.

Figure 12. Représentation schématique du spectromètre de masse 5600 *plus* (AB Sciex) détaillant les différentes régions composant l'interface de l'instrument.

Figure 13. Représentation schématique sous différentes vues d'un analyseur quadripolaire.

Figure 14. Diagramme de stabilité d'un analyseur de masse quadripolaire, en rouge est représenté l'intersection entre la droite de fonctionnement et le domaine de stabilité.

Figure 15. Représentation schématique du principe de fonctionnement d'un analyseur de masse de type TOF.

Figure 16. Représentation schématique du fonctionnement d'un analyseur TOF équipé d'un réflecteur électrostatique.

Figure 17. Représentation schématique d'une galette formée dans un détecteur MCP. Représentation d'un capillaire droit constituant le détecteur MCP.

Figure 18. Représentation schématique de la cellule de collision du spectromètre de masse hybride microTOF-Q II (Bruker Daltonics).

Figure 19. Représentation schématique d'un système d'interfaçage CE-ESI-MS de type *sheath-liquid*.

Figure 20. Représentation schématique du montage de la jonction en T utilisée sur l'interface CE-ESI-MS *liquid junction*.

Figure 21. Représentation schématique du montage de la jonction en T utilisée sur l'interface CE-ESI-MS *liquid junction* sous pression.

Figure 22. Représentation schématique du couplage utilisant l'interface CE-ESI-MS *liquid junction* à micro vial.

Figure 23. Représentation schématique du montage de la jonction utilisée sur l'interface CE-ESI-MS *liquid junction* à micro vial.

Figure 24. Représentation schématique d'interface CE-ESI-MS *sheathless* utilisant un capillaire métallisé.

Figure 25. Représentation schématique d'interface CE-ESI-MS *sheathless* utilisant un fil conducteur inséré dans le capillaire.

Figure 26. Représentation schématique d'interface *sheathless* CESI-MS.

Figure 27. Représentation schématique des différentes stratégies utilisées en analyse protéomique.

Figure 28. Nomenclature des ions issus de la fragmentation des peptides.

Figure 29. Spectre MS/MS annoté illustrant la détection des différents fragments permettant de déduire la séquence d'acides aminés du peptide détecté.

Figure 30. Spectre MS/MS d'un peptide digéré, montrant l'enchaînement d'ions y correspondant à la fragmentation du peptide (30.A) et du même peptide dont l'asparagine a subi une déamidation (+0.98 Da) (30.B).

Figure 31. Représentation schématique des différents types de glycosylation accompagnée de la nomenclature de représentation des différents hexoses pouvant composer la glycosylation.

Figure 32. Nomenclature de fragmentation des polysaccharides en spectrométrie de masse en tandem.

Figure 33. Représentation schématique de la structure d'un mAb et de ces différentes régions. Au centre la structure complète en Y caractéristique des anticorps. Les masses approximatives des différentes régions sont données à titre indicatif.

Figure 34. Nomenclature utilisée pour nommer les mAbs.

Figure 35. Aperçu des techniques analytiques mise en jeu dans les différents niveaux de caractérisation des mAbs.

Figure 36. Représentation schématique présentant les principaux PTMs hot-spots portés par Trastuzumab et les différences de masse induites par ces modifications.

PARTIE II: mise en oeuvre expérimentale

Figure 1. Représentation schématique d'une cartouche CESI8000.

Figure 2. Représentation schématique du fonctionnement du spectromètre de masse microTOF-Q II en mode auto MS/MS illustrant un cycle d'acquisition.

Figure 3. Visuel du couplage CESI8000 sur le spectromètre 5600 + (partie gauche). Vue proche de l'extrémité du capillaire face à la curtain plate du spectromètre (partie droite).

Figure 4. Vues des différentes modifications apportées au vials CESI-MS. A gauche vial CESI8000 et tube PCR standard. A droite les mêmes éléments ont été modifiés permettant l'injection d'échantillon dont la quantité est faible.

PARTIE III: Résultats – Applications du couplage CESI-MS

Chapitre 1 : Etude du couplage CESI-MS et application en tant que plateforme d'infusion nanoESI pour l'étude de complexes non-covalents biologiques.

Figure 1. Evolution of the infusing flow rate as a function of the applied pressure. Experimental conditions: bare fused-silica capillary with porous tip: total length, 92 cm (30 μm i.d., 150 μm o.d.). Sample: myoglobin, 1 μM (in 10 % AA). MS: capillary voltage, -1,400 V (considered m/z 848.94).

Figure 2. Evolution of signal sensitivity (logarithmic scale) as a function of the infusion flow rate in native conditions. Experimental conditions: bare fused-silica capillary with porous tip: total length, 92 cm (30 μm i.d., 150 μm o.d.). Sample: myoglobin, 250 nM (in 20 mM ammonium acetate). MS: capillary voltage, -1,400 V (considered m/z 2,196.8).

Figure 3. Comparison of β ring mass spectra in native conditions by a ESI-MS and b CESI-MS. Experimental conditions: β ring sample (1 μM in 50 mM ammonium acetate); a) conventional ESI source: flow rate, 4 $\mu\text{L}/\text{min}$; capillary voltage, -4,500 V; dry gas, 4 L/min; source temperature, 180 °C; b) bare fused-silica capillary with porous tip (30 μm i.d.): flow rate, 50 nL/min; capillary voltage, -1,500 V; dry gas, 1.5 L/min; source temperature, 180 °C.

Figure 4. β ring and P14 peptide mixture raw and deconvoluted mass spectra in native conditions. Experimental conditions: β ring, 0.3 μM with 0.11 μM P14 peptide (in 50 mM ammonium acetate, 1 % DMSO). Bare fused-silica capillary with porous tip (30 μm i.d.): flow rate, 20 nL/min; capillary voltage, -1,600 V; dry gas, 1.5 L/min; source temperature, 180 °C.

Figure 5. Hemocyanin mass spectra in native conditions. Experimental conditions: hemocyanin, 50 μM approx. (in 20mM ammonium acetate; pH=6.7). Bare fused-silica capillary with porous tip (30 μm i.d.): flow rate, 10 nL/min; capillary voltage, -1,400 V; dry gas, 1.2 L/min; source temperature, 140 °C

Figure 6. Graphical representation of the intensity corresponding to the signal of the model protein depending on ESI voltage applied, for several position of the separation capillary.

Figure 8. MS spectrum of 30S ribosome (buffer ammonium acetate 500 mM) obtained using the CESI-MS injection system (flow rate 50 nL/min).

Chapitre 2 : Caractérisation rapide et multi-niveaux d'anticorps monoclonaux par CESI-MS/MS

Figure 1. Base Peak Electropherogram corresponding to the analysis by CESI-MS/MS of trastuzumab tryptic digest. Experimental conditions: bare fused silica capillary with porous tip, total length 95 cm (30 μm i.d., 150 μm o.d.); CE voltage +20 kV; BGE 10% acetic acid; sample trastuzumab tryptic digest 2.5 mg/mL in BGE (11 nL injected). MS capillary voltage: -1.3 kV, m/z range: 50–3000.

Figure 2. Sequence coverage obtained by CESI-MS/MS for trastuzumab HC (left-hand side) and LC (right-hand side) based on the identified peptides.

Figure 3. List of trastuzumab digested peptides identified by the CESI-MS/MS analysis.

Figure 4. MS/MS spectra of peptide HT01 and HT02 illustrating the amino acid sequence retracing in the variable domain.

Figure 5. MS/MS spectra of peptide HT04 (IYPTNGYTR) (A) without modification and (B) with a deamidation on Asn55 illustrating the partial modification of the mAb and the characterization of both forms by CESI-MS/MS.

Figure 6. Extracted Ion Electropherogram of m/z ratios (A) 1039.80 (HT29 + G0F), (B) 1093.78 (HT29 + G1F), (C) 972.09 (HT29 + G0), (D) 1147.82 (HT29 + G2F), (E) 991.10 (HT29 + G0).

Figure 7. MS/MS fragmentation spectra of (A) HT29 - G0F (precursor m/z 1039.78; charge state 3+), (B) HT29 - G1F (precursor ion 1093.80; charge state 3+), (C) HT29 - G2F (precursor ion 1147.82; charge state 3+), (D) HT29 - G0F-GlcNac (precursor ion 972.10; 3+), (E) HT29 - G0 (precursor ion 991.09; charge state 3+).

Chapitre 3 : Caractérisation complète de la structure primaire et des micro-hétérogénéités d'anticorps en une seule injection par isotachophorèse et CESI-MS/MS

Figure 1. Sequence coverage obtained for trastuzumab by CESI-MS/MS methodology. Experimental conditions: 90 nL injected (200 fmol). CESI-MS/MS spectra recorded on 5600 TripleTOF (AB Sciex, San Francisco, US). Constant domain (blue), variable domain (orange) and complementarity determining region (red) are represented for heavy chain and light chain.

Figure 2. Glycoforms determination obtained for trastuzumab using the CESI-MS/MS method in a single analysis (left-hand side). Extracted Ion Electropherogram (EIE) corresponding to the m/z of the most abundant glycoforms, illustrating the separation selectivity obtained with CE regarding mAbs glycopeptides (right-hand side).

Figure 3. A) EIE corresponding to the m/z of peptide LT04 (light chain, position 40-45) and LT06 with deamidatedAsp41. De-convoluted MS/MS spectra corresponding to B) peptide LT04 and C) LT04deamidatedAsp41 (deamidation represented by deaN).

Figure 4. EIE corresponding to m/z for digested peptide HT23 (heavy chain; position 278-291) experiencing aspartic acid isomerization. Raw MS/MS spectra for both peaks (right-hand side) demonstrated the same fragmentation pattern additionally to precursor m/z and charge state values.

Figure 5. Schematic representation of the fragment ions identified by the characterization of trastuzumab by t-ITP CESI-MS/MS.

Figure 6. Reaction mechanism describing the oxidation of methionine lateral chain to give methionine sulfoxide.

Figure 7. A) EIE corresponding to the m/z of trastuzumab peptide HT21 (heavy chain, position 252-258) and HT21 with oxidated Met255. MS/MS spectra corresponding to B) peptide HT21 and C) HT21 with oxidated met255 (oxidation represented by oxIM).

Figure 8. EIE corresponding to the m/z of the synthetic peptides considered for Asp isomerization separation study. Theoretical mass: 1209.5899 ± 0.05 (charge state 2+). Ratios expressed between two peptide conformations are based on absolute injected quantities.

Chapitre 4 : Evaluation de la biosimilarité d'anticorps monoclonaux par isotachophorèse transitoire et CESI-MS/MS

Figure 1. Schematic representation of trastuzumab and cetuximab. Blue parts of the protein represent the constant domain of the mAbs. Yellow parts of the scheme represent the variable domain of the mAbs and red parts represent the complementary determining region (CDR).

Figure 2. Sequence coverage obtained by CESI-MS/MS for trastuzumab (left-hand side) and trastuzumab-B (right hand side) showing only one amino acid (Lys-217) unidentified in the case of the candidate biosimilar. Experimental conditions: bare fused silica capillary (95cm; 30µm i.d.); sample mAbs tryptic digest 2.22 µM; injection volume 90nL.

Figure 3. Raw MS/MS, extracted from trastuzumab-B CESI-MS/MS analysis, presenting fragmentation of ions m/z 517.3095 (1+) and m/z 314.6937 (2+) characterizing the amino acid substitution between trastuzumab and its candidate biosimilar. VDKK217VEPK for trastuzumab (G1m17 allotype) and VDKR217VEPK in the case of trastuzumab-B (G1m3 allotype).

Figure 4. Glycoforms semiquantitative analysis results obtained through the CESI-MS/MS data for the Fc peptide of trastuzumab/trastuzumab-B and cetuximab/cetuximab-B. Glycoform profiling could be compared between original mAbs and their candidate biosimilar.

Figure 5. Glycoform semiquantitative analysis results regarding Fd domain glycosylation of cetuximab and cetuximab-B.

Figure 6. Extracted Ion Electropherogram (EIE) corresponding to m/z (839.408, 2+) for digested peptide HT22 (position 278-291) experiencing aspartic acid isomerization.

Introduction générale

The last decades have seen the advent of mass spectrometry (MS) as a major analytical technique. This technique has allowed to stretch the limits in the analytical chemistry and it is nowadays applied in a large variety of fields. Thus it has demonstrated to be particularly adapted to study biological samples (peptides, proteins, macromolecular complexes) thanks to the development of soft ionization sources which are the electrospray (ESI) and the MALDI (matrix assisted laser desorption/ionization). The development of those sources have even led to the attribution of the Nobel Prize of chemistry to John B. Fenn and Koichi Tanaka in 2002, showing how those developments are considered as breakthrough and have impacted significantly numerous scientific research fields. Mass spectrometry has allowed the emergence of new fields of research such proteomics, metabolomics, glycomics and more recently lipidomics. Instruments performances are constantly improving in term of mass accuracy, resolution, mass range or sensitivity in order to continuously address more complex problematic and deliver consistent characterization of samples.

Capillary electrophoresis (CE) is a separating technique, developed at the beginning of the XXth century, allowing to induce the separation of analytes under an electrical field. CE is a miniaturized technique providing an excellent separation efficiency in a reduced time. In addition, electrophoresis is a physicochemical phenomenon which is well suited for the separation of biological analytes such as proteins, peptides, DNA and RNA and can be operated in different electrophoretic modes.

The first systems enabling the coupling of capillary electrophoresis and ESI mass spectrometry (CE-ESI-MS) have been developed at the end of the 90s, consequently to the development of the ESI source. However CE is still nowadays marginally used as the separation technique prior to the MS analysis, compared to the coupling involving liquid chromatography (LC-ESI-MS). This trend can be partly explained by the difficulty to maintain the electrical field, inside the capillary, necessary to the separation while the extremity of the very same capillary is positioned inside the ESI source. Various methodologies have been applied in order to address those limitations while easing the implementation of this type of coupling. However, interfacing developed for the CE-ESI-MS coupling tend to suffer from a lack of robustness and for most of them involve a reduction of the sensitivity. Loss of sensitivity is the major issue as it opposes to the excellent sensitivity provided by the mass spectrometer, also CE as a miniaturized technique is limited by the volume of sample which can be injected inside the capillary in order to maintain the optimal separation efficiency.

Recently an innovative CE-ESI-MS interfacing have been developed in order to go beyond those limitations. This coupling uses a sheathless CE-ESI-MS interface, meaning that no sheath liquid is needed to maintain the electrical contact between the CE's electrodes required to perform the electrophoretic separation. This interfacing is based on an original by Mehdi Moini (Smithsonian Institution, Suitland, MD), it has been developed as a commercial solution by Beckman Coulter Inc. (nowadays part of Sciex separation). This coupling is referred as the CESI-MS system (the commercial naming is CESI8000).

The work presented in this thesis is focused on the use of the CESI-MS system. Indeed in the context of this work, the laboratory is equipped with a prototype of the CESI-MS provided by Sciex separation as an academic collaboration.

The aims of this work are various:

- Characterizing the CESI-MS system, especially regarding the ESI produced by the interfacing and evaluate its performance and appropriateness to produce an effective ionization
- Implementing the CESI-MS system and elaborate analytical methodologies allowing to perform in-depth characterization of proteins and biological samples using the CESI-MS system
- Demonstrating the interest of using an electrokinetically driven separation prior to the MS analysis, in complementary to chromatographic separation, to characterize various type of biological samples.

The last aspect especially, involves on one hand to demonstrate that experimental conditions used in CESI-MS are compatible to the characterization of biological samples (concentration, complexity). On the other hand, it is to understand the selectivity of the separation provided by the CE and compare it to the selectivity of reverse phase liquid chromatography which is the separating technique most commonly applied prior to MS analysis. The objective underlying of this comparison is to prove that both techniques are complementary and that the characterization of biological samples using those two methodologies can help describing the sample more thoroughly.

During the research work presented in this thesis, the comprehensive characterization by CESI-MS became focused on monoclonal antibodies (mAbs). MABs are tetrameric glycoproteins used for therapeutics since two decades. They represent a major breakthrough in therapeutic treatments, opening new ways of treatments particularly in oncology. MABs are complex glycoproteins subject to a wide variety of micro-heterogeneities which can impact their structure thus their therapeutic activity. Plus, the production process is fairly complex and can lead to the production of an undesired mAb regarding to its structure. In such context, in-depth

characterization of mAbs represents a real challenge for the analytical chemistry first of all by its complexity. Indeed the capacity to provide a comprehensive, detailed characterization of those proteins in an accurate and rapid manner would be a huge asset for the development and process optimization of mAbs.

Modifications exhibited by mAbs are not specific to this type of proteins and may be commonly found on different kind proteins. Therefore, they present the advantage in this research work to enlighten the performance of the methodologies developed for the characterization of proteins in a general manner.

This thesis manuscript is divided in three different part:

- The first part (**PARTIE I: Introduction et revue bibliographique**) is containing a theoretical presentation of capillary electrophoresis as well as mass spectrometry. This part describes from the literature the different systems developed for the hyphenization of CE to ESI-MS while giving an insight of the pro/cons regarding each coupling strategies. This part contains also a description of the techniques of mass spectrometry for the characterization of biomolecules.
- The second part (**PARTIE II: mise en oeuvre expérimentale**) describes the system CESI-MS used during this research work and details the different optimization performed during the method development, mainly regarding the instrumental settings.
- The last part (**PARTIE III: Résultats – Applications du couplage CESI-MS**) details the different studies performed using the CE-MS coupling and compiled the results obtained during the Ph.D. fellowship.

This last part is divided in four chapters in order to organize the results obtained:

- The first chapter describes the **characterization of the properties of the electrospray generated by the intermediate of the CESI-MS system** and its application as a nanoESI infusion platform for the study of intact proteins and noncovalent complexes.
- The second chapter details the application of the **CESI-MS for the rapid and multi-level characterization of mAbs**. In those experiments CE was performed in capillary zone electrophoresis mode (CZE).
- The third chapter describes the interest of using CE coupled to tandem mass spectrometry, using the CESI-MS system, for the **characterization of the primary structure of several mAbs**. In this part, optimizations made to the methodology are described as well and different samples were studied in order to demonstrate the robustness of this methodology.

- In the last chapter, the **CESI-MS method developed was applied in order to assess the biosimilarity between several approved mAbs and their “bio-generic” candidate**. The aim of this work was to demonstrate the capacity of the method to detect and characterize minor differences between mAbs samples.

-

**PARTIE I : Introduction et revue
bibliographique**

Cette première partie se consacre à détailler les différentes thématiques qui ont pu intervenir durant ces travaux de thèse, il s'agira de fournir une revue bibliographique détaillée définissant ainsi les bases théoriques mais également de dresser un état de l'art qui ont pu être le point de départ des travaux de thèse.

Cette revue bibliographique se divise en six chapitres :

Chapitre I : Electrophorèse capillaire

**Chapitre II : Spectrométrie de masse appliquée à l'étude
d'échantillons biologiques**

**Chapitre III : Couplages entre l'électrophorèse capillaire et la
spectrométrie de masse**

**Chapitre IV : Etude de complexes non-covalents biologiques
par spectrométrie de masse**

**Chapitre V : Stratégies d'analyse protéomique par
spectrométrie de masse**

Chapitre VI : Anticorps monoclonaux – généralités et enjeux

I - Electrophorèse capillaire (CE)

1. Introduction

L'électrophorèse capillaire (CE) est une méthode séparative utilisée principalement pour séparer des espèces chargées en solution en utilisant le principe électrophorétique. L'utilisation de phénomènes électrophorétiques visant la séparation d'analytes a été introduite par Arne Tiselius (1902-1971), lauréat du prix Nobel de chimie en 1948, dans ces travaux de thèse [1]. Durant les années 1960-70, plusieurs équipes de recherches, notamment celles de James Jorgenson ou Stellan Hjertén, ont développé des systèmes dans lesquels l'électrophorèse est réalisée dans des capillaires en verre de faibles diamètres internes (de 0.3mm à <100µm) ouverts à leurs extrémités, pavant la voie à l'électrophorèse capillaire actuelle [2]. L'utilisation de capillaire de faibles diamètres permet en particulier de limiter la chaleur produite par effet Joule sous l'effet du champ électrique, ce qui tend à maîtriser la diffusion longitudinale responsable de l'élargissement des pics et augmenter l'efficacité séparative [3].

L'électrophorèse est un phénomène physique permettant de séparer les analytes en solution composant l'échantillon sous l'effet d'un champ électrique appliqué par l'utilisateur aux extrémités du capillaire. Le capillaire est préalablement rempli d'électrolyte support (BGE) capable de conduire le courant ; les espèces à séparer migrent alors sous l'effet du champ électrique de manière plus ou moins rapide en fonction de leur charge en solution mais également de leur rayon hydrodynamique, qui définissent sa mobilité électrophorétique, concept qui sera pleinement explicité dans la suite de ce chapitre. La figure 1 présente de manière schématique le système de CE ainsi que les principaux éléments qui le compose.

Rapidement, ces travaux ont montré les capacités séparatives de l'électrophorèse capillaire aussi bien du point de vue de sa sélectivité que de l'efficacité séparative [4, [5]. En effet, la CE permet d'obtenir la séparation d'une grande variété d'analytes ayant des caractéristiques physico-chimiques très diverses ; l'étude bibliographique rapporte ainsi l'utilisation de la CE pour l'analyse de :

- ions inorganiques [6]
- petites molécules (< 450g/mol) [7]
- molécules chirales [8]
- acides aminés (AA) [9], peptides [10] et protéines entières [11]
- glycopeptides/glycoprotéines [12, [13]
- polysaccharides [14]

- acides désoxyribonucléiques (ADN) [15] et acides ribonucléiques (ARN) [16]

Outre la possibilité d'appliquer la CE pour une variété de problématiques analytiques, elle montre dès les prémices de son développement son intérêt pour la séparation d'analytes purement biologiques (polysaccharides, peptides, protéines, ADN et ARN) ; en effet la première méthode de séquençage d'ADN développée par Frederick Sanger (1918-2013) utilise la CE pour séparer les différentes bases et en déduire la séquence ADN (« chain termination method ») [17] ; cette méthode a permis de réaliser le séquençage du patrimoine génétique humain et de nombres d'organismes de manière générale.

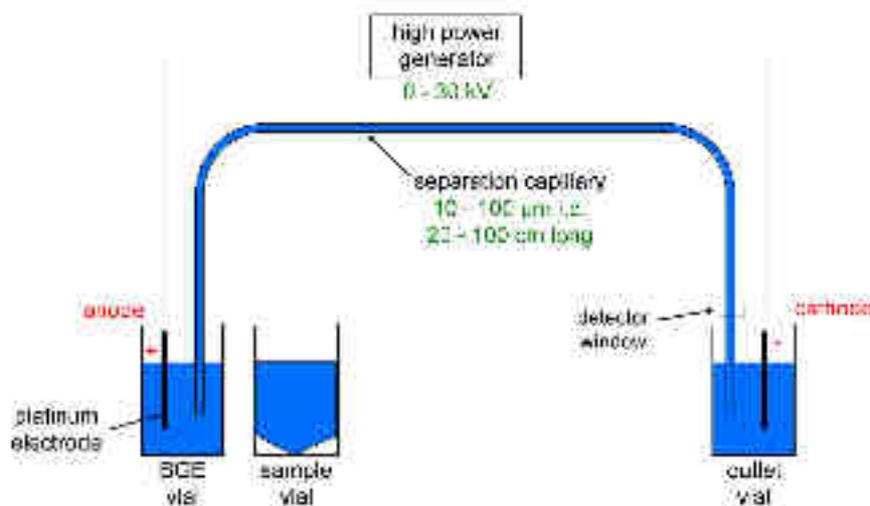


Figure 1. Représentation schématique du système d'électrophorèse capillaire détaillant ces principaux éléments et certains des paramètres communément utilisés.

En ce qui concerne ces performances séparatives, la CE permet de réaliser des séparations rapides tout en maintenant des efficacités comparables voire supérieures à la chromatographie liquide (CL). Cette différence par rapport aux techniques chromatographiques s'illustre au travers de l'équation de Van Deemter [18]; celle-ci est utilisée pour modéliser l'efficacité séparative dans les cas de méthodes séparatives tel que la CL ou encore la CE en prenant en compte les principales sources d'élargissement des pics d'analyte. Cette équation est également largement utilisée en CL pour optimiser les paramètres de séparation (débit de la phase mobile, taille des particules de la phase stationnaire, température) et obtenir une efficacité maximale. L'équation de Van Deemter peut s'écrire sous la forme suivante :

$$H = A + \frac{B}{v_x} + C v_x \quad (1)$$

Les termes A, B et C sont des constantes associées au système utilisé tandis que H représente la hauteur d'un plateau théorique et v_x la vitesse de la phase mobile.

Le terme A définit la diffusion d'Eddy, qui représente la multitude de « chemins » qu'un analyte peut suivre au travers de la phase stationnaire du fait de son hétérogénéité du point de vue de la distribution des particules de phase stationnaire. Le terme B de son côté définit la dispersion longitudinale (parallèle au flux de phase mobile) de l'analyte considéré durant la séparation. Enfin le terme C de l'équation de Van Deemter est la résistance au transfert de charge, ce terme illustre la capacité de la phase stationnaire à s'opposer à l'entraînement des molécules d'analytes par le flux de phase mobile. D'une manière générale, pour une longueur de phase stationnaire donnée une diminution de la valeur de H entraîne la possibilité de compacter virtuellement un nombre de plateaux théoriques plus important améliorant la séparation. En pratique, une diminution de la valeur de H traduit une séparation plus rapide tout en maintenant une largeur de pic constante et vice versa.

L'équation de Van Deemter permet donc de comprendre les origines de la grande efficacité séparative de la CE. La CE a comme particularité de ne pas utiliser de phase stationnaire (à l'exception de l'électrochromatographie, [cf. I – 2. 3. Electrochromatographie](#)) ; la conséquence quasi mécanique vis-à-vis de l'équation de Van Deemter est qu'en CE la diffusion d'Eddy (terme A) et la résistance au transfert de masse (terme C) sont nulles, car inhérentes aux caractéristiques et la présence de la phase stationnaire, permettant de diminuer la valeur de H. L'autre aspect concerne la diffusion longitudinale. Lors de séparation en CE, le BGE entre en circulation dans le capillaire sous l'effet du champ électrique ; c'est l'électroosmose qui sera explicitée plus loin au cours de ce chapitre ([cf. I – 2. 2. Electroosmose](#)). La principale particularité de ce flux est son caractère laminaire au sens de la mécanique des fluides ; il possède par conséquent un front plan. Ce type de flux permet de minimiser la diffusion longitudinale (terme B) et ainsi contribuer de la même manière que précédemment à diminuer la valeur de H pour une séparation donnée. L'analyse de l'équation de Van Deemter met en lumière le caractère optimale au regard de la diffusion induite durant la séparation en CE, comme source de sa grande efficacité séparative.

Il existe plusieurs modes de séparation électrophorétique en CE, en fonction de la nature de l'électromigration obtenue et des conditions expérimentales. Dans le cadre de cette revue bibliographique et afin d'être en adéquation avec les travaux de thèse, nous prendrons le parti de classer les modes électrophorétiques en deux catégories :

- L'électrophorèse capillaire libre ou dite électrophorèse capillaire de zone (CZE)
- Les modes électrophorétiques alternatifs qui comportent notamment l'électrochromatographie capillaire (CEC), la chromatographie électrocinétique micellaire (MEKC), l'électrophorèse capillaire en gel (GCE) ou encore l'isoélectrofocalisation capillaire (cIEF).

Toutefois la séparation en CE s'effectue selon des principes plus complexes qu'une simple migration sous champ électrique. En effet durant la séparation, les espèces à séparer sont soumises à plusieurs contraintes physiques, influençant plus ou moins la migration des analytes en fonction de leur nature physico-chimique et qui aboutissent à leur séparation : l'électrophorèse et l'électroosmose.

2. Phénomènes physiques impliqués en électrophorèse capillaire

2.1. **Electrophorèse**

L'électrophorèse est la contrainte physique principale en CE, permettant d'obtenir la séparation des espèces présentes dans l'échantillon. L'électrophorèse caractérise la migration d'espèces chargées en solution, sous l'effet d'un champ électrique. Les cations migrent en direction de la cathode tandis que les anions migrent vers l'anode (figure 1). Les espèces migrent avec une vitesse qui est fonction de l'intensité du champ électrique appliqué mais également de la charge que possède l'analyte en solution et de son rayon hydrodynamique. Par conséquent les analytes migrent d'autant plus rapidement que leur charge en solution est élevée et leur rayon hydrodynamique faible.

On utilise la vitesse électrophorétique pour définir la capacité de migration sous champ électrique du composé considéré. Celle-ci s'exprime sous la forme :

$$v_{ep} = \mu_{ep} \times E \quad (2)$$

v_{ep} : vitesse électrophorétique ($\text{cm}\cdot\text{s}^{-1}$)

μ_{ep} : mobilité électrophorétique ($\text{cm}^2\cdot\text{V}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$)

E : intensité du champ électrique ($\text{V}\cdot\text{cm}^{-1}$)

On utilise également assez communément la mobilité électrophorétique d'un composé pour définir l'influence du champ électrique sur sa migration.

2.2. **Electroosmose**

L'électroosmose est un effet sensiblement plus difficile à mettre en évidence, il n'en reste pas moins d'une grande influence sur les performances de séparation et ne doit absolument pas être négligé. L'électroosmose, ou encore électro-endoosmose, se définit comme l'écoulement du liquide contenu dans le capillaire sous l'influence d'un champ électrique tangentiel. Dans le cas d'un capillaire en silice vierge, la présence d'un BGE ayant un pH supérieur à 2 entraîne la déprotonation des groupements silanols constituant les parois du capillaire ; les charges à la surface sont alors négatives interagissant avec les cations du BGE pour former une double

couche de charges (figure 2). Cette double couche se caractérise par son potentiel de surface ou potentiel zeta dont la définition est la suivante :

$$\zeta = \frac{\delta\sigma}{\varepsilon} \quad (3)$$

Avec δ l'épaisseur de la double couche, σ la densité de charge par unité de surface et ε la constante diélectrique de l'électrolyte.

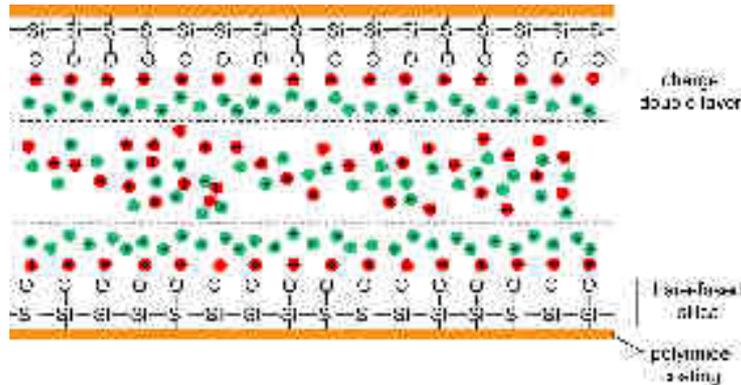


Figure 2. Représentation schématique de la formation de la double couche dans le capillaire à l'origine de l'électrosmose, ici dans le cas d'un capillaire en silice vierge.

Sous l'effet du champ électrique tangentiel, les cations composant le BGE et participant à la formation de la double couche migrent vers la cathode. Cette mise en mouvement crée un écoulement du BGE dans le capillaire en raison de ce relatif partitionnement des charges. Cet écoulement est appelé le flux électroosmotique (EOF). La vitesse linéaire du BGE dans le capillaire, sous l'effet du flux électroosmotique est proportionnelle à l'intensité du champ électrique comme le définit l'équation de Helmholtz-Smoluchowski :

$$v_{eo} = \left(\frac{\varepsilon \zeta}{4\pi\eta} \right) E \quad (4)$$

ε : constante diélectrique du BGE

ζ : potentiel zeta (V)

η : viscosité du BGE (Poise, P)

E : intensité du champ électrique ($V \cdot cm^{-1}$)

L'équation (4) a permis à Helmholtz de définir la mobilité électroosmotique μ_{eo} qui permet de relier la vitesse électroosmotique et l'intensité du champ électrique :

$$\mu_{eo} = \frac{\varepsilon \zeta}{4\pi\eta} \quad (5)$$

On en déduit ainsi,

$$v_{eo} = \mu_{eo} \times E \quad (6)$$

La mobilité électroosmotique s'exprime couramment en $cm^2 \cdot V^{-1} \cdot s^{-1}$.

La direction du flux électroosmotique dépend du type de polarité des charges présentes à la surface du capillaire (positive, négative ou neutre). En effet le flux électroosmotique circule toujours vers l'électrode dont le signe est le même que celui des charges présentes sur les parois du capillaire. A titre d'exemple, le flux électroosmotique circule en direction de la cathode dans le cas d'un capillaire en silice vierge du fait de la présence de charge négative à la surface de celle-ci. On note également que si les parois du capillaire ne présentent de charges apparentes, le flux électroosmotique est théoriquement inexistant. Il est par conséquent possible d'ajuster, d'inverser ou bien de supprimer le flux électroosmotique en modifiant la nature des parois du capillaire avec un greffage [19, [20]. Compte tenue de sa nature, le EOF dépend du pH et de la force ionique du BGE ; le pH influe sur la densité de charge sur les parois du capillaire en agissant directement sur le potentiel zeta. Ajuster ces paramètres pourra permettre ainsi d'augmenter ou de réduire le EOF [21]. Etant donné l'influence considérable que peut avoir le flux électroosmotique sur les performances de séparation, la possibilité d'ajuster celui-ci apparait comme indispensable. En effet, un flux électroosmotique très important peut avoir des conséquences négatives sur la séparation en précipitant la sortie des analytes du capillaire avant leur séparation complète. De la même manière, la séparation de certains analytes ne requiert que la contribution électrophorétique, nécessitant de supprimer le flux électroosmotique [22].

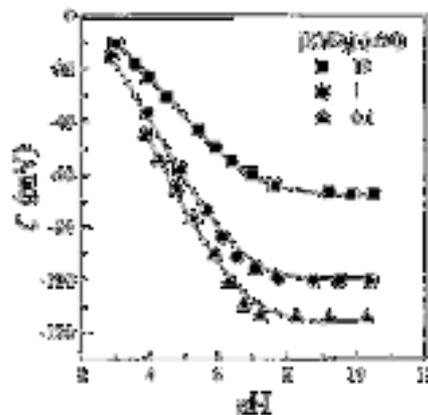


Figure 3. Evolution du potentiel zeta d'un capillaire en silice vierge en fonction du pH, pour différentes concentration en KNO₃. Adapté à partir de [23]

Le flux électroosmotique possède comme particularité un front d'écoulement plat. Cette caractéristique est en partie à l'origine des efficacités particulièrement importantes pouvant être obtenu en CE par rapport à d'autres techniques séparatives tel que la chromatographie liquide (CL) où les phénomènes de diffusion notamment, contribuent à la formation d'un front de phase mobile parabolique agissant de manière négative sur l'efficacité.

La migration des analytes en CE est donc conditionnée principalement par l'électrophorèse et l'électroosmose, qui sont tous deux fonctions de l'intensité du champ électrique appliqué. On

peut par conséquent définir la vitesse de migration apparente v_{app} pour un analyte donné de la manière suivante :

$$v_{app} = \mu_{app} \times E \quad (7)$$

$$\text{avec} \quad \mu_{app} = \mu_{eo} + \mu_{ep} \quad (8)$$

On définit ainsi dans les équations précédentes μ_{app} la mobilité apparente de l'analyte en $\text{cm}^2 \cdot \text{V}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$.

La mobilité apparente est celle qui peut être directement déduite à partir de l'électrophérogramme, tandis que la mobilité électrophorétique ainsi que la mobilité électroosmotique sont déduites de manière indirecte. Pour déterminer les caractéristiques de l'EOF on utilise communément un analyte neutre lors de la séparation ; celui-ci ne subit que l'influence de l'EOF, le temps de migration de celui-ci marquera donc le temps nécessaire au flux électroosmotique pour parcourir le volume du capillaire. On parle dans ce cas de marqueur de flux, la plupart sont de petites molécules organiques capables d'être aisément détecté en UV (formamide, méthanol, acétonitrile, acétone...). Déterminer la mobilité électroosmotique μ_{eo} permet ensuite d'en déduire la mobilité électrophorétique μ_{ep} propre à chaque analyte séparé en fonction de leur mobilité apparente μ_{app} .

2.3. Paramètres importants en électrophorèse capillaire

- Efficacité

Cela a été évoqué précédemment, la CE permet d'obtenir des performances séparatives importantes. On attribue ces capacités séparatives par l'absence de phase stationnaire et le front plat d'écoulement du flux électroosmotique ; ceci se traduit dans l'équation de Van Deemter (1) par l'absence du terme correspondant à la résistance au transfert de masse et minimiser le terme correspondant à la diffusion d'Eddy. De plus le terme correspondant à la diffusion longitudinale est également minimiser en raison du front plat de circulation du BGE sous l'électroosmose. La diffusion axiale est ainsi la principale source de diffusion en CE, celle-ci est définie par l'équation d'Einstein :

$$\sigma^2 = 2D_m t_m \quad (9)$$

σ diffusion axiale (m)

D_m coefficient de diffusion ($\text{m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$)

t_m temps de migration (s)

On en déduit ainsi les équations donnant le nombre de plateaux théoriques (N) et la hauteur d'un plateau théorique (H) en électrophorèse capillaire :

$$N = \frac{L_d}{H} \quad (10)$$

$$H = \frac{\sigma^2}{L_d} \quad (11)$$

$$\Leftrightarrow H = \frac{2L_t D_m}{\mu_{app} E} \quad (12)$$

$$\Rightarrow N = \frac{\mu_{app} E}{2D_m} \times \frac{L_d}{L_t} \quad (13)$$

L_t longueur totale du capillaire (cm)

L_d longueur de capillaire jusqu'à fenêtre de détection (cm)

- Résolution

En électrophorèse capillaire, la résolution entre deux pics peut se définir de la façon suivante :

$$R_{1-2} = \frac{\sqrt{N}}{4} \times \frac{\mu_{ep2} - \mu_{ep1}}{(\mu_{eo} + \overline{\mu_{ep}})} \quad (14)$$

Au vue de cette équation, on constate qu'il est possible d'augmenter la résolution entre deux pics en CE en minimisant le terme $(\mu_{eo} + \overline{\mu_{ep}})$. A contrario, cette équation illustre clairement le fait qu'un flux électroosmotique trop important peut avoir pour effet de diminuer la résolution entre deux espèces.

- Température

La température est un paramètre à ne pas négliger en CE, notamment pour améliorer la reproductibilité des séparations. Etant donné les tensions appliquées pour réaliser les séparations électrophorétiques, jusqu'à 30 000 V pour les appareils commerciaux, l'effet Joule qui en résulte peut être relativement important, en raison de la résistance électrique du BGE. L'utilisation de capillaire permet de limiter de manière importante l'effet Joule par rapport aux autres systèmes d'électrophorèse (électrophorèse en gel d'agarose par exemple). L'échauffement dut à l'effet Joule peut influencer de manière significative la séparation, notamment en modifiant les effets de diffusion ou encore la viscosité du BGE ce qui entrainerai une variation de l'EOF. La quantité de chaleur émise dans le capillaire sous l'effet du champ électrique peut être estimée en utilisant l'équation :

$$Q = E^2 \Lambda C \quad (15)$$

Q quantité de chaleur émise ($\Omega \cdot \text{cm}^3$)

Λ conductivité molaire du BGE ($\text{cm}^2 \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{W}^{-1}$)

C concentration de l'électrolyte support ($\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)

Afin de lutter contre l'échauffement du capillaire, les appareils commerciaux sont équipés de système permettant de maintenir le capillaire à température fixe. Knox a notamment travailler

sur la modélisation des différences de températures que l'on peut observer à l'intérieur du capillaire [24].

3. Différents modes de séparation en électrophorèse capillaire

3.1. **Electrophorèse capillaire de zone (CZE)**

L'électrophorèse capillaire de zone (CZE), appelée également électrophorèse capillaire libre, est le mode électrophorétique essentiellement utilisé dans le cadre des travaux de thèse présentés dans cet ouvrage. La CZE est le mode d'électrophorèse le plus simple à mettre en place mais aussi actuellement le plus couramment utilisé. Ce mode de séparation électrophorétique fut appliqué par Tiselius lorsqu'il développa l'électrophorèse. En CZE, la séparation est réalisée dans un capillaire le plus souvent en silice vierge, mais on rapporte l'utilisation de capillaire en verre borosilicate ou encore de polytetrafluoroethylene (Teflon). Le capillaire est rempli avec un électrolyte support (BGE) capable de conduire le courant et ainsi maintenir le champ électrique dans l'intégralité de celui-ci, la CZE est compatible avec des BGE aqueux, hydro-organiques [25] mais également organiques [26].

Sous l'effet du champ électrique, le flux électroosmotique s'installe tandis que les analytes, chargés en solution, subissent en plus l'électrophorèse. Les analytes composant l'échantillon migrent ainsi avec des vitesses apparentes (eq. (7)) différentes selon leur charge apparente en solution et leur rayon hydrodynamique. Plus la charge d'une espèce à séparer est élevée plus celle-ci migrera rapidement sous l'effet électrophorétique. De plus à charge équivalente, plus le rayon hydrodynamique est faible plus la vitesse apparente du composé sera importante (figure 4).

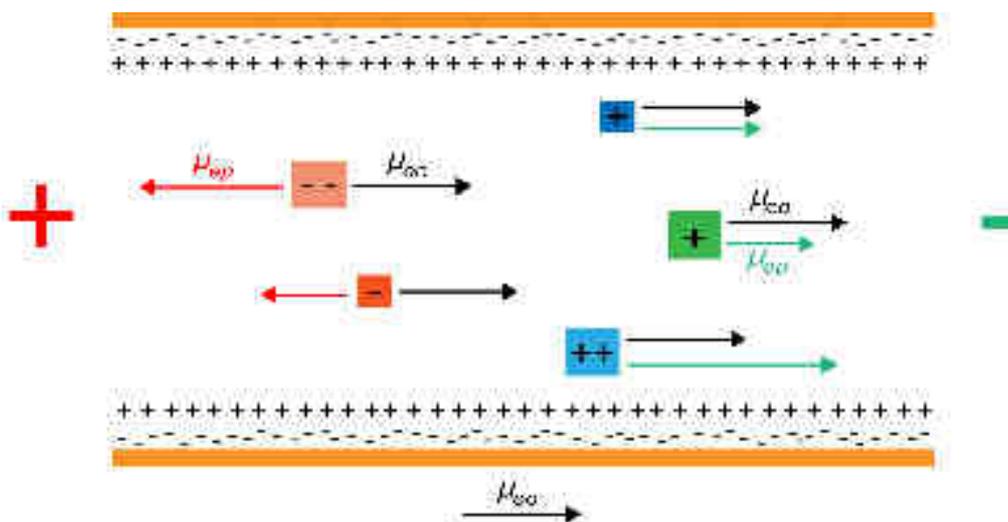


Figure 4. Représentation schématique d'une séparation d'analytes chargés en électrophorèse capillaire de zone.

La CZE permet généralement d'obtenir un nombre de plateaux théoriques compris entre 50000 et 500000 plateaux théoriques. A titre de comparaison, le nombre de plateaux théoriques est généralement inférieur d'un ordre de grandeur en chromatographie liquide haute performance (HPLC) et équivalent en chromatographie liquide ultra haute performance (UPLC). Un tel niveau de performance séparative s'illustre expérimentalement par l'obtention en CZE de séparations rapides tout en générant des pics très fins (largeurs à mi-hauteur faibles). Les électrolytes support (BGE) en CZE sont généralement des acides ou des bases faibles, capables par conséquent d'échanger des protons. Les BGE les plus couramment utilisés sont composés de phosphate, borate, citrate, acetate et trishydroxyméthylamino methane (tris) [27]. Les concentrations sont adaptées en fonction du pH et de la force ionique que l'on souhaite obtenir, ce qui en fait les paramètres primordiaux dans le cadre de développement de séparation en CZE.

La principale difficulté rencontrée en CZE est inhérente à l'utilisation de capillaire en silice vierge. Cela a été évoqué précédemment, les groupements silanols formant la surface des parois du capillaire sont déprotonés, à plus ou moins grande échelle, lorsque le pH du BGE est supérieur à 2 (Figure 3). Les charges résiduelles présentes en surface peuvent alors interagir avec les cations composant l'échantillon ; entraînant l'adsorption de ceux-ci sur les parois du capillaire et les désavantages qui en résulte : adsorption irréversibles entraînant la non détection de certaines espèces, modification de l'EOF, élargissement de pics, influence négative sur la reproductibilité de la séparation. Ces phénomènes d'adsorption sont notamment les plus importants dans le cas de séparation de peptides et surtout de protéines [28]. Du fait de leur taille importante et de leur complexité au regard de leur structure, protéines et peptides possèdent généralement une multitude de groupement pouvant potentiellement interagir avec les parois du capillaire. Les phénomènes d'adsorption ont largement été étudiés et ceci depuis les premiers développements de la CE [29]. On différencie les phénomènes d'adsorption en CE en 2 catégories : l'adsorption réversible et celle irréversible [30].

Afin de lutter contre ces phénomènes d'adsorption mais également dans le but d'optimiser aux maximum les paramètres de séparations (spécificité et EOF notamment) et d'augmenter la reproductibilité de la séparation, on applique des greffages à la silice de manière courante. L'application de greffage permet de modifier la charge apparente au niveau des parois du capillaire, ce qui va offrir un certain nombre de possibilités à l'utilisateur : supprimer les phénomènes d'adsorption, supprimer/modifier la polarité de la charge en surface du capillaire ce qui aura pour conséquence de supprimer/inverser le EOF [31].

Polarité induite	Type de greffage	Références
------------------	------------------	------------

Négative	Polybrene-poly(vinyl sulfonate) (PB-PVS)	[32]
	Poly-ethyleneimine (PEI)	[33]
Neutre	Hydroxymethylcellulose (HPC)	[34]
	Hydroxy-propyl-methylcellulose (HPMC)	[35]
	Polyvinylpyrrolidone-dimethylaminoethyl methacrylate	[36]
	Hydroxyethylcellulose-dimethylacrylamide (HEC/DMA)	[37]
	Sphingomyelines	[38]
	Poly-(vinyle alcool) (PVA)	[39]
	Poly(methyl-2-vinylpyridinium iodide/ethylene oxide)	[40]
	Poly(dimethylsiloxane) (DB-1)	[41]
Positive	Ethylpyrrolidine methacrylate/methylmethacrylate	[42]
	Lupamine (polyvinylamine)	[43]
	Polyarginine	[44]
	Chitosan	[45]
	Poly(diallyldimethylammonium chloride)	[46]
	Polybrene-dextran sulfate-polybrene (PB-DS-PB)	[47]
	Alkanediyl-bis-(dimethylalkylammonium bromide)	[48]
	Iodure de piperazine monoquaternaire (M7C4I)	[49]
	hexadimethrine bromide (polybrene)	[50]
	3-(aminopropyl)trimethoxysilane (APS)	[51]
	Polymères de polyamine (polyE-323)	[52, [53]

Tableau 1. Principaux greffages appliqués en CZE

Ces greffages sont généralement appliqués seul mais on note la mise en œuvre dans certains travaux de greffages composés de plusieurs couches. Le tableau 1 dresse un listing des principaux greffages appliqués en fonction du type de polarité qu'ils induisent à la surface du capillaire.

3.2. Isotachophorèse

L'isotachophorèse (ITP) est un mode de séparation électrophorétique qui se rapproche par plusieurs aspects de la CZE. Dans ce mode séparatif, l'échantillon est injecté entre deux électrolytes de natures différentes :

- Le meneur rempli au préalable le volume total du capillaire. L'électrolyte meneur doit répondre à un certain nombre de critères. Si l'on souhaite séparer des cations par isotachophorèse en utilisant une polarité normale, les cations composant le meneur devront avoir une mobilité électrophorétique supérieure à celle des espèces

composant l'échantillon tandis que les anions composant le meneur devront tamponnés le pH de celui-ci.

- L'électrolyte terminal est positionné après l'injection d'échantillon. La mobilité des cations composant cet électrolyte devront avoir une mobilité électrophorétique inférieure à celle des composants de l'échantillon.

L'échantillon est pris entre le meneur et l'électrolyte terminal. Sous l'effet du champ électrique, la zone contenant l'échantillon migre donc tout en restant prise entre le meneur et l'électrolyte terminal. Dans la zone contenant l'échantillon, les espèces à séparer migrent également sous l'effet du champ électrique de sorte que les analytes vont s'ordonner en fonction de leur mobilité électrophorétique. L'analyte ayant la mobilité électrophorétique la plus importante se retrouvera isolé dans la première partie de la zone échantillon tandis que celui dont la mobilité électrophorétique est la plus faible se retrouvera à la fin de la zone échantillon. Une fois les analytes ordonnés dans la zone échantillon, le système atteint un état stationnaire dans lequel les vitesses de tous les ions présents dans le capillaire sont égales ; aussi bien pour le meneur, l'échantillon ou l'électrolyte terminal (figure 5). L'une des particularités de l'ITP est qu'une fois l'état stationnaire atteint, la concentration en analytes dans chacune de leur zone respective est constante. La conséquence directe de cette caractéristique est que le signal correspondant à chaque analyte ne forme pas de pics mais des plateaux successifs au niveau de la fenêtre de détection.

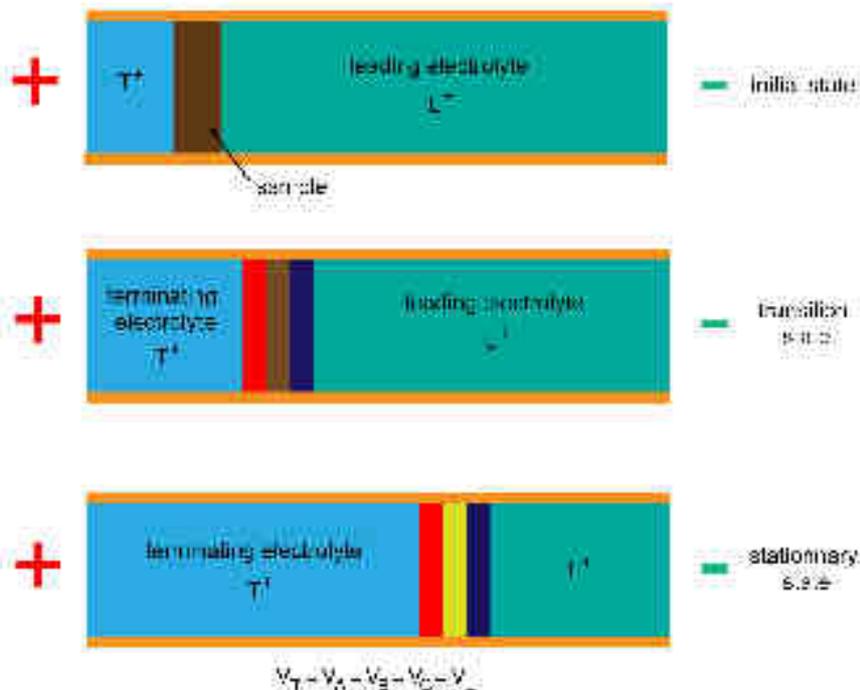


Figure 5. Représentation schématique du phénomène séparatif expérimenté en isotachophorèse.

L'ITP est notamment utilisée pour réaliser des séparations d'acides nucléiques [54].

Une variante d'ITP est en particulier couramment utilisée en tant que méthode de pré-concentration de l'échantillon en CZE : l'isotachophorèse transitoire (t-ITP). Lorsque la t-ITP est utilisée pour pré-concentrer l'échantillon, l'électrolyte meneur compose l'échantillon en tant que tampon ; il est choisi de sorte que sa mobilité électrophorétique soit supérieure à celle du BGE. Lors de l'établissement du champ électrique, le meneur migre plus rapidement que le BGE de sorte que la zone contenant l'échantillon « se heurte » au BGE dont le capillaire est initialement rempli. Ce phénomène entraîne rapidement une focalisation du contenu de l'échantillon (analytes à séparer) dans un volume de capillaire inférieure au volume effectivement injecté. Le meneur, dont la mobilité électrophorétique est importante, est évacué du capillaire durant la première partie de la séparation, qui passe alors dans un état de CZE classique. La t-ITP permet ainsi d'augmenter de manière importante la quantité d'échantillon pouvant être injecté tout en maintenant une séparation dont l'efficacité est maximale, la littérature rapporte la possibilité d'augmenter la quantité d'injection entre 50 et 75 fois [55]. La t-ITP a montré un intérêt particulier dans le cadre de couplage électrophorèse capillaire – spectrométrie de masse (CE-MS) en permettant d'augmenter la compatibilité entre ces deux techniques tout comme dans certain cas l'efficacité séparative [56].

3.3. Electrophorèse capillaire en gel

L'électrophorèse capillaire en gel (GCE) se rapproche relativement de la CZE du point de vue de son fonctionnement. La différence majeure est que dans ce mode électrophorétique, le capillaire est préalablement rempli d'un gel. La présence de ce gel permet lors de la migration des analytes sous l'effet du champ électrique d'influer sur leur migration : les molécules dont la taille est la plus importante verront leur progression ralentie de manière significative par la présence du gel tandis que les molécules possédant un rayon plus faible migreront plus rapidement.

On classe les gels utilisés en GCE en deux catégories : les gels physiques, dont la structure poreuse est formée par l'enchevêtrement de molécules polymériques et les gels chimiques à l'intérieur desquels les molécules formant les gels sont liées par des liaisons covalentes. Les composés les plus couramment utilisées pour former la matrice en GCE sont les polymères de polyacrylamide, l'oxide de polyéthylène, l'hydroxypropylcellulose, l'hydroxyethylcellulose ou encore le polyéthylène glycol (PEG) [57].

La GCE est particulièrement adaptée à la séparation d'analytes dont les rayons sont significativement différents mais dont les rapports masse/charge sont globalement équivalents,

rendant complexe leur séparation uniquement par CZE. Ainsi la GCE est particulièrement adapté à la séparation d'ADN et d'oligonucléotides [58]. Deux modèles tentent d'interpréter les phénomènes régissant la séparation obtenue en GCE :

- Le modèle d'Ogston modélise la migration d'une molécule d'analyte ; celle-ci est considérée comme une particule sphérique circulant au travers du réseau formé par les particules composant le gel. Ces particules sont considérées comme des fibres droites dont la longueur est définie. Le gel est par conséquent considéré uniforme en terme de densité et d'isotropique [59].
- Le modèle de reptation modélise la dynamique de gels polymériques. Le gel est dans ce cas considéré comme un enchevêtrement de polymères à longue chaînes. Les analytes sont forcés de migrer en suivant un « tube topologique » formé à l'intérieur de la matrice. Au lieu de considérer les mouvements des fibres composant le gel, ce modèle se focalise sur un seul « tube topologique » pour modéliser la migration des composés en GCE [60].

3.4. Electrochromatographie capillaire

L'électrochromatographie capillaire (CEC) se situe à mi-chemin entre la CZE et l'HPLC. Dans ce mode électrophorétique le capillaire est rempli de particules de phase stationnaire. De la même manière qu'en CL ces phases stationnaires sont généralement constituées de silices greffées avec des groupements hydrophobes. La phase mobile est ici constituée d'un électrolyte capable de conduire le courant [61].

Comme en CZE, la séparation est réalisée en appliquant un champ électrique à l'aide d'une haute tension. Les analytes sont mis en mouvement sous l'effet du champ électrique tangentiel, ils sont ainsi séparés par deux phénomènes concomitant : l'électrophorèse les séparent en fonction de leur mobilité électrophorétique respective tandis que la présence de la phase stationnaire accentue leur séparation en fonction de leur affinité respective avec celle-ci. Contrairement à la CL, la phase mobile est mise en mouvement par le flux électroosmotique uniquement. Le front d'écoulement plat du flux électroosmotique ([cf. 1 – 2. 2. Electroosmose](#)) induit ainsi en CEC des efficacités supérieures à celle pouvant être typiquement obtenues en HPLC. L'autre particularité de la CEC est la possibilité de séparer des composés neutres, toutefois la séparation de ces types d'analytes se fera uniquement par rapport à leur affinité avec la phase stationnaire.

3.5. Electrochromatographie en phase micellaire

L'électrochromatographie en phase micellaire (MEKC) est un mode électrophorétique dont la principale particularité est de permettre la séparation d'analytes chargés mais aussi d'analytes

neutres dans les mêmes conditions. Les espèces neutres en solution ne subissent pas les effets électrophorétiques du champ électrique, ils n'ont par conséquent pas de mobilité électrophorétique et ne peuvent être séparés en CZE. En MEKC la séparation est réalisée dans un BGE contenant un tensioactif, pouvant être cationique ou anionique, dont la concentration est supérieure à sa concentration critique micellaire (CMC), permettant ainsi la formation de micelles. Les tensioactifs utilisés possèdent une partie hydrophile et une autre partie de la molécule est hydrophobe. Les micelles sont formées par l'arrangement des molécules de tensioactifs de façon à favoriser les contacts entre la solution aqueuse, qu'est le BGE, et la partie hydrophile de la molécule sont importants tandis que les interactions entre le BGE et la partie hydrophobe de la molécule de tensioactif sont minimisés. Du fait de cet arrangement, on parle pour les micelles de cœur hydrophobe et de partie externe hydrophile (figure 6).

Les micelles formées migrent sous l'effet du champ électrique en raison de la partie hydrophile de la molécule de tensioactifs dont on s'assure qu'elle soit chargée au pH auquel la séparation est réalisée. Les analytes neutres se placent à l'intérieur du cœur hydrophobe des micelles et par conséquent migrent conjointement avec celles-ci. Les micelles sont des édifices dynamiques qui s'assemblent et se dissocient constamment, un analyte neutre migre donc avec la même vitesse que les micelles lorsqu'il est associé. Par opposition lorsque l'analyte n'est pas associé dans une micelle il migre avec le EOF. Étant donné la dynamique de formation/dissociation des micelles, la vitesse apparente de migration d'un analyte neutre en MEKC sera fonction de son coefficient de partage entre le cœur hydrophobe des micelles et le BGE ; ainsi l'ordre de migration entre plusieurs espèces neutres est donné par ordre d'hydrophobie croissant [62]. On parle dans ce mode de séparation d'électrochromatographie car la mobilité des espèces neutres à séparer est conditionnée par leur affinité avec le tensioactif employé et par la même occasion avec leur capacité à s'échanger entre les édifices micellaires formés.

Parmi les tensioactifs les plus couramment utilisés on cite : le sodium dodecyl sulfate (SDS) dont la nature est anionique, le bromure de cetyltriméthylammonium (CTAB) comme tensioactif cationique. Des tensioactifs non-ioniques comme le Triton X100 (t-octylphénoxy polyéthoxyéthanol) ou le Tween 80 (polyoxyéthylène sorbitane monooléate) sont également largement utilisés. Il est aussi possible d'employer des tensioactifs zwitterioniques tel que le 3-(3-cholamidopropyl)diméthylammonium-3-propanesulfonate (CHAPS) [63].

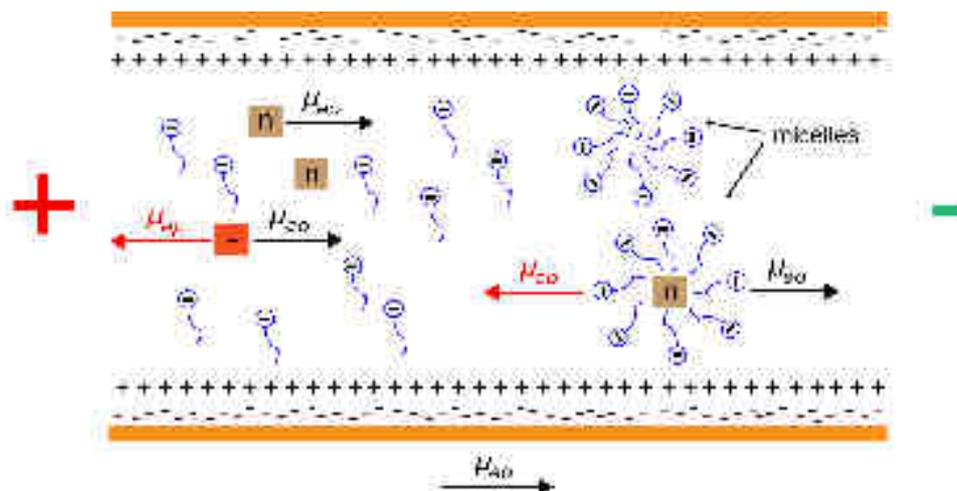


Figure 6. Représentation schématique d'une séparation d'analytes chargés et neutres en électrochromatographie en phase micellaire utilisant un tensioactif de nature anionique et un capillaire en silice vierge.

3.6. Isoélectrofocalisation capillaire

L'isoélectrofocalisation capillaire (cIEF) est un mode de séparation électrophorétique dans lequel la séparation est réalisée par l'intermédiaire d'un électrolyte formant un gradient de pH dans le capillaire. Ce mode de séparation est par conséquent particulièrement adapté à la séparation de molécules possédant à la fois des charges positives et négatives en solution ; c'est notamment le cas des protéines et des peptides. Les espèces à séparer migrent sous l'effet du champ électrique jusqu'à atteindre la zone du capillaire correspondant à leur point isoélectrique (pI) respectif : au pH correspondant au pI, les charges positives et négatives portées par les différents groupements composant la molécule s'annulent. La molécule ne subit plus d'effet électrophorétique et ne migre plus ; on parle ainsi de focalisation isoélectrique car chaque espèce se retrouve focalisée dans la zone de capillaire correspondant à son pI.

Le gradient de pH est généré dans le capillaire en utilisant pour la séparation un électrolyte dont le caractère est amphotère (ampholyte). De plus, les vials positionnés aux électrodes, contenant les électrolytes, sont différents l'un de l'autre : à l'anode on utilise une solution acide (on parle d'anolyte) tandis que la solution à la cathode est basique (catholyte). Lors de l'établissement du champ électrique, les ampholytes présents dans le capillaire migrent jusqu'à atteindre la zone correspondant à leur pI ; il en résulte un gradient de pH à l'intérieur du capillaire. Le type d'ampholyte utilisé détermine la gamme de pH comprise à l'intérieur du capillaire. Les performances séparatives obtenues en cIEF sont donc directement conditionnées par la capacité à former dans le capillaire un gradient de pH stable et dont l'évolution est uniforme.

Parmi les ampholytes les plus couramment utilisés on cite des polymères composés d'acides carboxyliques aliphatiques, des acides polyaminés ou encore de polyacrilamide [64].

La cIEF est un mode séparatif particulièrement résolutif, il est ainsi possible de séparer complètement deux protéines ayant une différence de pI de 0,05. Une fois la focalisation complètement achevée, il existe différentes approches permettant de détecter les analytes. Dans les méthodes dites *two steps* après focalisation, le champ électrique est coupé et on provoque une circulation d'ampholyte dans le capillaire en direction du détecteur. Les analytes sont déplacés au fur et à mesure dans le capillaire sous la circulation d'ampholyte provoquée jusqu'à atteindre successivement la fenêtre du détecteur. Des systèmes permettant de réaliser la détection sur la totalité du capillaire ont également été développés spécifiquement pour être appliqué en cIEF [65] ; ils permettent entre autre d'éviter les phénomènes d'élargissement de pics qui même s'ils sont marginaux peuvent survenir lors de l'utilisation de méthode *two steps*.

Références bibliographiques

1. **Tiselius, A.U.u.**, *The moving boundary method of studying the electrophoresis of proteins*. 1930, Almqvist & Wiksell: Uppsala.
2. **Jorgenson, J. and K. Lukacs**, *Capillary zone electrophoresis*. *Science*, 1983. **222**(4621): p. 266-272.
3. **Hjertén, S.**, *Free zone electrophoresis*. *Chromatographic Reviews*, 1967. **9**(2): p. 122-219.
4. **Jorgenson, J.W. and K.D. Lukacs**, *Zone electrophoresis in open-tubular glass capillaries*. *Analytical Chemistry*, 1981. **53**(8): p. 1298-1302.
5. **Hjertén, S.**, *High-performance electrophoresis: the electrophoretic counterpart of high-performance liquid chromatography*. *Journal of Chromatography A*, 1983. **270**(0): p. 1-6.
6. **Sarazin, C., et al.**, *Identification and determination of inorganic anions in real extracts from pre- and post-blast residues by capillary electrophoresis*. *Journal of Chromatography A*, 2010. **1217**(44): p. 6971-6978.
7. **Schappler, J., et al.**, *Highly sensitive detection of pharmaceutical compounds in biological fluids using capillary electrophoresis coupled with laser-induced native fluorescence*. *Journal of Chromatography A*, 2008. **1204**(2): p. 183-190.
8. **Mayer, S. and V. Schurig**, *ENANTIOMER SEPARATION BY ELECTROCHROMATOGRAPHY IN OPEN TUBULAR COLUMNS COATED WITH CHIRASIL-DEX*. *Journal of Liquid Chromatography*, 1993. **16**(4): p. 915-931.
9. **Wakayama, M., et al.**, *Simultaneous Analysis of Amino Acids and Carboxylic Acids by Capillary Electrophoresis–Mass Spectrometry Using an Acidic Electrolyte and Uncoated Fused-Silica Capillary*. *Analytical Chemistry*, 2010. **82**(24): p. 9967-9976.
10. **Righetti, P.G., R. Sebastiano, and A. Citterio**, *Capillary electrophoresis and isoelectric focusing in peptide and protein analysis*. *PROTEOMICS*, 2013. **13**(2): p. 325-340.
11. **Lauer, H.H. and D. McManigill**, *CAPILLARY ZONE ELECTROPHORESIS OF PROTEINS IN UNTREATED FUSED-SILICA TUBING*. *Analytical Chemistry*, 1986. **58**(1): p. 166-170.
12. **Thakur, D., et al.**, *Profiling the Glycoforms of the Intact alpha Subunit of Recombinant Human Chorionic Gonadotropin by High-Resolution Capillary Electrophoresis-Mass Spectrometry*. *Analytical Chemistry*, 2009. **81**(21): p. 8900-8907.
13. **Barroso, A., et al.**, *Analysis of human transferrin glycopeptides by capillary electrophoresis and capillary liquid chromatography-mass spectrometry. Application to diagnosis of alcohol dependence*. *Analytica Chimica Acta*, 2013. **804**: p. 167-175.
14. **Guttman, A.**, *High-resolution carbohydrate profiling by capillary gel electrophoresis*. *Nature*, 1996. **380**(6573): p. 461-462.
15. **Karger, B.L. and A. Guttman**, *DNA sequencing by CE*. *Electrophoresis*, 2009. **30**: p. S196-S202.

16. **Li, Z.Q., et al.**, *Electromigration behavior of nucleic acids in capillary electrophoresis under pulsed-field conditions*. Journal of Chromatography A, 2014. **1331**: p. 100-107.
17. **Sanger, F. and A.R. Coulson**, *A rapid method for determining sequences in DNA by primed synthesis with DNA polymerase*. Journal of Molecular Biology, 1975. **94**(3): p. 441-448.
18. **van Deemter, J.J., F.J. Zuiderweg, and A. Klinkenberg**, *Longitudinal diffusion and resistance to mass transfer as causes of nonideality in chromatography*. Chemical Engineering Science, 1956. **5**(6): p. 271-289.
19. **Horvath, J. and V. Dolnik**, *Polymer wall coatings for capillary electrophoresis*. Electrophoresis, 2001. **22**(4): p. 644-655.
20. **Lucy, C.A., A.M. MacDonald, and M.D. Gulcev**, *Non-covalent capillary coatings for protein separations in capillary electrophoresis*. Journal of Chromatography A, 2008. **1184**(1-2): p. 81-105.
21. **Hayes, M.A., I. Kheterpal, and A.G. Ewing**, *Effects of buffer pH on electroosmotic flow control by an applied radial voltage for capillary zone electrophoresis*. Analytical Chemistry, 1993. **65**(1): p. 27-31.
22. **Smith, J.T. and Z.E. Rassi**, *Capillary zone electrophoresis of biological substances with fused silica capillaries having zero or constant electroosmotic flow*. ELECTROPHORESIS, 1993. **14**(1): p. 396-406.
23. **Berli, C.L.A., M.V. Piaggio, and J.A. Deiber**, *Modeling the zeta potential of silica capillaries in relation to the background electrolyte composition*. ELECTROPHORESIS, 2003. **24**(10): p. 1587-1595.
24. **Knox, J.H.**, *Thermal effects and band spreading in capillary electro-separation*. Chromatographia, 1988. **26**(1): p. 329-337.
25. **Lin, W.-C., C.-E. Lin, and E.C. Lin**, *Capillary zone electrophoretic separation of biogenic amines: influence of organic modifier*. Journal of Chromatography A, 1996. **755**(1): p. 142-146.
26. **Leung, G.N.W., et al.**, *Separation of basic drugs with non-aqueous capillary electrophoresis*. Journal of Chromatography A, 1996. **738**(1): p. 141-154.
27. **Whatley, H.**, *Basic Principles and Modes of Capillary Electrophoresis*. Clinical and Forensic Applications of Capillary Electrophoresis, 2001: p. 21-58.
28. **Green, J.S. and J.W. Jorgenson**, *MINIMIZING ADSORPTION OF PROTEINS ON FUSED-SILICA IN CAPILLARY ZONE ELECTROPHORESIS BY THE ADDITION OF ALKALI-METAL SALTS TO THE BUFFERS*. Journal of Chromatography, 1989. **478**(1): p. 63-70.
29. **Schure, M.R. and A.M. Lenhoff**, *CONSEQUENCES OF WALL ADSORPTION IN CAPILLARY ELECTROPHORESIS - THEORY AND SIMULATION*. Analytical Chemistry, 1993. **65**(21): p. 3024-3037.
30. **Stutz, H.**, *Protein attachment onto silica surfaces - a survey of molecular fundamentals, resulting effects and novel preventive strategies in CE*. Electrophoresis, 2009. **30**(12): p. 2032-2061.

31. **Huhn, C., et al.**, *Relevance and use of capillary coatings in capillary electrophoresis-mass spectrometry*. Analytical and Bioanalytical Chemistry, 2010. **396**(1): p. 297-314.
32. **Bendahl, L., S.H. Hansen, and B. Gammelgaard**, *Capillaries modified by noncovalent anionic polymer adsorption for capillary zone electrophoresis, micellar electrokinetic capillary chromatography and capillary electrophoresis mass spectrometry*. ELECTROPHORESIS, 2001. **22**(12): p. 2565-2573.
33. **Boonyakong, C. and S.A. Tucker**, *Capillary electrophoresis using core-based hyperbranched polyethyleneimine (CHPEI) static-coated capillaries*. Journal of Separation Science, 2009. **32**(20): p. 3489-3496.
34. **Busnel, J.-M., et al.**, *Protein tryptic digests analyzed by carrier ampholyte-based capillary electrophoresis coupled to ESI-MS*. ELECTROPHORESIS, 2006. **27**(8): p. 1481-1488.
35. **Aguilar, C., et al.**, *Analysis of histones by on-line capillary zone electrophoresis-electrospray ionisation mass spectrometry*. Journal of Chromatography A, 2001. **926**(1): p. 57-67.
36. **Wang, A.-J., et al.**, *Noncovalent poly(1-vinylpyrrolidone)-based copolymer coating for the separation of basic proteins and lipoproteins by CE*. ELECTROPHORESIS, 2009. **30**(22): p. 3939-3946.
37. **Peng, S., et al.**, *Hydroxyethylcellulose-graft-poly (N,N-dimethylacrylamide) copolymer as a multifunctional separation medium for CE*. ELECTROPHORESIS, 2008. **29**(21): p. 4351-4354.
38. **Jurcic, K. and K.K.C. Yeung**, *Sphingomyelins as semi-permanent capillary coatings for protein separations in CE and off-line analysis with MALDI-MS*. ELECTROPHORESIS, 2009. **30**(10): p. 1817-1827.
39. **Gilges, M., M.H. Kleemiss, and G. Schomburg**, *CAPILLARY ZONE ELECTROPHORESIS SEPARATIONS OF BASIC AND ACIDIC PROTEINS USING POLY(VINYL ALCOHOL) COATINGS IN FUSED-SILICA CAPILLARIES*. Analytical Chemistry, 1994. **66**(13): p. 2038-2046.
40. **Lipponen, K., et al.**, *Stable neutral double hydrophilic block copolymer capillary coating for capillary electrophoretic separations*. ELECTROPHORESIS, 2014. **35**(8): p. 1106-1113.
41. **Soga, T., et al.**, *Pressure-Assisted Capillary Electrophoresis Electrospray Ionization Mass Spectrometry for Analysis of Multivalent Anions*. Analytical Chemistry, 2002. **74**(24): p. 6224-6229.
42. **Bernal, J., et al.**, *Poly(N,N-dimethylacrylamide-co-4-(ethyl)-morpholine methacrylamide) copolymer as coating for CE*. Journal of Separation Science, 2009. **32**(4): p. 605-612.
43. **Wu, Y., et al.**, *Electrokinetic separation of peptides and proteins using a polyvinylamine-coated capillary with UV and ESI-MS detection*. Journal of Separation Science, 2008. **31**(5): p. 814-823.
44. **Chiu, R.W., J.C. Jimenez, and C.A. Monnig**, *High molecular weight polyarginine as a capillary coating for separation of cationic proteins by capillary electrophoresis*. Analytica Chimica Acta, 1995. **307**(2-3): p. 193-201.

45. **Yao, Y.J. and S.F.Y. Li**, *Capillary zone electrophoresis of basic proteins with chitosan as a capillary modifier*. Journal of Chromatography A, 1994. **663**(1): p. 97-104.
46. **Liu, Q.C., F.M. Lin, and R.A. Hartwick**, *Poly(diallyldimethylammonium chloride) as a cationic coating for capillary electrophoresis*. Journal of Chromatographic Science, 1997. **35**(3): p. 126-130.
47. **Haselberg, R., G.J. de Jong, and G.W. Somsen**, *Capillary electrophoresis of intact basic proteins using noncovalently triple-layer coated capillaries*. Journal of Separation Science, 2009. **32**(14): p. 2408-2415.
48. **Liu, Q., et al.**, *Long-chained gemini surfactants for semipermanent wall coatings in capillary electrophoresis of proteins*. ELECTROPHORESIS, 2008. **29**(4): p. 871-879.
49. **Elhamili, A., et al.**, *Rapid capillary electrophoresis time-of-flight mass spectrometry separations of peptides and proteins using a monoquaternarized piperazine compound (M7C4I) for capillary coatings*. ELECTROPHORESIS, 2008. **29**(8): p. 1619-1625.
50. **Kelly, J.F., et al.**, *Development of electrophoretic conditions for the characterization of protein glycoforms by capillary electrophoresis—electrospray mass spectrometry*. Journal of Chromatography A, 1996. **720**(1–2): p. 409-427.
51. **Waterval, J.C.M., et al.**, *Capillary electrophoretic bioanalysis of therapeutically active peptides with UV and mass spectrometric detection after on-capillary preconcentration*. ELECTROPHORESIS, 2001. **22**(13): p. 2709-2716.
52. **Ullsten, S., et al.**, *A polyamine coating for enhanced capillary electrophoresis-electrospray ionization-mass spectrometry of proteins and peptides*. ELECTROPHORESIS, 2004. **25**(13): p. 2090-2099.
53. **Martma, K., et al.**, *Potential of polyE-323 coated capillaries for capillary electrophoresis of lipids*. Journal of Chromatography A, 2013. **1317**: p. 193-198.
54. **Garcia-Schwarz, G. and J.G. Santiago**, *Rapid High-Specificity microRNA Detection Using a Two-stage Isotachopheresis Assay*. Angewandte Chemie International Edition, 2013. **52**(44): p. 11534-11537.
55. **Mohan, D. and C.S. Lee**, *On-line coupling of capillary isoelectric focusing with transient isotachopheresis-zone electrophoresis: A two-dimensional separation system for proteomics*. Electrophoresis, 2002. **23**(18): p. 3160-3167.
56. **Larsson, M. and E.S.M. Lutz**, *Transient isotachopheresis for sensitivity enhancement in capillary electrophoresis-mass spectrometry for peptide analysis*. Electrophoresis, 2000. **21**(14): p. 2859-2865.
57. **Zhu, Z., J.J. Lu, and S. Liu**, *Protein separation by capillary gel electrophoresis: A review*. Analytica Chimica Acta, 2012. **709**(0): p. 21-31.
58. **Woolley, A.T. and R.A. Mathies**, *ULTRA-HIGH-SPEED DNA-SEQUENCING USING CAPILLARY ELECTROPHORESIS CHIPS*. Analytical Chemistry, 1995. **67**(20): p. 3676-3680.
59. **Ogston, A.G.**, *The spaces in a uniform random suspension of fibres*. Transactions of the Faraday Society, 1958. **54**(0): p. 1754-1757.

60. **de Gennes, P.G.**, *Reptation of a Polymer Chain in the Presence of Fixed Obstacles*. The Journal of Chemical Physics, 1971. **55**(2): p. 572-579.
61. **Smith, N.W. and M.B. Evans**, *THE ANALYSIS OF PHARMACEUTICAL COMPOUNDS USING ELECTROCHROMATOGRAPHY*. Chromatographia, 1994. **38**(9-10): p. 649-657.
62. **Terabe, S., et al.**, *ELECTROKINETIC SEPARATIONS WITH MICELLAR SOLUTIONS AND OPEN-TUBULAR CAPILLARIES*. Analytical Chemistry, 1984. **56**(1): p. 111-113.
63. **Terabe, S.**, *Capillary Separation: Micellar Electrokinetic Chromatography*, in *Annual Review of Analytical Chemistry*. 2009. p. 99-120.
64. **Shen, Y.F. and R.D. Smith**, *High-resolution capillary isoelectric focusing of proteins using highly hydrophilic-substituted cellulose-coated capillaries*. Journal of Microcolumn Separations, 2000. **12**(3): p. 135-141.
65. **Zhou, C.M.**, *Characterization of human papillomavirus by capillary isoelectric focusing with whole-column imaging detection*. Electrophoresis, 2013. **34**(20-21): p. 3046-3053.

II - Spectrométrie de masse appliquée à l'étude d'échantillons biologiques

1. Introduction

La spectrométrie de masse (MS) est une technique analytique offrant la possibilité de détecter, d'identifier et de quantifier les espèces composant l'échantillon à analyser en déterminant leur rapport masse/charge (m/z). La MS repose sur la séparation en phase gazeuse des espèces à analyser, préalablement ionisées, en fonction de leur rapport m/z . Certaines caractéristiques propres à la MS expliquent l'important développement de cette technique, pour un large éventail d'application :

- spécificité : les instruments actuels peuvent fournir les m/z avec une précision sur la mesure inférieure à 0,01 unité de masse atomique (uma)
- sensibilité de l'ordre de 10^{-12} moles
- possibilité d'analyser une large variété de molécules
- possibilité d'obtenir, dans une certaine mesure, des informations structurales sur la molécule

L'analyse en MS peut schématiquement se diviser en trois étapes distinctes : production d'ions à partir des analytes introduit dans la source, analyse du rapport m/z des ions, détection des ions. Un spectromètre de masse (MS) peut se diviser en quatre parties, qui vont chacune contribuer aux différentes étapes nécessaires à l'analyse MS :

- la source dans laquelle les espèces à caractériser sont nébulisées et ionisées
- l'interface qui assure la transmission des ions de la source vers l'analyseur
- l'analyseur de masse permettant de déterminer le rapport m/z de la molécule
- le détecteur assure la production de signaux électriques qui après intégration aboutiront au spectre de masse.

Les instruments en MS sont variés. En particulier il existe différents types de sources et d'analyseurs, dont chacun possède ses spécificités et ses limitations. Le choix du type d'instrument est par conséquent conditionné par le type d'analyte que l'on souhaite caractériser et la nature des données désirées. Dans ce paragraphe nous nous efforceront de décrire exclusivement les instruments utilisés dans le cadre des travaux de thèse présentés dans cet ouvrage.

2. Spectrométrie de masse à source d'ionisation électrospray

L'électronébullition ou électrospray (ESI) est un type de source couramment utilisée en MS. Le phénomène d'ionisation par ESI fut décrit par Malcolm Dole (1924 – 1990). Les travaux de son équipe avaient alors pour but de produire un faisceau d'ions de macromolécules chargées par ESI et dont la détection était assurée par l'intermédiaire d'une cage de Faraday [66]. A la suite de ces travaux, ce mode d'ionisation ne connu aucun développement pendant plus d'une quinzaine d'années. En 1984 l'équipe de John Fenn (1917 – 2010), prix Nobel de chimie en 2002, décrit l'utilisation d'une source similaire à celle de Dole comme source d'ionisation pour un spectromètre de masse et démontre la capacité de ce type de source à ioniser des macromolécules organiques [67].

La source ESI est particulièrement adaptée à l'ionisation de molécules polaires et thermosensibles. Ce mode d'ionisation, de par ses caractéristiques, est en partie à l'origine du succès de la spectrométrie de masse appliquée à l'étude d'échantillons biologiques (protéines, peptides...). L'ESI est un mode d'ionisation doux, les espèces ne sont pas fragmentées durant le processus d'ionisation ce qui permet de ne pas altérer la molécule. Une autre particularité de la source ESI est qu'elle génère des ions multichargés. Le développement de l'ESI a ainsi permis d'augmenter de manière importante la taille des espèces pouvant être analysées en MS, tout en utilisant des instruments dont la gamme de m/z est relativement limitée.

2.1. Source électrospray

En ESI, le processus d'ionisation consiste à produire de fines gouttelettes chargées à pression atmosphérique à partir de l'échantillon sous forme liquide. Les gouttelettes sont ensuite évaporées de leur solvant donnant les ions qu'elles contiennent nus en phase gazeuse. L'ESI est généralement obtenu en appliquant un fort champ électrique (entre 3 et 6 kV) entre un tube capillaire, guidant l'échantillon dans la source, et une contre électrode. Ces deux éléments le plus souvent sont séparés de plusieurs centimètres. Les débits d'injection d'échantillon en ESI sont communément compris entre 1 et 10 $\mu\text{L}/\text{min}$. L'ESI permet de travailler en ionisation positive et négative. Le processus d'ionisation en ESI peut ainsi se diviser en trois étapes successives :

- production de gouttelettes chargées
- division des gouttelettes chargées en fines gouttelettes
- émission des ions en phase gazeuse

2.1.1. Production de gouttelettes chargées

Le champ électrique de forte intensité, appliqué entre le capillaire et la contre électrode entraine une accumulation de charges à la surface du liquide présent à l'extrémité du capillaire. Cette accumulation de charges à l'extrémité du capillaire provoque donc une perturbation de la surface du liquide qui prend la forme d'un cône appelé cône de Taylor [68, [69]. Sous la contrainte du champ électrique le cône finit par céder aboutissant à la formation de gouttelettes chargées possédant un nombre important de charges au niveau de leur surface (figure 7). Afin d'augmenter la stabilité du spray, en particulier dans le cadre de couplage avec la chromatographie liquide, un gaz de nébulisation est employé (généralement de l'azote). Celui-ci est coaxial au flux de liquide arrivant dans la source.

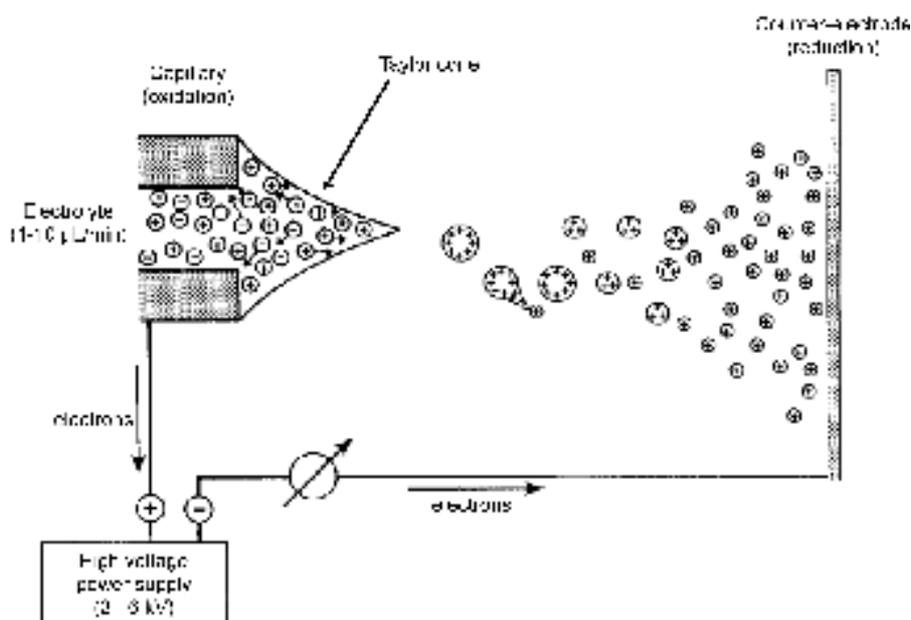


Figure 7. Représentation schématique décrivant la production de gouttelettes chargées dans le processus d'ionisation en ESI. Adapté à partir de [70].

2.1.2. Division des gouttelettes chargées

La gouttelette *parent*, libérée du cône de Taylor, voit son rayon rapidement réduit en raison de l'évaporation du solvant. Cette évaporation est facilitée en chauffant l'atmosphère présente dans la source ou bien par diminution de la pression, la charge nette de la gouttelette demeurant constante. La taille de la gouttelette diminue ainsi jusqu'à atteindre son rayon critique de Rayleigh. L'équation de Rayleigh permet de relier le rayon critique de la gouttelette à sa charge [71] :

$$q = 8\pi\sqrt{(\epsilon_0\gamma R^3)} \quad (16)$$

Avec q la charge de la gouttelette, ϵ_0 la permittivité du vide, γ la tension superficielle du liquide, R le rayon critique de Rayleigh

Lorsque le rayon critique est atteint, les répulsions Coulombiennes entre les charges présentent dans la gouttelette surpassent la tension de surface du liquide entraînant une explosion de la gouttelette *parent* en plusieurs gouttelettes *filles*. Les gouttelettes filles ont des dimensions hétérogènes, elles subissent à leur tour une cascade d'explosions Coulombiennes sous l'effet de l'évaporation du solvant qu'elles contiennent [68, [70].

2.1.3. Emission des ions en phase gazeuse

Les mécanismes qui permettent d'expliquer la formation d'ions en phase gazeuse à partir de fines gouttelettes ne sont à l'heure actuelle pas complètement connus. Deux mécanismes sont avancés pour expliquer ce phénomène :

a) Le modèle de Dole

Ce modèle est le premier qui fut avancé pour interpréter l'émission d'ions en phase gazeuse à partir de liquide. Dans ce modèle, la cascade de fissions subies par les gouttelettes aboutit à la formation d'une gouttelette contenant seulement un seul ion (figure 8). L'évaporation du solvant résiduel entraîne l'émission de l'ion nu à présent en phase gazeuse [66]. Cette théorie est également soutenue par des travaux de Röllgen [72].

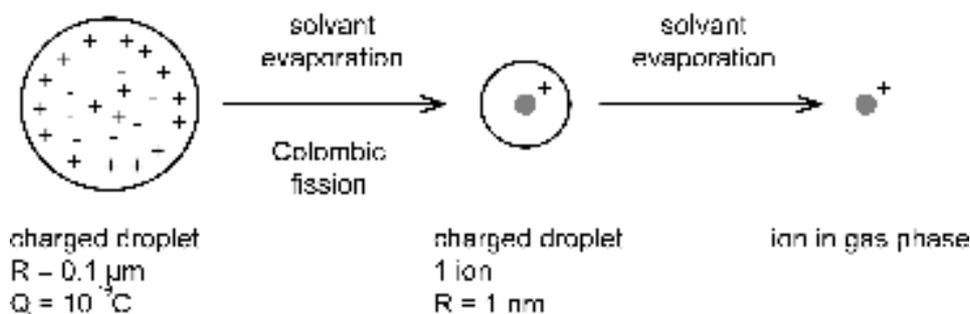


Figure 8. Représentation schématique illustrant l'émission des ions en phase gazeuse selon le modèle de Dole. D'après les travaux de thèse d'E. Leize-Wagner [73].

b) Le modèle d'Iribarne-Thomson

Dans ce modèle, les ions sont obtenus en phase gazeuse, non par évaporation comme pour le modèle de Dole, mais par émission à partir d'une gouttelette de faible diamètre possédant une densité de charge élevée. Lorsque la densité de charge est suffisamment importante, la gouttelette formée tend à émettre des ions dans l'atmosphère de la source. Cette émission d'ions entre en compétition avec l'explosion coulombienne dont l'occurrence est réduite si ce n'est stoppé. Pour ce modèle, il n'est pas nécessaire de produire des gouttelettes suffisamment petites pour contenir un seul ion [74].

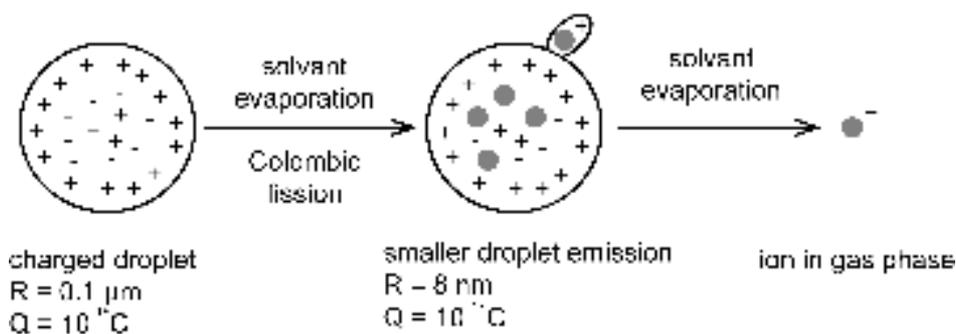


Figure 9. Représentation schématique illustrant l'émission des ions en phase gazeuse selon le modèle d'Iribarne-Thomson. D'après les travaux de thèse d'E. Leize-Wagner [73].

2.1.4. Intérêts des sources nano electrospray

Le développement de l'ESI a notamment permis l'application de la MS aux molécules organiques polaires de plus en plus complexes, y compris les peptides et les protéines. L'étude d'échantillons biologiques nécessite l'utilisation de tampons spécifiques dont les concentrations sont significatives. Ces tampons sont ionisés durant le processus d'ESI au même titre que les espèces à analyser ; ce qui tend à créer une compétition à l'ionisation entre les différentes espèces présentes dans l'échantillon aussi appelé phénomènes de suppression d'ions [75]. Les effets de suppressions d'ions diminuent la sensibilité du signal, en diminuant le rendement d'ionisation des analytes. Une autre des limitations de l'ESI est la quantité d'échantillon nécessaire pour réaliser une acquisition, celle-ci est relativement importante et s'oppose à la sensibilité délivrée par le spectromètre. Elle peut s'avérer rédhibitoire pour l'analyse d'échantillons dont la quantité disponible est limitée.

En 1994, les travaux d'Emmet et Caprioli décrivent le développement d'une source dite micro-electrospray. Cette source permet de produire un ESI stable pour des débits de travail compris entre 300 et 800 nL/min. Ces travaux montrèrent que la mise en œuvre d'une source miniaturisée permet d'augmenter de manière significative la sensibilité du signal MS tout comme le rapport signal/bruit dans le cadre d'étude de protéines [76].

Peu après, Mann et Wilm ont décrit l'utilisation d'une source capable de produire un nano electrospray (nanoESI). La source nanoESI décrite, réalise des injections d'échantillons dans le spectromètre de masse avec des débits inférieures à 25 nL/min [77]. Ils ont pu démontrer que l'utilisation de ce type de source permet en plus d'améliorer la qualité du signal MS, de diminuer les effets de suppression d'ions dus aux sels contenus dans l'échantillon et de réaliser des acquisitions prolongées même dans le cadre d'échantillons disponibles en faibles quantités, 1 µL d'échantillons devenant alors suffisant pour maintenir l'acquisition pendant 30 min.

Les sources nanoESI utilisent pour injecter l'échantillon un capillaire dont le diamètre interne est compris entre 1 et 10 μm . Ce faible diamètre engendre la production de gouttelettes parents de faibles rayons par rapport à une source ESI standard. Ces gouttelettes plus fines subissent plus facilement le phénomène d'explosion coulombienne ce qui mécaniquement augmente le rendement d'ionisation globale des analytes contenus à l'intérieur de celle-ci. Parallèlement au développement de cette source, Mann et Wilm se sont également efforcés à modéliser le cône de Taylor émettant les gouttelettes chargées dans la source afin d'interpréter les effets bénéfiques sur les performances d'ionisation grâce à la miniaturisation de la source ESI. Le débit d'injection de l'échantillon joue un rôle important sur le rendement d'ionisation de la source. A partir de l'équation de Bernoulli, ils ont pu montrer que le rayon d'émission des gouttelettes est proportionnel à $d^{2/3}$ (d étant le débit d'injection de l'échantillon). La conséquence directe de cette équation est que la réduction du débit d'injection tend à réduire le rayon d'émission des gouttelettes dont le flux va être correctement focalisé vers l'entrée de la MS [77].

Dans son principe de fonctionnement, la source nanoESI reste globalement similaire à une source ESI conventionnelle. Le capillaire permettant de guider l'échantillon dans la source est un capillaire en borosilicates dont l'extrémité est portée à haute température puis effilée de sorte que son diamètre interne à l'extrémité soit minimal (1-10 μm). L'extrémité du capillaire prend alors la forme d'une aiguille qui va favoriser la formation du cône de Taylor [78]. La distance entre le capillaire et l'entrée du spectromètre est réduite, généralement entre 2 mm et 1 cm. Compte tenu de cette proximité, il n'est pas nécessaire d'utiliser une assistance pneumatique que ce soit pour la stabilité du spray ou l'injection de l'échantillon. En raison du haut rendement d'ionisation obtenu et de son impact positif sur la sensibilité du signal, les sources nanoESI se sont largement développées aussi bien pour l'injection directe d'échantillons en nanoESI que dans le cadre de couplages avec une méthode séparative tel que la nano chromatographie liquide (nanoLC).

2.1.5. Nature des ions générés en ESI

L'ESI est capable de produire aussi bien des ions négatifs et positifs en fonction du mode de travail utilisé. En mode de détection positif, les ions produits sont issus :

- de la protonation des sites basiques présents sur la molécule à analyser
- adjonction d'un cation à une molécule neutre entraînant l'apparition d'une charge positive (Na^+ , K^+ , NH_4^+ , Li^+ , Ca^{2+})
- perte d'un contre-ion négatif

Dans le cadre d'une analyse MS en mode de détection négatif, les ions peuvent être générés de différentes manières également :

- déprotonation des fonctions acides et alcool présentes sur la molécule
- adjonction d'un anion sur une molécule neutre entraînant l'apparition d'une charge négative
- Perte d'un contre-ion positif

L'une des particularités de l'ionisation par ESI est qu'elle permet de générer des ions multichargés. La molécule doit posséder plusieurs sites capables de s'ioniser, il est donc tout à fait concevable que des ions monochargés puissent être générés en ESI. Les états de charges ainsi que la distribution des états de charge coexistant sont conditionnés par les conditions expérimentales : nombre de sites ionisables présent sur la molécule, pH de la solution, température de la source, débit d'introduction de l'échantillon, valeur de la tension appliquée pour produire l'ESI, utilisation d'un tampon dénaturant dans le cadre d'analyse de protéines.

2.1.6. Interprétation des spectres de masse en ESI

En ESI-MS, pour une molécule donnée, un spectre de masse est composé de plusieurs pics ; chacun correspondant à un des états de charge générés. La distribution des différents états de charge détectés est centrée autour d'une valeur moyenne.

Les valeurs obtenues à partir du spectre de masse correspondent au rapport m/z , elles correspondent donc à la masse de la molécule ionisée en ESI divisé par l'état de charge correspondant.

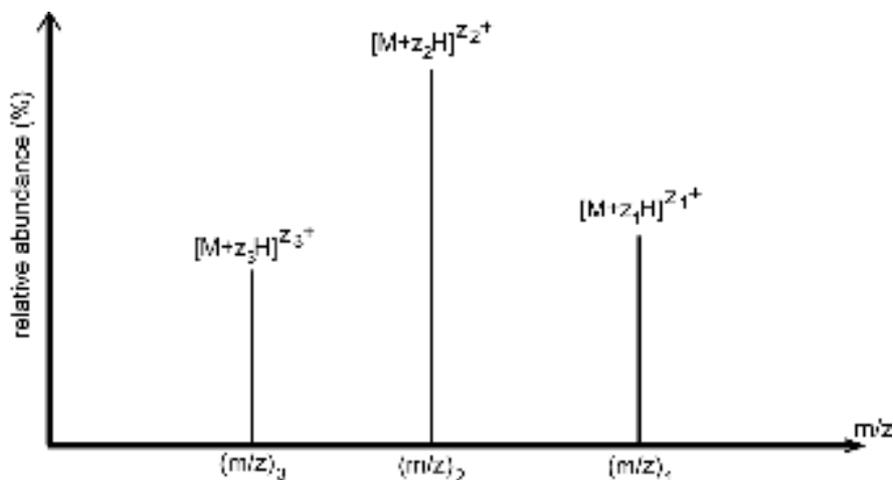


Figure 10. Spectre de masse modèle obtenu en ESI-MS illustrant la détection de plusieurs états de charge consécutifs pour une même molécule.

Dans le cas d'une ionisation par protonation, le plus fréquemment observé en mode positif, la valeur lue sur le spectre de masse correspond par conséquent à l'addition de la masse de la molécule et du nombre de protons incorporés durant l'ionisation ; le nombre de protons induisant aussi l'état de charge détecté.

Afin de pouvoir déterminer la masse moléculaire de l'analyte, il est nécessaire de pouvoir détecter au moins deux états de charges. La figure 10 présente un spectre ESI-MS théorique dans lequel trois états de charges consécutifs sont détectés.

Il est ainsi possible d'établir un système sous la forme suivante :

$$\left(\frac{m}{z}\right)_1 = \frac{M + z_1 X}{z_1}$$

$$\left(\frac{m}{z}\right)_2 = \frac{M + z_2 X}{z_2}$$

Dans le cas d'une protonation $X=1,0078$ Da. Les pics 1 et 2, considérés dans ce cas, sont consécutifs. Par conséquent :

$$z_2 = z_1 + 1$$

Ce système peut être résolu par substitution, ce qui permet d'en déduire les états de charge détectés ainsi que la masse de l'ion M.

2.2. Interfaces

On désigne par interface, la partie du spectromètre de masse qui assure l'acheminement des ions produits dans la source, dont l'environnement est à pression atmosphérique, et l'analyseur qui lui est soumis à un vide poussé. Pour cette raison, les interfaces sont généralement divisées en plusieurs sections, la pression à l'intérieur des différentes sections est graduellement réduite pour atteindre progressivement la pression appliquée dans l'analyseur de masse. Les ions sont ainsi guidés de la source vers l'analyseur de masse par les effets cumulés, de la différence de pression entre deux sections et de potentiels électriques appliqués par l'intermédiaire de lentilles électrostatiques. L'interface inclut également les éléments permettant la sélection et la fragmentation des ions, utilisés dans les expériences de spectrométrie de masse en tandem (MS/MS). L'interface joue par conséquent un rôle important dans l'analyse MS. La sensibilité du signal est tributaire de son efficacité ; celle-ci doit maintenir focalisés les ions produit afin d'éviter leur perte durant le passage de la source à l'analyseur.

Les interfaces ont connu un grand nombre de développements techniques dans le but d'améliorer leur efficacité. Le paragraphe suivant s'attache à détailler deux types d'interfaces qui ont pu être utilisées dans le cadre des travaux présentés dans cet ouvrage.

a) Interface du spectromètre microTOF-Q II (Bruker Daltonics)

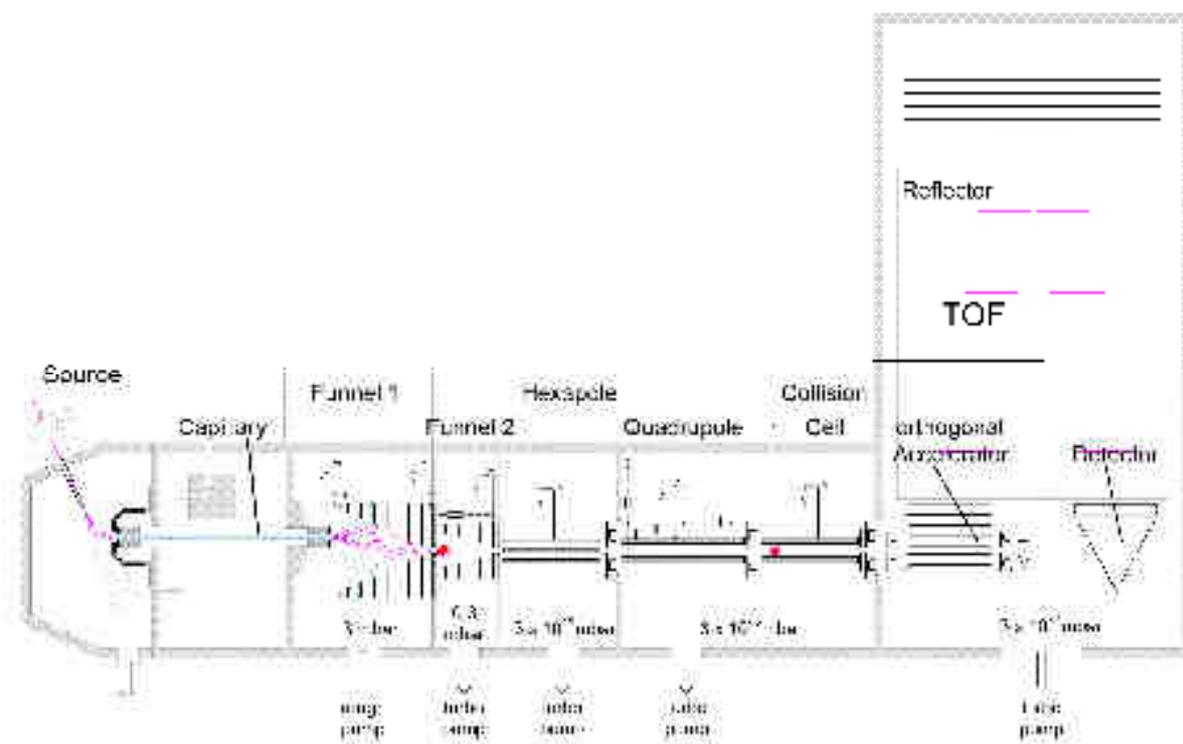


Figure 11. Représentation schématique du spectromètre de masse microTOF-Q II (Bruker Daltonics) détaillé les différentes régions composant l'interface de l'instrument.

L'interface du microTOF-Q II possède plusieurs éléments caractéristiques : le capillaire de transfert (capillary) se présente sous la forme d'un tube en verre dont l'axe est vide (figure 11). Les ions, partiellement libérés des molécules de solvant, traversent le capillaire de transfert sous l'effet d'une différence de potentiel. Un gaz séchant, généralement de l'azote, circule aussi au travers du capillaire de transfert dans le sens inverse au déplacement des ions. Ce système permet d'évaporer les molécules de solvant résiduelles.

L'interface est également composée d'un système de lentilles électrostatiques (funnel). Ces lentilles ont pour fonction de focaliser le flux d'ions et d'éliminer les dernières molécules neutres résiduelles. Le champ électrique formé par les lentilles n'est pas homogène et entraîne les ions vers la sortie du funnel située au centre de la dernière lentille. L'axe du capillaire de transfert et du funnel 1 sont décalés afin que les molécules neutres non éliminées, ne subissent l'effet du champ électrique dans le funnel, heurtent une des lentilles électrostatiques et soit ainsi éliminée tandis que les ions sont guidés par le champ électrique appliqué vers le centre du funnel.

L'hexapôle positionné dans la région consécutive aux funnels permet la focalisation du flux d'ions et l'ajustement de leurs énergies cinétiques.

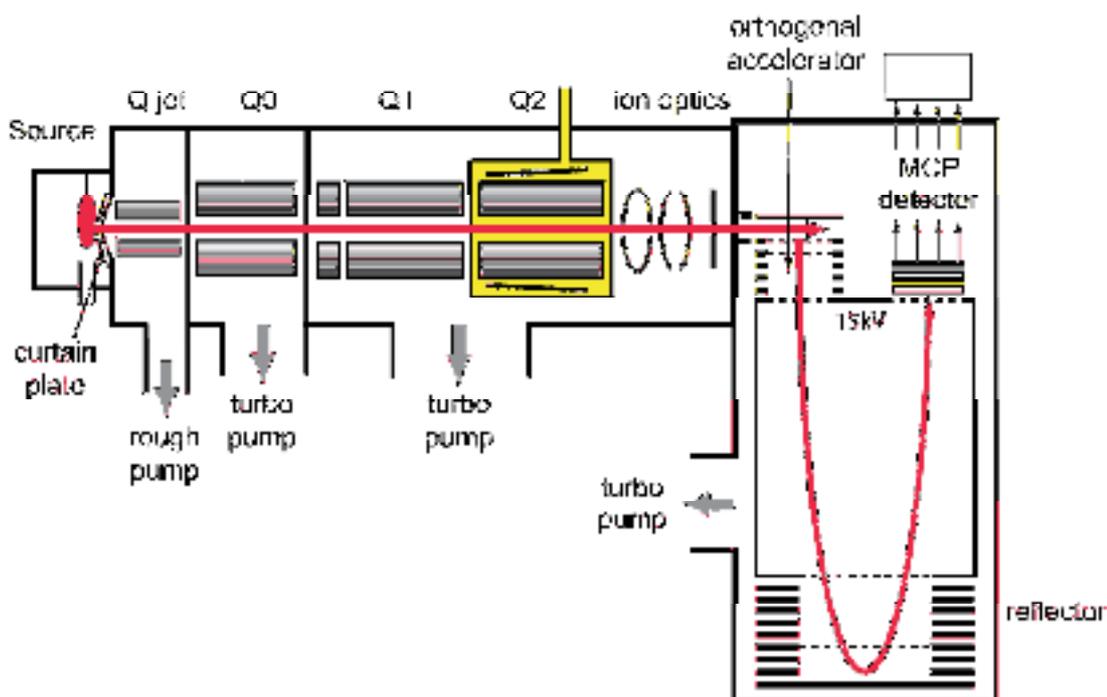
b) Interface du spectromètre TripleTOF® 5600 *plus* (AB Sciex)

Figure 12. Représentation schématique du spectromètre de masse 5600 *plus* (AB Sciex) détaillé les différentes régions composant l'interface de l'instrument.

L'interface du 5600 *plus* utilise un gaz rideau (curtain gas) afin d'éliminer les molécules de solvant résiduel. Le flux de gaz rideau circule directement au dos de la curtain plate (figure 12), ce flux d'azote de débit non négligeable (jusqu'à 22 L/min) est orthogonale au déplacement des ions issus de la source. Le Q jet est un quadripôle dont la fonction est d'impulser une énergie cinétique relativement importante aux ions débarrassés des molécules de solvant. Le vide appliqué dans cette région est intermédiaire entre la pression atmosphérique et le vide poussé appliqué aux autres régions de l'interface du spectromètre.

L'optique électrostatique positionnée directement en amont de l'analyseur à temps de vol a pour rôle de focaliser les ions, potentiellement fragmentés, avant leur entrer dans l'analyseur de masse.

2.3. Les analyseurs de masse

Les ions émis en phase gazeuse et débarrassés de leur solvant sont transférés vers l'analyseur de masse dont la fonction principale est de déterminer le rapport m/z de cet ion. Il existe une grande variété d'analyseurs de masse qui diffèrent notamment par les principes physiques utilisés pour séparer les ions et déterminer leur valeur du rapport m/z . Chaque type d'analyseur possède des caractéristiques qui lui sont propres (gamme de masse, résolution...) et qui conditionnent en partie le type d'application compatible. Le tableau 2 dresse une liste

des analyseurs de masse compatible avec l'ESI ainsi que leurs principales caractéristiques actuelles.

Type analyseur	Gamme de m/z	Résolution	Précision mesure	Pression dans l'analyseur (Pa)
Secteur magnétique (B)	0 – 15000	50000	< 5 ppm	10^{-5}
Quadripôle (Q)	15 – 2000	1000 - 6000	100 ppm	10^{-3}
Piège à ions (IT)	0 - 4000	5000 - 30000	< 100 ppm	10^{-3}
Temps de vol (TOF)	0 – 25000	5000 – 75000	< 2 ppm	10^{-7}
Secteur électrostatique (Orbitrap)	15 - 4000	15000 - 150000	< 1 ppm	10^{-7}
Résonance cyclotronique (ICR)	100 - 10000	20000 - 10^6	< 1 ppm	10^{-7}

Tableau 2. Récapitulatif des principaux analyseurs de masse accompagnés de leurs principales caractéristiques typique délivrées par les instruments actuels.

Le paragraphe suivant décrit les analyseurs qui ont pu être utilisés dans le cadre de ces travaux de thèse.

2.3.1. Analyseurs quadripolaire

L'analyseur quadripolaire ou filtre de masse quadripolaire est constitué de quatre électrodes parallèles, de sections circulaires ou hyperboliques, positionnées de part et d'autre d'un axe commun (figure 13).

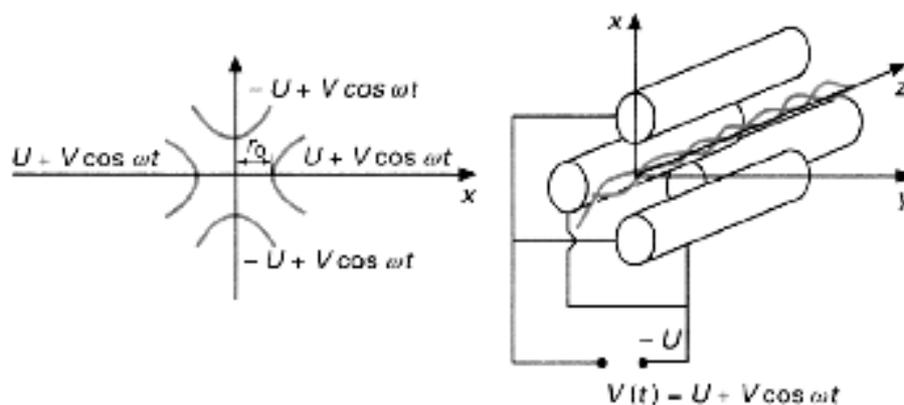


Figure 13. Représentation schématique sous différentes vues d'un analyseur quadripolaire.

Un potentiel est appliqué entre les électrodes du quadripôle de sorte que le potentiel des électrodes opposées soit de même polarité tandis que les électrodes adjacentes ont des polarités différentes (figure 13). Il est possible d'appliquer un potentiel constant U ou encore

un potentiel alternatif de radio fréquence $V \cos \omega t$. Le potentiel électrique Φ dans le plan xOy s'exprime alors sous la forme :

$$\Phi = (U - V \cos \omega t) \frac{(x^2 - y^2)}{r_0^2} \quad (17)$$

Il est possible à partir de cette équation d'exprimer la trajectoire d'un ion de masse m et de charge ze pénétrant dans le champ quadripolaire. Les différentes composantes de la trajectoire de l'ion dans le quadripôle sont totalement découplées on obtient ainsi les expressions :

$$\frac{d^2x}{dt^2} + \frac{2xze(U - V \cos \omega t)}{mr_0^2} = 0 \quad (18)$$

$$\frac{d^2y}{dt^2} - \frac{2yze(U - V \cos \omega t)}{mr_0^2} = 0 \quad (19)$$

$$\frac{d^2z}{dt^2} = 0 \quad (20)$$

En introduisant les variables suivantes :

$$\zeta = \frac{\omega t}{2} \quad (21)$$

$$a_x = -a_y = \frac{8zeU}{mr_0^2 \omega^2} \quad (22)$$

$$q_x = -q_y = \frac{4zeZ}{mr_0^2 \omega^2} \quad (23)$$

On obtient pour les équations (18) à (20), les expressions suivantes :

$$\frac{d^2x}{d\zeta^2} + x(a_x - 2q_x \cos 2\zeta) = 0 \quad (24)$$

$$\frac{d^2y}{d\zeta^2} - y(a_y - 2q_y \cos 2\zeta) = 0 \quad (25)$$

$$\frac{d^2z}{d\zeta^2} = 0 \quad (26)$$

Les équations exprimant la trajectoire d'un ion dans le champ quadripolaire sont appelées équations de Mathieu. Leurs résolutions permettent de mettre en évidence deux types de trajectoires :

- Les trajectoires pour lesquelles l'ion se déplace sur les axes x et y en effectuant des oscillations dont l'amplitude maximale est inférieure à r_0 ce qui se traduit expérimentalement par le passage de l'ion au travers du filtre quadripolaire.

- Les trajectoires instables pour lesquelles l'amplitude d'oscillations sur les axes x et y augmente de manière exponentielle au cours de l'avancée de l'ion dans le quadripôle. L'amplitude d'oscillations devient alors trop importantes et entraînent la perte de l'ion par collision sur l'une des électrodes.

Le plus communément, on modélise l'ensemble des solutions dans un diagramme de stabilité (figure 14).

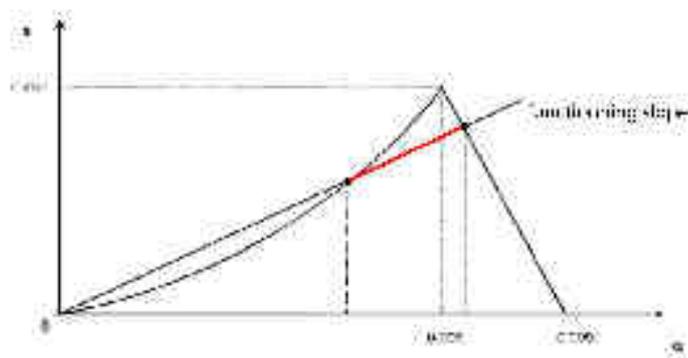


Figure 14. Diagramme de stabilité d'un analyseur de masse quadripolaire, en rouge est représenté l'intersection entre la droite de fonctionnement et le domaine de stabilité.

Pour U , V , ω et r_0 fixés tous les ions dont le rapport m/z est équivalent sont modélisés sur le diagramme par le même point. L'ensemble des points décrivant chaque rapport m/z forme la droite de fonctionnement. Le quadripôle est ainsi capable de transférer les ions formant l'intersection entre la droite de fonctionnement et le domaine de stabilité (figure 14). La conséquence directe est que la gamme de m/z est conditionnée par le rapport $\frac{U}{V}$. La séparation des ions et la mesure de leur rapport m/z sont assurés en faisant varier les tensions U et V tout en maintenant le rapport $\frac{U}{V}$ constant. Le quadripôle transfère alors les ions par ordre de m/z croissant. Le spectre de masse est obtenu en balayant progressivement l'ensemble de la gamme du domaine de fonctionnement.

L'amplitude maximale d'oscillations des ions dans le filtre de masse est limitée par r_0 ce qui explique que la gamme de m/z pouvant être analysée par ce type d'analyseur soit limitée (10 – 4000 généralement) toutefois les progrès techniques permettent d'augmenter celle-ci jusqu'à 6000 u . L'analyseur quadripolaire est le plus communément utilisé. La gamme de m/z est compatible avec un grand nombre d'application, notamment dans le cadre d'analyse de petites molécules, et sa sensibilité est compatible avec l'analyse de traces. Enfin sa facilité d'utilisation et d'entretien explique également ce succès.

Les caractéristiques de fonctionnement du filtre quadripolaire, notamment son action en tant que filtre de masse, ont poussé l'utilisation du quadripôle pour la spectrométrie de masse en tandem (MS/MS). En effet en MS/MS, un filtre quadripolaire est utilisé en amont de la

fragmentation pour assurer la sélection de l'ion parent. Le quadripôle transfère alors à la cellule de collision uniquement le rapport m/z de l'ion sélectionné.

2.3.2. L'analyseur à temps de vol

L'analyseur à temps de vol (TOF) est un analyseur dont le principe de fonctionnement est relativement simpliste. Cet analyseur de masse est constitué d'un tube de vol dont l'atmosphère interne est placée sous un vide poussé (on parle d'*ultra high vacuum*, de l'ordre de 10^{-7} mbar) et d'un dispositif positionné à l'entrée du tube permettant d'initier le mouvement des ions dans le tube de vol : généralement un système de lentille électrique permettant d'appliquer un champ électrique très intense (plusieurs kV) sur une courte distance. Les ions sont accélérés par une différence de potentiel E , il acquiert ainsi une énergie cinétique qui s'exprime :

$$E_c = \frac{mv^2}{2} = zE \quad (27)$$

D'où l'expression de la vitesse de l'ion :

$$v = \sqrt{\frac{2zE}{m}} \quad (28)$$

Le temps nécessaire à l'ion, en considérant sa vitesse constante, pour traverser un tube de longueur L s'exprime alors :

$$t = L \sqrt{\frac{m}{2zE}} \quad (29)$$

$$\Leftrightarrow \frac{m}{z} = 2E \left(\frac{t}{L}\right)^2 \quad (30)$$

Les ions parcourent la longueur du tube de vol qui n'est soumis à aucune perturbation (électrique ou magnétique). Le rapport m/z est ainsi déduit par la mesure du temps de vol propre à chaque ion dans l'analyseur. Les ions possédant un rapport m/z faible arriveront au détecteur les premiers tandis que ceux dont le rapport m/z est plus important mettront plus de temps pour atteindre le détecteur (figure 15).

Depuis l'introduction des analyseurs de masse TOF, diverses améliorations technologiques ont été apportées. Les analyseurs TOF actuels possèdent deux modes de fonctionnement : le mode linéaire et le mode réflectron. En mode linéaire les ions traversent directement le tube de vol et se dirigent vers le détecteur. Le mode réflectron se distingue par l'utilisation d'un réflecteur électrostatique. Le réflectron est composé d'une série d'électrodes annulaires dont le rôle est de créer un champ électrique dans un espace limité du tube de vol.

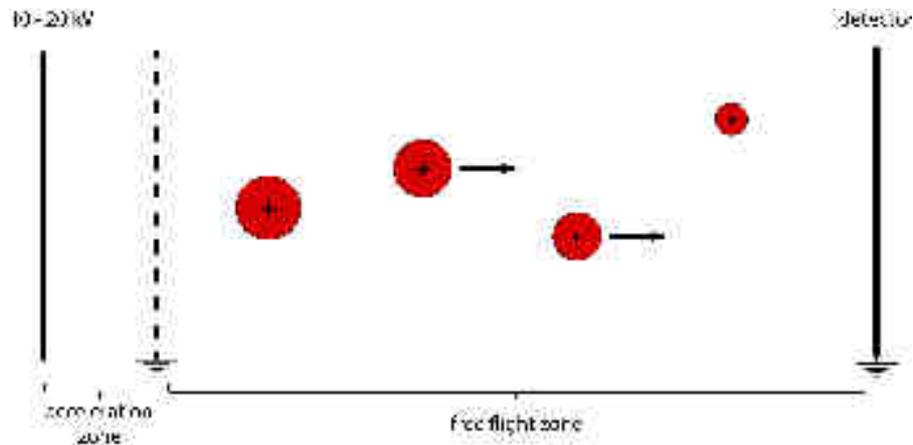


Figure 15. Représentation schématique du principe de fonctionnement d'un analyseur de masse de type TOF.

Ce champ électrique a deux fonctions distinctes :

- Refocaliser les ions possédant le même m/z et ainsi limiter les effets de dispersion en énergie cinétique qui peuvent être inhérents au transfert des ions dans le tube de vol.
- Augmenter le trajet effectué par les ions dans le tube de vol afin d'augmenter la précision sur la mesure de masse et la résolution.

Les ions légers pénètrent moins dans le champ électrique formé dans le réflecteur par rapport aux ions dont la masse est plus importante.

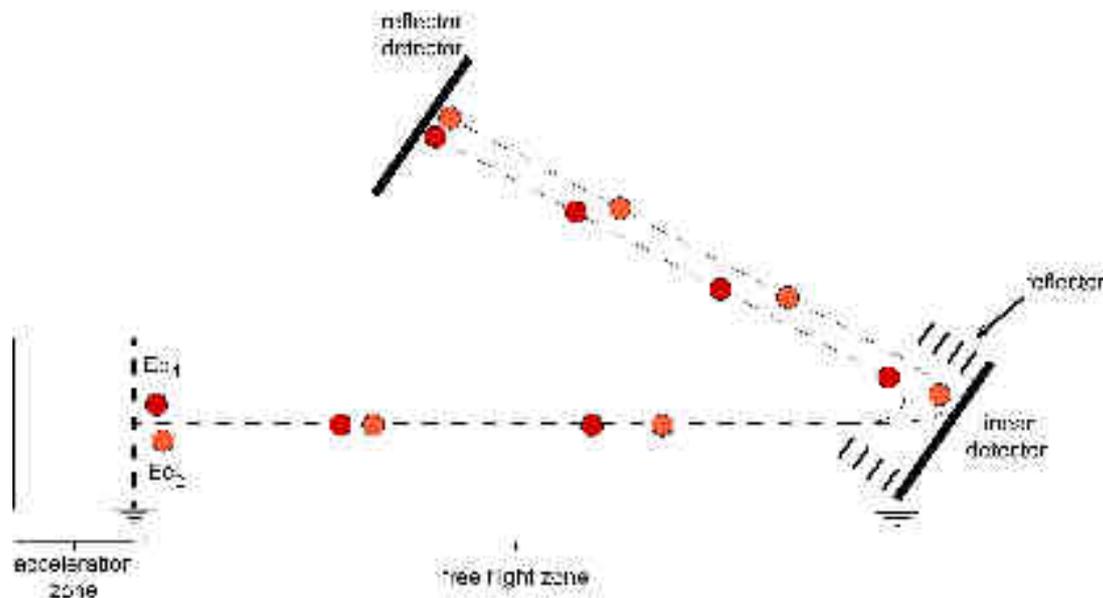


Figure 16. Représentation schématique du fonctionnement d'un analyseur TOF équipé d'un réflecteur électrostatique. Les ions représentés possèdent le même m/z et des énergies cinétiques sensiblement différentes ($E_{c1} < E_{c2}$). Adapté des travaux de thèse d'E. Wagner [79].

De la même manière le réflectron permet de corriger de faibles différences d'énergies cinétiques qui peuvent exister entre deux ions de même m/z . Le réflectron oriente ensuite la course des ions en direction du détecteur (figure 16).

D'un point de vue théorique, le TOF possède une gamme de masse analysable illimitée. Sur les instruments disponibles elle est toutefois bridée afin de maintenir une précision sur la mesure de masse et une résolution importante (jusqu'à m/z 25000). Cette particularité explique que le TOF fut longtemps l'analyseur de choix pour les molécules de masses moléculaires importantes et plus particulièrement les bio-molécules, d'autant plus que la résolution et la précision sur la mesure de masse en font actuellement un instrument d'ultra-haute résolution (c.f. tableau 2). Toutefois d'autres types d'analyseurs de masse ont depuis montré leur intérêt pour la caractérisation de bio-molécules par MS, orbitrap ou FT-ICR en sont des exemples.

2.4. Les détecteurs

2.4.1. Types de détecteurs utilisés en MS

Le rôle du détecteur est de convertir la mesure de m/z effectuée par l'intermédiaire de l'analyseur de masse en signal électrique qui pourra être traité dans le but de générer le spectre de masse. Les ions issus de l'analyseur sont captés par le détecteur qui produit un signal électrique incident. On distingue deux grandes catégories de détecteur en fonction de leur principe de fonctionnement : collecteur de Faraday et les multiplicateurs d'électrons. A l'exception d'analyse isotopique, le collecteur de Faraday est marginalement utilisé comme détecteur du fait de sa sensibilité inférieure. Les multiplicateurs d'électrons équipent largement les spectromètres de masse, il en existe différents types :

- Multiplicateur d'électrons à dynodes discrètes
- Multiplicateur d'électrons channeltron
- Multiplicateur d'électrons à galette de micro-canaux (détecteur MCP)
- Multiplicateur d'électrons à post-accélération
- Hybride à galette de micro-canaux et scintillateur

Les spectromètres de masse utilisés dans le cadre des travaux présentés dans cet ouvrage sont équipés de détecteurs MCP.

2.4.2. Détecteur multiplicateur d'électrons à galette de micro-canaux

Le détecteur MCP est constitué d'un nombre très important de micro-canaux en silice parallèles et indépendant. Ces canaux sont assemblés en juxtaposition de sorte à former une galette. La distribution des micro-canaux sur la section de la galette est régulière et dense (figure 17).

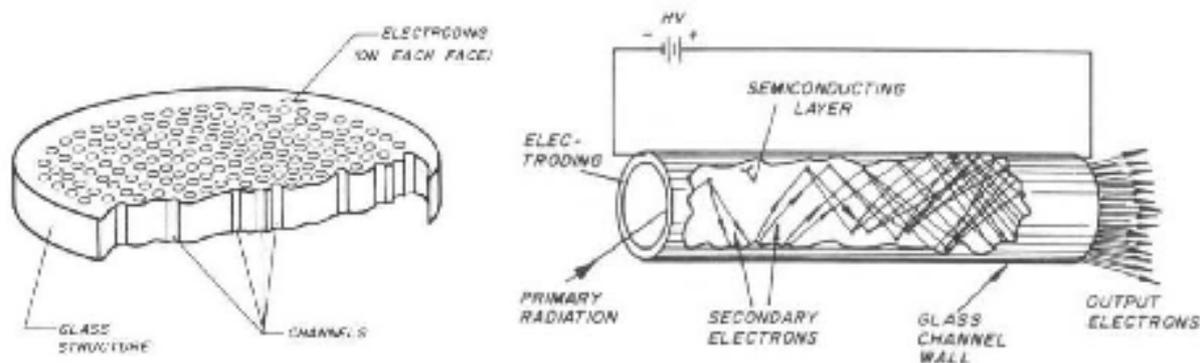


Figure 17. Représentation schématique d'une galette formée dans un détecteur MCP (gauche). Représentation d'un capillaire droit constituant le détecteur MCP (droite) [80].

La silice constituant les canaux est traitée au préalable. Une différence de potentiel importante est appliquée aux extrémités des canaux afin de faciliter l'émission d'électrons secondaires. Lorsqu'un ion issu de l'analyseur entre en contact avec les parois d'un micro-canal, il entraîne l'émission d'un électron secondaire. Cet électron secondaire va alors heurter à son tour la paroi du capillaire et entraîner l'émission d'autres électrons de plus faible énergie. La différence de potentiel appliquée aux extrémités des micro-canaux permet d'accélérer ces électrons qui vont à leur tour provoquer l'émission d'électrons. On mesure le courant généré par les électrons secondaires émis dans le détecteur. La galette est positionnée en biais par rapport au trajet des ions issus de l'analyseur de masse pour favoriser leur contact avec la paroi du capillaire. Le détecteur MCP possède un gain compris entre 10^3 et 10^4 . Ce gain important s'explique par l'importante surface offerte par les micro-canaux pour l'émission d'électrons secondaires. Ce détecteur est particulièrement adapté aux analyseurs à temps de vol. Il est possible d'équiper le détecteur de deux galettes positionnées en quinconce afin d'augmenter le gain du signal.

2.5. Spectrométrie de masse en tandem (MS/MS)

2.5.1. Définition

La spectrométrie de masse en tandem (MS/MS) consiste à mesurer le rapport m/z de la molécule à caractériser puis d'induire sa fragmentation dans une cellule de collision et de mesurer le rapport m/z des fragments générés. La MS/MS a permis d'ouvrir un champ important d'application : des fragments spécifiques peuvent être recherchés afin de confirmer la nature de la molécule caractérisée, des informations structurales peuvent également être déduites des données MS/MS. A l'exception du piège à ions, il n'est pas possible de réaliser la fragmentation et la mesure de la masse des fragments par l'intermédiaire d'un unique analyseur de masse. Pour pallier à cette limitation, des analyseurs de masse hybrides ont été introduits : à titre d'exemple les spectromètres de masse de type Q-TOF combinent un filtre

quadripolaire, qui permet de sélectionner le rapport m/z correspondant uniquement à l'ion que l'on souhaite fragmenter. Entre le quadripôle et le TOF, une cellule de collision est placée pour réaliser la fragmentation, les fragments obtenus sont transférés à l'analyseur TOF afin d'en déduire les rapports m/z des fragments générés. En analyse MS, Le scan de la gamme complète de m/z est assuré par l'analyseur à temp de vol, le quadripôle transfère alors l'ensemble des ions de la gamme de travail.

Différents types de fragmentation peuvent être employés en MS/MS, ces modes de fragmentations se distinguent notamment par le principe physique mis en œuvre pour générer les fragments. De plus, ces modes de fragmentation se distinguent par la gamme d'énergies pouvant être communiquées à l'ion parent durant la fragmentation. En effet selon le type de fragmentation utilisé, les fragments générés pourront différer du fait de la quantité d'énergie communiquée. Les principaux modes de fragmentation sont les suivants :

- Fragmentation en source (*in-source fragmentation*, ISD) [81]
- Dissociation induite par collision (*collision induced dissociation*, CID) [82]
- Dissociation par capture d'électrons (*electron capture dissociation*, ECD) [83]
- Dissociation par transfert d'électrons (*electron transfer dissociation*, ETD) [84]
- Photodissociation [85]

Dans le cadre des travaux de thèse présentés dans cet ouvrage, seule la dissociation induite par collision a été mis en œuvre. Par conséquent il a été choisi de détailler uniquement le mode de fonctionnement de ce type de fragmentation.

2.5.2. Dissociation induite par collision

La collision induite par fragmentation (CID) est le mode de fragmentation le plus couramment utilisé en MS/MS. Les ions traversent la cellule de collision et rencontrent un flux orthogonal de gaz inerte (hélium, argon ou azote généralement). Les molécules de gaz entrent en collision avec les ions provoquant leur fragmentation. Les énergies de ces collisions sont relativement faibles (quelques dizaines d'eV) mais suffisantes pour engendrer la rupture de liaisons covalentes et de liaisons faibles. L'énergie de collision peut être ajustée en faisant varier l'énergie cinétique de l'ion transféré au travers de la cellule de collision, en modifiant la différence de potentiel entre les lentilles positionnées à l'entrée et à la sortie de la cellule. Plus l'ion possède une énergie cinétique importante plus l'énergie de collision est élevée. Un quadripôle est positionné dans la cellule de collision afin de maintenir focaliser le flux ions précurseurs et les fragments générés et éviter ainsi leur perte par dispersion (figure 18). Il est également possible de modifier le débit de gaz inerte afin de favoriser ou de limiter la fragmentation.

Ce mode de fragmentation est largement utilisé dans le cadre d'analyse protéomique de type *bottom-up* car il permet d'obtenir les ions y et b issus de la fragmentation de peptides (cf. [Partie I. IV. 2.1. Fragmentation des peptides](#)). La figure 18 représente en détails la cellule de collision équipant le microTOF-Q II.

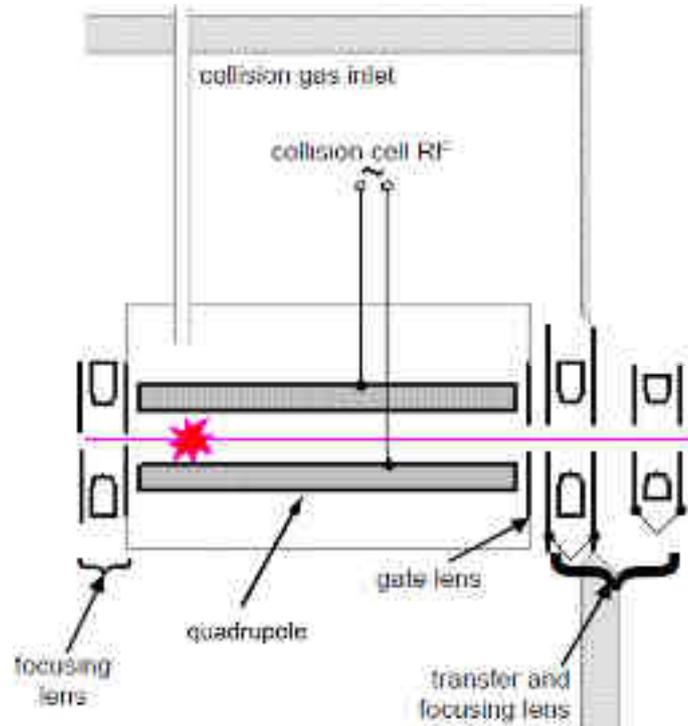


Figure 18. Représentation schématique de la cellule de collision du spectromètre de masse hybride microTOF-Q II (Bruker Daltonics).

Références bibliographiques

66. **Dole, M., et al.**, *Molecular beams of macroions*. The Journal of Chemical Physics, 1968. **49**(5): p. 2240-2249.
67. **Yamashita, M. and J.B. Fenn**, *ELECTROSPRAY ION-SOURCE - ANOTHER VARIATION ON THE FREE-JET THEME*. Journal of Physical Chemistry, 1984. **88**(20): p. 4451-4459.
68. **Kebarle, P. and L. Tang**, *FROM IONS IN SOLUTION TO IONS IN THE GAS-PHASE - THE MECHANISM OF ELECTROSPRAY MASS-SPECTROMETRY*. Analytical Chemistry, 1993. **65**(22): p. A972-A986.
69. **Taylor, G.**, *Disintegration of Water Drops in an Electric Field*. Proceedings of the Royal Society of London. Series A. Mathematical and Physical Sciences, 1964. **280**(1382): p. 383-397.
70. **Kebarle, P.**, *A brief overview of the present status of the mechanisms involved in electrospray mass spectrometry*. Journal of Mass Spectrometry, 2000. **35**(7): p. 804-817.
71. **Rayleigh, L.**, *XX. On the equilibrium of liquid conducting masses charged with electricity*. Philosophical Magazine Series 5, 1882. **14**(87): p. 184-186.
72. **Schmelzeisenreder, G., L. Butfering, and F.W. Rollgen**, *DESOLVATION OF IONS AND MOLECULES IN THERMOSPRAY MASS-SPECTROMETRY*. International Journal of Mass Spectrometry and Ion Processes, 1989. **90**(2): p. 139-150.
73. **Leize, E.**, *Caractérisation d'édifices supramoléculaires par spectrométrie de masse avec ionisation électrospray. Etude du mécanisme d'ionisation-desorption électrospray*. 1994. p. 149 P.
74. **Thomson, B.A. and J.V. Iribarne**, *Field induced ion evaporation from liquid surfaces at atmospheric pressure*. The Journal of Chemical Physics, 1979. **71**(11): p. 4451-4463.
75. **King, R., et al.**, *Mechanistic investigation of ionization suppression in electrospray ionization*. Journal of the American Society for Mass Spectrometry, 2000. **11**(11): p. 942-950.
76. **Emmett, M.R. and R.M. Caprioli**, *MICRO-ELECTROSPRAY MASS-SPECTROMETRY - ULTRA-HIGH-SENSITIVITY ANALYSIS OF PEPTIDES AND PROTEINS*. Journal of the American Society for Mass Spectrometry, 1994. **5**(7): p. 605-613.
77. **Wilm, M.S. and M. Mann**, *Electrospray and Taylor-Cone theory, Dole's beam of macromolecules at last?* International Journal of Mass Spectrometry and Ion Processes, 1994. **136**(2-3): p. 167-180.
78. **Wilm, M. and M. Mann**, *Analytical properties of the nanoelectrospray ion source*. Analytical Chemistry, 1996. **68**(1): p. 1-8.

79. **Wagner, E.**, *Nouvelles approches de la spectrométrie de masse en tandem pour la caractérisation de biomolécules : Applications à la protéomique*. 2004. p. 1 vol. (224 p.).
80. **Ladislav Wiza, J.**, *Microchannel plate detectors*. Nuclear Instruments and Methods, 1979. **162**(1): p. 587-601.
81. **Reiber, D.C., T.A. Grover, and R.S. Brown**, *Identifying proteins using matrix-assisted laser desorption/ionization in-source fragmentation data combined with database searching*. Analytical Chemistry, 1998. **70**(4): p. 673-683.
82. **Reinhold, V.N., B.B. Reinhold, and C.E. Costello**, *CARBOHYDRATE MOLECULAR-WEIGHT PROFILING, SEQUENCE, LINKAGE, AND BRANCHING DATA - ES-MS AND CID*. Analytical Chemistry, 1995. **67**(11): p. 1772-1784.
83. **Cooper, H.J., K. Hakansson, and A.G. Marshall**, *The role of electron capture dissociation in biomolecular analysis*. Mass Spectrometry Reviews, 2005. **24**(2): p. 201-222.
84. **Good, D.M., et al.**, *Performance characteristics of electron transfer dissociation mass spectrometry*. Molecular & Cellular Proteomics, 2007. **6**(11): p. 1942-1951.
85. **Enjalbert, Q., et al.**, *Photo-SRM: laser-induced dissociation improves detection selectivity of selected reaction monitoring mode*. Rapid Communications in Mass Spectrometry, 2011. **25**(22): p. 3375-3381.

III - Couplages entre la CE et la spectrométrie de masse

1. Introduction

L'analyse de mélanges complexes par MS nécessite au préalable la mise en oeuvre d'une technique séparative. Positionnée en amont du spectromètre, l'usage d'une méthode séparative a pour principal intérêt de permettre le transfert progressif au spectromètre des différentes espèces composant mélange. La MS en fournissant comme information le rapport m/z des espèces à analyser tend à tolérer, dans une certaine mesure, l'injection simultanée de plusieurs analytes, il est nécessaire dans le cas de mélanges complexes d'utiliser une méthode séparative pour éviter les effets de suppression d'ions et la potentialité de différentes molécules possédant le même rapport m/z , ceci afin de maximiser donc l'ionisation de tous analytes du mélange. Actuellement, la chromatographie liquide (CL) est la méthode séparative la plus largement couplée à la spectrométrie de masse à source ESI (ESI-MS) du fait de la compatibilité entre leurs conditions expérimentales respectives : débit de la phase mobile, volatilité des solvants utilisés, efficacité des pics chromatographiques.

En CE la séparation s'effectue par l'intermédiaire des différences de mobilités électrophorétiques des analytes migrants sous l'effet du champ électrique. Cette caractéristique suggère une orthogonalité entre séparations électrophorétique et chromatographique [86]. La sélectivité, différente en CE, est particulièrement intéressante dans le cadre de la séparation de certain type d'analytes (peptides, protéines). De plus, la possibilité d'ajuster cette sélectivité en modifiant la composition du BGE expliquent que des développements permettant le couplage entre la CE et l'ESI-MS (CE-ESI-MS) furent développés rapidement après l'introduction des sources ESI [87]. L'intérêt clair de ce type de couplage est de pouvoir cumuler l'efficacité séparative ainsi que la sélectivité de la CE aux performances de la MS en termes de sensibilité.

La détection en CE est conventionnellement réalisée à quelques centimètres de l'extrémité du capillaire notamment par spectroscopie UV/Vis ou fluorescence induite par laser (LIF) (cf. figure 1). A contrario, dans le cadre de couplage CE-ESI-MS, la détection s'effectue à l'extrémité du capillaire et nécessite l'utilisation de systèmes appropriés. Les difficultés rencontrées lors de l'élaboration de couplage CE-ESI-MS sont de deux natures :

- La compatibilité entre les débits faibles générés par l'EOF (de l'ordre de quelques dizaines de nL/min) et le débit nécessaire pour maintenir un ESI stable

- La nécessité de maintenir le contact électrique entre les deux électrodes de la CE tout en positionnant la sortie du capillaire de CE dans la source ESI

Cette dernière contrainte est sans contexte la plus importante et à l'origine du développement de plusieurs types d'interfaces qu'il est possible de diviser en trois catégories : les interfaces *sheath-liquid*, les interfaces *liquid junction* et les interfaces *sheathless*.

2. Interfaces CE-ESI-MS *sheath-liquid*

L'interface *sheath-liquid* est depuis une décennie l'interface CE-ESI-MS la plus couramment mise en œuvre. Cette interface a été décrite pour la première fois par Smith *et al* en 1988 [88].

Sur ce type d'interface, la sortie du capillaire de CE est positionné dans un nébuliseur spécialement conçu à cet effet. Le contact électrique est maintenu par l'intermédiaire d'un liquide additionnel (*sheath-liquid*). Ce liquide circule dans le nébuliseur de manière coaxiale par rapport au capillaire de CE grâce à une assistance pneumatique, généralement un pousse-seringue micrométrique, pour injecter en continu le liquide additionnel (5-10 $\mu\text{L}/\text{min}$). Une jonction se forme au niveau de l'extrémité du capillaire de CE entre le liquide additionnel et le BGE issu du capillaire. Le contact électrique est maintenu au niveau de cette jonction car le liquide additionnel est connecté à l'électrode de sortie de la CE (figure 19). Comme conventionnellement en ESI, un gaz de nébulisation est utilisé pour faciliter la formation du spray et le stabiliser.

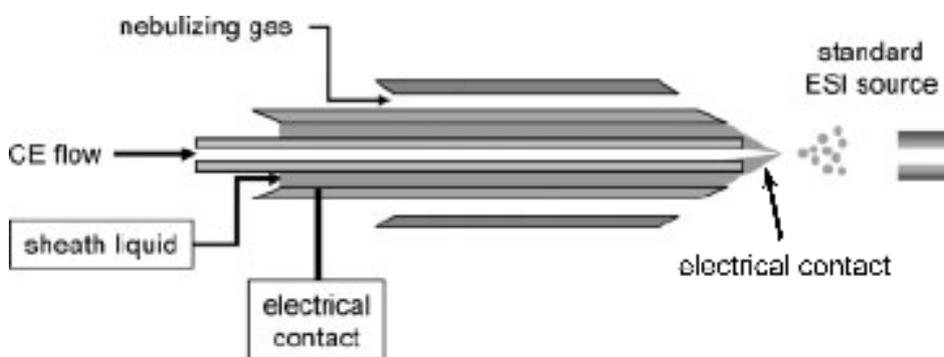


Figure 19. Représentation schématique d'un système d'interface CE-ESI-MS de type *sheath-liquid*. Adapté à partir de [89].

Le liquide additionnel doit par conséquent être un liquide conducteur. Il peut être de nature aqueuse ou hydro-organique, il n'est pas indispensable que la nature du liquide additionnel et du BGE d'être similaires. Outre son utilisation pour le maintien du contact électrique, il permet de stabiliser l'ESI généré car le débit produit par l'EOF est souvent insuffisant voir nul dans certain cas (application de greffages neutres par exemple). De plus le liquide additionnel possède la capacité de favoriser l'ionisation. A titre d'exemple en mode de détection négatif, l'utilisation d'un liquide additionnel basique permet de favoriser la déprotonation des analytes

même si la séparation est au préalable réalisée dans des conditions de pH différentes [90]. Il convient par conséquent de porter une attention particulière en ce qui concerne l'ajustement de la composition du liquide additionnel afin d'obtenir les meilleures performances [91]. L'autre avantage du liquide additionnel est qu'il permet d'améliorer sensiblement la tolérance du spectromètre avec certains BGE. Les tampons borate et phosphate sont des BGE couramment utilisés en CE classique mais dont la tolérance en ESI-MS est faible dans le cas du borate et nulle pour le phosphate [92]. Le liquide additionnel, présent en quantité importante par rapport au BGE au moment de l'ionisation, tend à « diluer » le BGE ce qui a pour conséquence d'augmenter sensiblement la tolérance de la MS à ce type de BGE. On observe le même type d'effet lorsque des agents tensioactifs sont incorporés au BGE (ex. SDS, CTAB).

L'inconvénient majeur de ce type d'interface vient paradoxalement du liquide additionnel. Le débit de liquide additionnel est bien supérieur à celui du BGE créé par le flux électroosmotique, si bien que l'on observe des effets de « dilution » des analytes au moment de leur ionisation. Il en résulte que la sensibilité obtenue lors de la mise en œuvre de ce type d'interface est relativement limitée. On constate donc une certaine ambivalence entre le caractère miniaturisé de la CE, qui induit une quantité limitée d'échantillon pouvant être injecté, et l'utilisation d'un débit important de liquide additionnel.

Les caractéristiques de l'interface *sheath-liquid* montrent que ce type d'interface comporte un attrait évident par sa facilité de mise en œuvre, sa robustesse et dans certains cas l'influence positive du liquide additionnel sur l'ESI produit. Il n'en reste pas moins que ce type d'interface ne permet pas de profiter au maximum de la sensibilité cumulée des deux techniques couplées. On rapporte l'utilisation de ce type d'interface pour l'analyse de petites molécules [93], de protéines [94] ou encore pour la détermination de profils de glycosylation [95].

3. Interfaces CE-ESI-MS liquid junction

Les interfaces *liquid junction* reprennent certaines caractéristiques des interfaces *sheath-liquid*. Le contact électrique est en effet maintenu par l'intermédiaire d'un liquide additionnel. Cependant le développement des interfaces *liquid junction* a pour objectif de conserver les avantages que peut fournir la mise en jeu d'un liquide additionnel (ionisation favorisée, ESI stable) tout en minimisant les effets de dilution induit par celui-ci. Ce type d'interface fut introduit par Lee *et al* en 1988 [96]. Plusieurs conceptions d'interfaces *liquid junction* ont depuis été développées, leur principale différence portant sur la manière d'effectuer la jonction entre le BGE et le liquide additionnel.

3.1. Design original d'interface *liquid junction*

A son origine, l'interface *liquid junction* est conçue de sorte que le liquide additionnel est mis au contact de l'extrémité du capillaire de CE par l'intermédiaire d'une jonction en T. La jonction en T assure la liaison entre le capillaire de CE, le liquide additionnel et l'aiguille utilisée pour nébuliser le liquide dans la source ESI (figure 20). Tout comme dans le cas d'interfaces *sheath liquid*, le liquide additionnel est relié à l'électrode de sortie de la CE et permet le maintien du contact électrique. A l'intérieur de la jonction, la distance entre le capillaire de CE et l'aiguille de l'ESI est minimisée afin d'éviter les effets d'élargissement de pics (généralement entre 25 et 50 μm). En maintenant le contact électrique de cette manière le débit de liquide additionnel est significativement réduit à quelques centaines de nL/min. La conséquence directe est qu'il n'est pas nécessaire d'utiliser un gaz de nébulisation avec cette interface CE-ESI-MS [97].

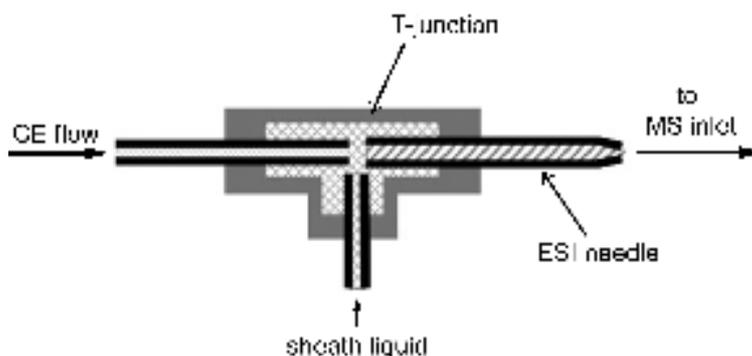


Figure 20. Représentation schématique du montage de la jonction en T utilisée sur l'interface CE-ESI-MS *liquid junction*. Adapté à partir de [98].

L'emploi de cette interface permet de diminuer de manière significative les effets de dilutions par rapport à ceux observés avec l'interface *sheath liquid*. De plus, l'indépendance entre le capillaire de CE et l'aiguille de l'ESI facilite son utilisation car il est possible de les changer indépendamment (bouchage de l'aiguille par exemple). Toutefois l'utilisation d'une jonction en T crée de volumes morts dans le système qui ont tendance à perturber le front plat de l'EOF et entraîner l'élargissement des pics, diminuant l'efficacité séparative.

3.2. Design d'interface *liquid junction* par pression

Ce design d'interface possède de nombreuses similitudes avec le design original d'interface *liquid junction* présenté précédemment. Dans ce système une jonction est formée entre le capillaire de CE et l'aiguille de l'ESI. Cette jonction, au préalable remplie de liquide additionnel, est placée sous pression durant la séparation afin de permettre la circulation dans la direction de l'ESI (figure 21). Le réservoir est relié à l'électrode de sortie de la CE et permet dans cette configuration de maintenir le contact électrique dans le capillaire. La distance entre le capillaire de CE et l'aiguille de l'ESI est plus importante que pour le design original. L'application d'une

pression a pour conséquence de diminuer les effets d'élargissement des pics rencontrés avec ce type d'interface. De plus, cette pression stabilise et augmente si nécessaire le débit dans l'aiguille ESI (de l'ordre de 200-300 nL/min). Lors de la mise en œuvre de ce type d'interface, il est nécessaire d'appliquer constamment durant la séparation une faible pression sur le vial d'entrée de la CE, ceci afin d'éviter un retour de BGE dans le capillaire à cause de la pression appliquée dans la jonction [99].

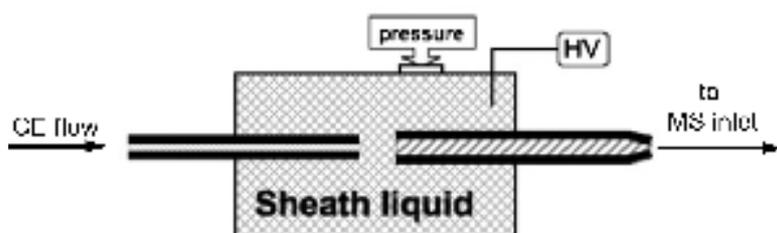


Figure 21. Représentation schématique du montage de la jonction en T utilisée sur l'interface CE-ESI-MS *liquid junction* sous pression. Adapté à partir de [98].

3.3. Design d'interface *liquid junction* à micro vial

Introduite par Chen *et al*, l'interface *liquid junction* dite à micro vial est l'une des plus récentes interfaces *liquid junction* développées [100]. Pour la mise en œuvre de ce système, le capillaire de CE est introduit dans une aiguille conique creuse en acier inoxydable, de sorte que l'extrémité du capillaire de CE bute au fond de l'aiguille (figure 22, figure 23).

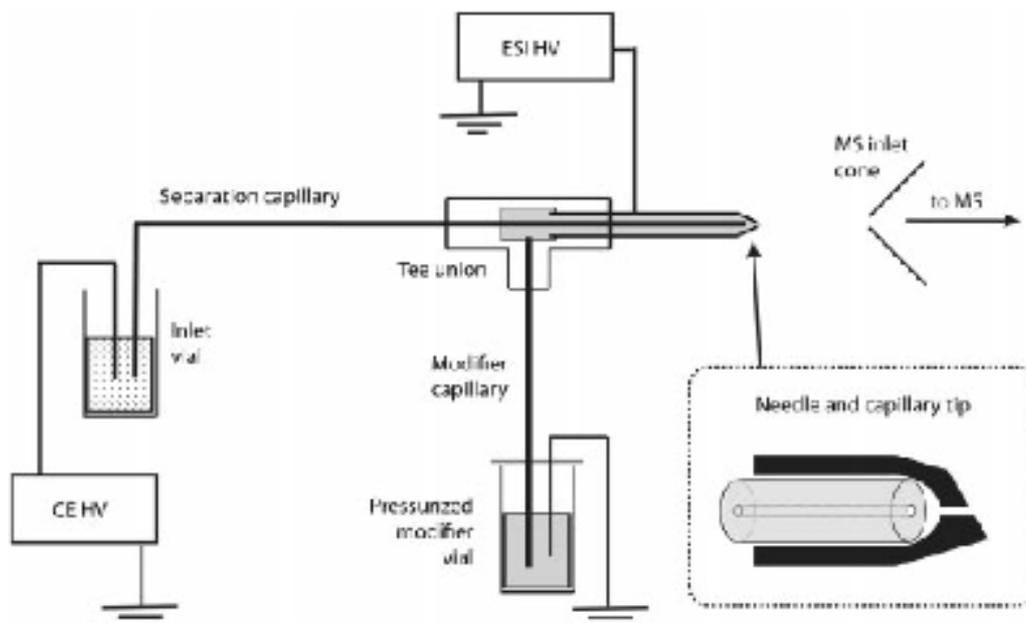


Figure 22. Représentation schématique du couplage utilisant l'interface CE-ESI-MS *liquid junction* à micro vial. Extrait de [100].

L'aiguille est remplie par un liquide additionnel, relié à l'électrode de sortie de la CE. Le faible volume entre l'extrémité du capillaire et la paroi interne de l'aiguille forme un micro vial. Ce micro vial permet de maintenir le contact électrique en étant relié au vial de sortie de la CE, est par conséquent à l'électrode de sortie de celle-ci (figure 23).

Durant la séparation, le liquide additionnel est injecté avec un faible débit par l'intermédiaire du système d'injection hydrodynamique de la CE. Le débit utilisé est aux alentours des 300 nL/min. La circulation du liquide additionnel permet de maintenir focalisé le flux issu du capillaire de CE et donc de prévenir les effets de diffusion responsable d'élargissements de pics (figure 23). Pour l'utilisation de cette interface, il n'est pas nécessaire d'utiliser un système d'injection secondaire injectant le liquide additionnel. La CE est mise à contribution pour cette tâche. De plus, les débits appliqués pour l'injection sont réduits, ce qui a pour conséquence de limiter significativement les effets de dilution des analytes inhérents aux interfaces utilisant un liquide additionnel. Il est possible d'utiliser un liquide additionnel favorisant l'ionisation. L'aiguille ESI est biseautée afin de favoriser la formation de gouttelettes de faibles diamètres. On rapporte l'utilisation de cette interface pour l'analyse d'un mélange de protéines entières [100] et plus récemment l'analyse poussée des glycosylations portées par une protéine recombinante [101].

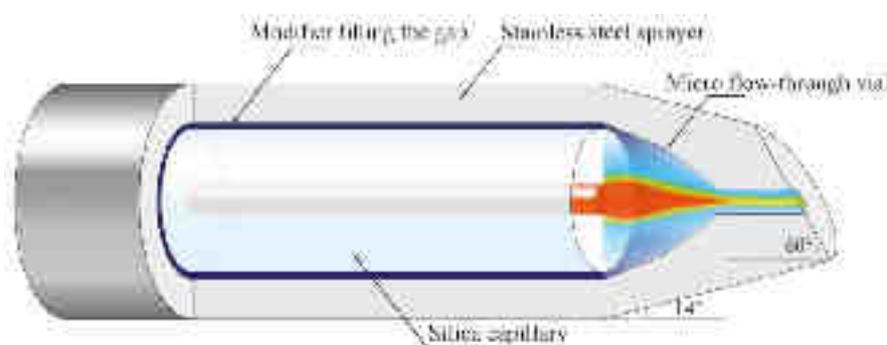


Figure 23. Représentation schématique du montage de la jonction utilisée sur l'interface CE-ESI-MS *liquid junction* à micro vial. Extrait de [102].

4. Interfaces CE-ESI-MS *sheathless*

Les interfaces CE-ESI-MS *sheathless* se distinguent de celles évoquées précédemment par le fait qu'elles n'impliquent pas l'utilisation d'un liquide additionnel. La continuité du champ électrique devient alors cruciale et est ainsi assurée par différents systèmes de connexion directement avec le capillaire de CE. Plusieurs approches ont été développées pour assurer le maintien du contact électrique sans utiliser de liquide additionnel.

Les interfaces *sheathless* permettent d'avoir la meilleure sensibilité dans le cadre de couplage CE-ESI-MS étant donné que l'effet de dilution apporté par le liquide additionnel est supprimé.

L'objectif étant de fournir un interfaçage CE-ESI-MS le plus direct possible afin de profiter au maximum des performances séparatives délivrées par la CE et de la sensibilité du spectromètre de masse. Bien que nécessitant l'élaboration de montages relativement complexes, ce type d'interface met en exergue la compatibilité entre la CE et l'ESI en ce qui concerne l'efficacité d'ionisation et explique l'importante sensibilité qu'il permet d'obtenir. Les diamètres internes de capillaire généralement utilisés en CE sont compris entre 20 et 75 μm tandis que le débit de BGE créé par le EOF est de l'ordre de quelques dizaines de nL/min voire inférieur à 10 nL/min. De telles conditions se rapprochent des conditions utilisées en nanoESI, favorisant l'efficacité d'ionisation ce qui explique les performances supérieures des interfaces *sheathless* par rapport à leurs homologues utilisant un liquide additionnel [103]. Seul le BGE se trouve ionisé dans la source ce qui implique par conséquent la nécessité d'utiliser des BGE suffisamment volatiles et compatibles avec l'ionisation par ESI. En 1987, la première interface CE-ESI-MS introduite par Olivares *et al* était une interface *sheathless*. Ce type de conception d'interface fût délaissé ensuite durant plusieurs années au profit des interfaces *sheath liquid* [87]. On explique cette tendance par une mise œuvre plus simple et à l'époque une robustesse plus importante délivrée par les interfaces *sheath liquid*. Toutefois on note un intérêt renouvelé depuis une décennie environ pour les interfaces *sheathless* car elles répondent au besoin de sensibilité que nécessitent désormais les problématiques de recherches mais également en raison d'une meilleure maîtrise des procédés permettant la mise en œuvre de ce type d'interface.

Les avantages en termes de performances de l'interface CE-ESI-MS *sheathless* a entraîné le développement d'un nombre conséquent d'interface de ce type utilisant différents procédés pour maintenir le contact électrique. Les paragraphes suivants s'efforcent de décrire en détail les interfaces *sheathless* ayant permis d'obtenir les performances les plus significatives.

4.1. Interfaces *sheathless* utilisant un capillaire métallisé

Parmi les différents moyens permettant de maintenir le contact électrique dans le cadre de développement de couplage CE-ESI-MS sans liquide additionnel, l'utilisation d'un capillaire revêtu d'un matériau conducteur est le système le plus couramment utilisé.

Ce type d'interface utilise un capillaire de CE conventionnel. L'extrémité du capillaire, positionnée dans la source ESI, est traitée dans le but d'appliquer un matériau conducteur tout en conservant la gaine non conductrice protégeant initialement le capillaire. Le revêtement conducteur est directement connecté à l'électrode de sortie de la CE. Le contact électrique se forme au niveau de la sortie du capillaire entre le revêtement métallique et le BGE issu du capillaire de CE (figure 24). Parmi les métaux utilisés pour effectuer le revêtement on cite l'or, l'argent, le cuivre le nickel ou encore le graphite [104].

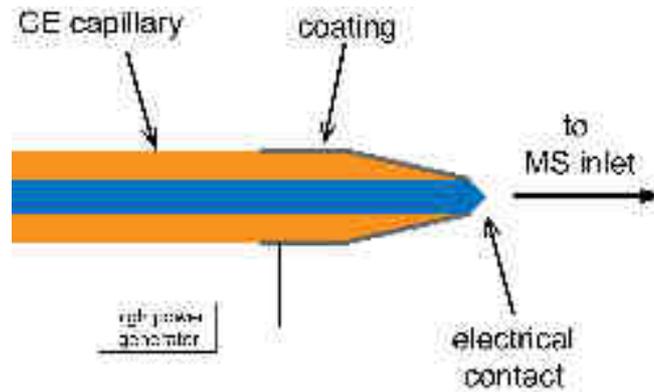


Figure 24. Représentation schématique d'interface CE-ESI-MS *sheathless* utilisant un capillaire métallisé.

Ce type d'interface est relativement simple à mettre en place et permet d'obtenir une sensibilité supérieure aux interfaces *sheath-liquid*. L'inconvénient majeur de ce type d'interface vient de la durée de vie du revêtement métallique appliqué. Les tensions électriques importantes appliquées pour réaliser les séparations entraînent une usure prématurée du revêtement conducteur ce qui peut aboutir à une perte du contact électrique.

4.2. Interfaces *sheathless* utilisant une connectique intra-capillaire

Un autre procédé également utilisé pour maintenir le contact électrique est d'insérer un fil conducteur à l'intérieur du capillaire relié à l'électrode de sortie de CE. Lorsque le diamètre interne du capillaire est suffisamment grand, le fil peut être introduit par l'extrémité du capillaire CE ou encore par l'intermédiaire d'un trou par lequel le fil est introduit ce qui lui permet d'entrer en contact avec le BGE contenu à l'intérieur du capillaire et de maintenir le contact électrique (figure 25) [105].

D'une manière générale, ce système d'interface possède des caractéristiques similaires aux autres interfaces *sheathless* ainsi il n'est pas nécessaire d'utiliser un gaz de nébulisation.



Figure 25. Représentation schématique d'interface CE-ESI-MS *sheathless* utilisant un fil conducteur inséré dans le capillaire.

Toutefois la présence du fil à l'intérieur du capillaire tend à perturber le flux électroosmotique, ce qui peut avoir des conséquences négatives sur la séparation (élargissement des pics) et altérer le spray généré.

4.3. Interfaces sheathless utilisant un capillaire poreux : l'interface CESI-MS

Dans le but de produire des interfaces sheathless CE-ESI-MS plus robuste et dont les capillaires puissent avoir une durée de vie comparable à celle des capillaires utilisés en CE classique, d'autres moyens de maintenir le contact électrique ont été mis au point. Ainsi l'interface CESI-MS fut introduite postérieurement aux premiers développements réalisés en couplage CE-ESI-MS.

La première des particularités de cette interface est qu'elle met en jeu deux capillaires distincts. Le premier capillaire est défini comme étant le **capillaire de séparation** car à l'intérieur de celui-ci la séparation électrophorétique est réalisée. L'extrémité du capillaire de séparation, destinée à être placée dans la source ESI, subit une attaque à l'aide d'acide fluorhydrique. Le but de cette attaque est d'éliminer la gaine en polyimide protégeant le capillaire mais également de rendre poreuse la silice au niveau de la partie traitée. Par ce procédé, la porosité acquise par la silice formant les parois du capillaire permet aux électrons et aux ions de faibles diamètres de traverser les parois. Cette partie est également étirée de manière à ce que l'extrémité du capillaire de séparation soit d'un diamètre interne minimal et biseauté, ce qui favorise la formation de fines gouttelettes en ESI. Ce capillaire de séparation est positionné à l'intérieur d'une canule en acier inoxydable. Celle-ci est remplie de BGE par l'intermédiaire d'un second capillaire que l'on nomme **capillaire de contact**. Le capillaire de contact est relié à l'électrode de sortie de la CE (figure 26).

La porosité acquise par la silice, au niveau de la partie traitée à l'acide, tend à laisser passer les électrons et les ions de faibles rayons au travers de la paroi. Le contact électrique est par conséquent maintenu par l'intermédiaire de la partie poreuse du capillaire qui permet de laisser le courant s'établir à travers les parois du capillaire. L'extrémité du capillaire de séparation est positionnée en direction de l'entrée du MS si bien qu'uniquement ce qui est issu du capillaire de séparation est effectivement transféré au spectromètre de masse (figure 26).

Ce design d'interface a la faculté de générer un nanoESI avec une excellente robustesse tout en fournissant une sensibilité optimale. Malgré le fait que le maintien du contact électrique soit conditionné par la porosité des parois du capillaire, le procédé d'attaque acide permet de fournir un contact électrique stable et ainsi éviter les effets d'instabilité du flux électroosmotique.

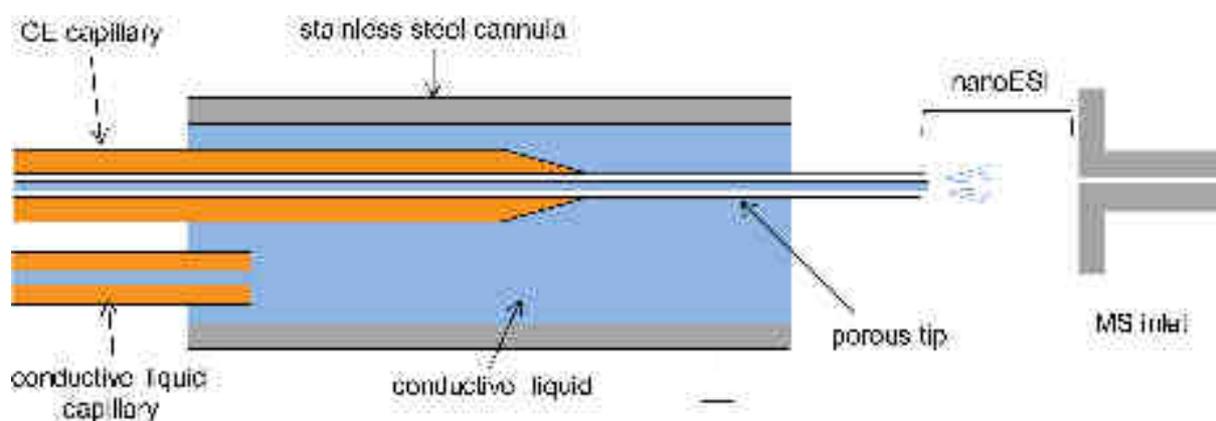


Figure 26. Représentation schématique d'interface *sheathless* CESI-MS.

Ce design d'interface a été originalement développé par Moini *et al* [106]. La société Beckman Coulter a ensuite racheté le brevet concernant ce design d'interface CE-ESI-MS afin de développer une solution commerciale.

La littérature fait ainsi état de l'emploi du couplage CE-ESI-MS utilisant l'interface CESI-MS dans plusieurs thématiques de recherches :

- Analyse de petites molécules organiques thérapeutiques [103], [107]
- Analyse protéomique de type *bottom-up* [108], [109], [86]
- Caractérisation de modifications post-traductionnelles [110], [111]
- Analyse métabolomique [112]
- Caractérisation de glycosylations/glycoprofiling [113], [114]
- Caractérisation de structures primaires de protéines [115]
- Caractérisation de protéines entières [116], [117]
- Utilisation comme plateforme d'infusion nanoESI [118]

Ces travaux soulignent notamment la robustesse de l'ESI généré par l'intermédiaire de l'interface CESI-MS. Un certain nombre de travaux montrent que la mise en œuvre de l'interface CESI-MS permet de diminuer de manière significative les limites de détection (LOD) et de quantification (LOQ) par rapport à l'interface CE-ESI-MS *sheath liquid* [107]. A titre d'illustration Busnel *et al* décrivent la séparation et l'analyse MS/MS par CESI-MS/MS d'un digest tryptique d'albumine de sérum bovin permettant l'identification des peptides qui la compose et d'aboutir à un taux de recouvrement de séquence proche de 80% pour une injection correspondant à seulement 8 fmol de peptides digérés [108]. Les gains en termes de sensibilité s'expliquent par les propriétés intrinsèques de l'interface qui favorisent une excellente efficacité d'ionisation. Le capillaire de séparation possède un diamètre interne inférieur à 30 μm . Ce faible diamètre interne du capillaire ajouté aux faibles débits générés par

l'EOF tendent à former des gouttelettes très fines et donc plus facilement sujettes aux explosions coulombiennes.

La littérature décrit parallèlement l'utilisation de capillaire dont la surface interne est greffée ([cf. Partie I. I. 3.1. Electrophorèse capillaire de zone](#)) avec succès [109]. Toutefois en ce qui concerne l'application de greffage dans le cadre de couplage CESI-MS, les travaux restent encore peu nombreux et il est important de garder à l'esprit que le greffage ne doit pas s'opposer à la porosité induite à la silice afin de conserver le maintien du contact électrique.

Références bibliographiques

86. **Wang, Y., et al.**, *Improving the Comprehensiveness and Sensitivity of Sheathless Capillary Electrophoresis–Tandem Mass Spectrometry for Proteomic Analysis*. Analytical Chemistry, 2012. **84**(20): p. 8505-8513.
87. **Olivares, J.A., et al.**, *On-line mass spectrometric detection for capillary zone electrophoresis*. Analytical Chemistry, 1987. **59**(8): p. 1230-1232.
88. **Smith, R.D., C.J. Barinaga, and H.R. Udseth**, *Improved electrospray ionization interface for capillary zone electrophoresis-mass spectrometry*. Analytical Chemistry, 1988. **60**(18): p. 1948-1952.
89. **Hommerson, P., et al.**, *Ionization techniques in capillary electrophoresis-mass spectrometry: Principles, design, and application*. Mass Spectrometry Reviews, 2011. **30**(6): p. 1096-1120.
90. **Soga, T., et al.**, *Metabolomic Profiling of Anionic Metabolites by Capillary Electrophoresis Mass Spectrometry*. Analytical Chemistry, 2009. **81**(15): p. 6165-6174.
91. **Bonvin, G., S. Rudaz, and J. Schappler**, *In-spray supercharging of intact proteins by capillary electrophoresis-electrospray ionization-mass spectrometry using sheath liquid interface*. Analytica Chimica Acta, 2014. **813**: p. 97-105.
92. **Foret, F., et al.**, *LIQUID SHEATH EFFECTS ON THE SEPARATION OF PROTEINS IN CAPILLARY ELECTROPHORESIS ELECTROSPRAY MASS-SPECTROMETRY*. Analytical Chemistry, 1994. **66**(24): p. 4450-4458.
93. **Vuorensola, K., et al.**, *Optimization of capillary electrophoretic- electrospray ionization-mass spectrometric analysis of catecholamines*. ELECTROPHORESIS, 2001. **22**(20): p. 4347-4354.
94. **Staub, A., et al.**, *CE-ESI-TOF/MS for human growth hormone analysis*. ELECTROPHORESIS, 2010. **31**(2): p. 388-395.
95. **Zamfir, A. and J. Peter-Katalinic**, *Capillary electrophoresis-mass spectrometry for glycoscreening in biomedical research*. Electrophoresis, 2004. **25**(13): p. 1949-1963.
96. **Lee, E.D., et al.**, *On-line capillary zone electrophoresis-ion spray tandem mass spectrometry for the determination of dynorphins*. Journal of Chromatography A, 1988. **458**(0): p. 313-321.
97. **Lee, E.D., et al.**, *Liquid junction coupling for capillary zone electrophoresis/ion spray mass spectrometry*. Biological Mass Spectrometry, 1989. **18**(9): p. 844-850.
98. **Maxwell, E.J. and D.D.Y. Chen**, *Twenty years of interface development for capillary electrophoresis–electrospray ionization–mass spectrometry*. Analytica Chimica Acta, 2008. **627**(1): p. 25-33.
99. **Fanali, S., et al.**, *On-line CE-MS using pressurized liquid junction nanoflow electrospray interface and surface-coated capillaries*. Electrophoresis, 2006. **27**(23): p. 4666-4673.
100. **Maxwell, E.J., et al.**, *Decoupling CE and ESI for a more robust interface with MS*. Electrophoresis, 2010. **31**(7): p. 1130-1137.

101. **Jayo, R.G., et al.**, *Simple Capillary Electrophoresis-Mass Spectrometry Method for Complex Glycan Analysis Using a Flow-Through Microvial Interface*. Analytical Chemistry, 2014. **86**(13): p. 6479-6486.
102. **Zhong, X., E.J. Maxwell, and D.D.Y. Chen**, *Mass Transport in a Micro Flow-Through Vial of a Junction-at-the-Tip Capillary Electrophoresis-Mass Spectrometry Interface*. Analytical Chemistry, 2011. **83**(12): p. 4916-4923.
103. **Bonvin, G., et al.**, *Evaluation of a sheathless nanospray interface based on a porous tip sprayer for CE-ESI-MS coupling*. Electrophoresis, 2012. **33**(4): p. 552-562.
104. **Nilsson, S., et al.**, *A simple and robust conductive graphite coating for sheathless electrospray emitters used in capillary electrophoresis/mass spectrometry*. Rapid Communications in Mass Spectrometry, 2001. **15**(21): p. 1997-2000.
105. **Fang, L.L., et al.**, *ONLINE TIME-OF-FLIGHT MASS-SPECTROMETRIC ANALYSIS OF PEPTIDES SEPARATED BY CAPILLARY ELECTROPHORESIS*. Analytical Chemistry, 1994. **66**(21): p. 3696-3701.
106. **Cao, P. and M. Moini**, *A novel sheathless interface for capillary electrophoresis/electrospray ionization mass spectrometry using an in-capillary electrode*. Journal of the American Society for Mass Spectrometry, 1997. **8**(5): p. 561-564.
107. **Bonvin, G., J. Schappler, and S. Rudaz**, *Non-aqueous capillary electrophoresis for the analysis of acidic compounds using negative electrospray ionization mass spectrometry*. Journal of Chromatography A, 2014. **1323**(0): p. 163-173.
108. **Busnel, J.-M., et al.**, *High Capacity Capillary Electrophoresis-Electrospray Ionization Mass Spectrometry: Coupling a Porous Sheathless Interface with Transient-Isotachopheresis*. Analytical Chemistry, 2010. **82**(22): p. 9476-9483.
109. **Faserl, K., et al.**, *Optimization and Evaluation of a Sheathless Capillary Electrophoresis-Electrospray Ionization Mass Spectrometry Platform for Peptide Analysis: Comparison to Liquid Chromatography-Electrospray Ionization Mass Spectrometry*. Analytical Chemistry, 2011. **83**(19): p. 7297-7305.
110. **Sarg, B., et al.**, *Comparing and Combining Capillary Electrophoresis Electrospray Ionization Mass Spectrometry and Nano-Liquid Chromatography Electrospray Ionization Mass Spectrometry for the Characterization of Post-translationally Modified Histones*. Molecular & Cellular Proteomics, 2013. **12**(9): p. 2640-2656.
111. **Heemskerk, A.A.M., et al.**, *Ultra-Low Flow Electrospray Ionization-Mass Spectrometry for Improved Ionization Efficiency in Phosphoproteomics*. Analytical Chemistry, 2012. **84**(10): p. 4552-4559.
112. **Ramautar, R., et al.**, *Enhancing the Coverage of the Urinary Metabolome by Sheathless Capillary Electrophoresis-Mass Spectrometry*. Analytical Chemistry, 2012. **84**(2): p. 885-892.
113. **Heemskerk, A.A.M., et al.**, *Coupling porous sheathless interface MS with transient-ITP in neutral capillaries for improved sensitivity in glycopeptide analysis*. ELECTROPHORESIS, 2013. **34**(3): p. 383-387.

114. **Haselberg, R., G.J. de Jong, and G.W. Somsen**, *Low-Flow Sheathless Capillary Electrophoresis–Mass Spectrometry for Sensitive Glycoform Profiling of Intact Pharmaceutical Proteins*. Analytical Chemistry, 2013. **85**(4): p. 2289-2296.
115. **Gahoual, R., et al.**, *Rapid and multi-level characterization of trastuzumab using sheathless capillary electrophoresis-tandem mass spectrometry*. mAbs, 2013. **5**(3): p. 479-490.
116. **Haselberg, R., et al.**, *Performance of a sheathless porous tip sprayer for capillary electrophoresis-electrospray ionization-mass spectrometry of intact proteins*. Journal of Chromatography A, 2010. **1217**(48): p. 7605-7611.
117. **Haselberg, R., et al.**, *Characterization of drug-lysozyme conjugates by sheathless capillary electrophoresis-time-of-flight mass spectrometry*. Analytica Chimica Acta, 2011. **698**(1-2): p. 77-83.
118. **Gahoual, R., et al.**, *Novel sheathless CE-MS interface as an original and powerful infusion platform for nanoESI study: from intact proteins to high molecular mass noncovalent complexes*. Analytical and Bioanalytical Chemistry, 2014. **406**(4): p. 1029-1038.

IV - Stratégies d'analyse protéomique par spectrométrie de masse

1. Introduction

Le terme de protéome définit l'ensemble des protéines exprimées dans une cellule, un compartiment de cellule (membrane par exemple), tissu, organe, ou fluide à un instant donné et dans des conditions données. Ce terme fut introduit par P. Kahn en 1995 [119]. Le concept d'analyse protéomique a été introduit consécutivement et défini d'une manière large l'étude d'un protéome aussi bien d'un point de vue qualitatif que quantitatif.

Les intérêts de l'étude du protéome sont multiples :

- Malgré les campagnes massives de séquençage du génome, en particulier du génome humain, son étude ne permet d'approcher l'activité cellulaire uniquement de manière limitée. Ceci se traduit par le fait qu'un même génome peut conduire à l'expression de différents protéomes en fonction de l'étape du cycle cellulaire ou de la différenciation, de l'exposition à des stimuli externes ou encore de l'état physiopathologique de l'individu.
- Les protéines peuvent subir différentes modifications qui ne sont pas induites par l'expression du patrimoine génétique, on parle alors de modifications post-traductionnelles (PTM). Ces PTM ne peuvent donc pas être caractérisées par l'intermédiaire de l'étude du génome. Dans un certain nombre de cas, l'activité biologique des protéines est lié à la présence de PTM, on parle alors de maturation post-traductionnelle (glycosylation, phosphorylation).
- Les niveaux d'expression des ARN messagers ne reflètent pas forcément les niveaux d'expressions des protéines [120]. Il est donc nécessaire de pouvoir caractériser directement les protéines d'un point de vue quantitatif afin d'étudier leurs niveaux d'expression.

Différentes avancées technologiques ont permis le développement de stratégies d'analyse protéomique par spectrométrie de masse :

- Le séquençage du patrimoine génétique d'un grand nombre d'espèces permet d'alimenter les banques de données nécessaires à l'identification des protéines en analyse protéomique.
- Les évolutions techniques des spectromètres de masse ont permis d'améliorer considérablement leurs performances que ce soit en termes de sensibilité, de

précisions sur la mesure, de résolution ou encore de fréquence d'acquisition améliorant la qualité de l'information générée en analyse protéomique notamment en MS/MS.

- Le développement d'outils bio-informatiques permettant la gestion et l'exploitation rapide des grandes quantités de données générées les spectromètres de dernière génération.

L'introduction de nouveaux types d'instruments mais également l'évolution des méthodes de préparation d'échantillons ont permis également de diversifier les stratégies d'identification des protéines mise en œuvre en analyse protéomique :

- L'analyse protéomique dite « *bottom-up* » est historiquement la stratégie d'identification et de caractérisation de protéines initialement proposée mais aussi à ce jour la plus largement utilisée. Cette stratégie est basée sur une digestion protéolytique des protéines en amont de l'analyse par MS. Le mélange peptidique issu de la digestion est ensuite séparé et analysé par MS. La spectrométrie de masse en tandem (MS/MS) est utilisée pour l'identification des peptides. Les peptides sont fragmentés par CID, l'identification des fragments permet ainsi d'en déduire la séquence d'acides aminés du peptide. Les peptides identifiés sont alors recherchés par l'intermédiaire de base de données répertoriant les séquences d'acides aminés des protéines, afin d'identifier les protéines constituant l'échantillon (figure 27) [121].
- L'analyse protéomique dite « *top-down* » n'est apparue que très récemment dans les laboratoires de recherches [122]. Dans ce type de stratégie, les protéines sont caractérisées par l'intermédiaire de leur masse totale et des fragments générés par la fragmentation de protéine intacte. Le traitement préalable de l'échantillon est volontairement minimisé. Ce type de stratégie a pu être mis en œuvre suite au développement de nouveau type de fragmentation : la dissociation par capture d'électron (ECD) et la dissociation par transfert d'électrons (ETD). Ces modes de fragmentation plus énergétique que la CID permettant la fragmentation directe de la chaîne peptidique de la protéine en phase gazeuse suffisamment efficace pour permettre l'identification et la caractérisation de la protéine (figure 27) [123, [124].
- L'analyse protéomique dite « *middle-down* » se place comme un compromis entre les deux stratégies précédemment décrites. L'échantillon subit une digestion ménagée, les peptides issus de ces digestions ont ainsi des masses systématiquement supérieures à 3 kDa. Les peptides sont alors caractérisés en MS/MS, il est nécessaire d'utiliser le même type de fragmentation qu'en *top-down* afin de garantir des spectres MS/MS pouvant être interprétés avec succès [125].

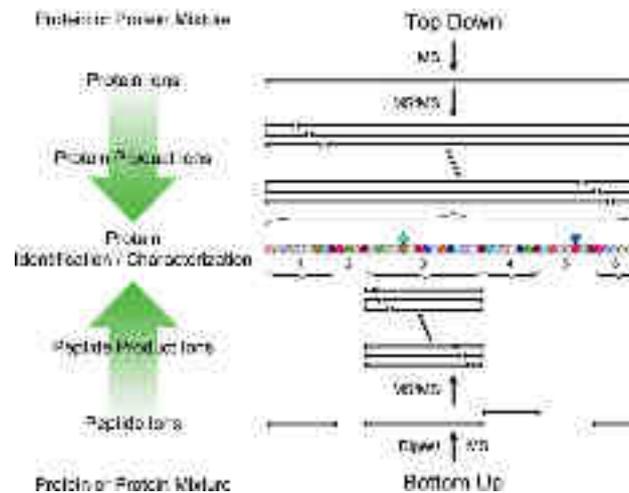


Figure 27. Représentation schématique des différentes stratégies utilisées en analyse protéomique. Extrait de [126].

Le paragraphe suivant décrit essentiellement l'interprétation de données issues d'analyse protéomique *bottom-up*, en effet uniquement ce type de stratégie a été utilisé dans le cadre de ces travaux de thèse.

2. Intérêts de la spectrométrie de masse pour l'analyse protéomique

2.1. Fragmentation des peptides

La spectrométrie de masse en tandem (MS/MS) est basée sur la fragmentation en phase gazeuse des peptides détectés lors de la première analyse MS. La fragmentation des peptides se produit essentiellement au niveau des liaisons amides composant la liaison peptidique. Il est également possible d'observer, de manière marginale, la fragmentation de la chaîne latérale du peptide. Ces ions sont des fragments de deuxième génération ou bien issus de fragmentations de hautes énergies [127]. Il est également commun d'observer la perte de molécules neutres spécifiques durant la fragmentation des peptides : on cite notamment H_2O , NH_3 comme exemple les plus courants.

Roepstoff et Fohlmann ont ainsi établi une nomenclature des fragmentations peptidiques qui fut complétée par Johnson *et al* à posteriori [128, [129]. On différencie deux types d'ions issus de la fragmentation des peptides en MS/MS (figure 28) :

- Les ions, dont la charge positive, est portée par la partie du peptide comportant l'acide aminé N-terminal : on parle de série a, b, c.
- Les ions, dont la charge positive, est portée par la partie du peptide comportant l'acide aminé C-terminal : on parle de série x, y, z.

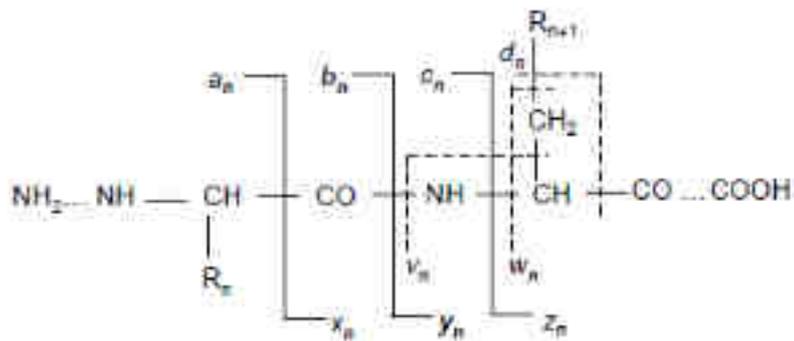


Figure 28. Nomenclature des ions issus de la fragmentation des peptides. Extrait des travaux de thèse d'E. WAGNER [79].

Le type d'ions générés durant la fragmentation est principalement corrélé avec les niveaux d'énergies utilisés, et donc par le type de fragmentation mis en jeu. Les ions y et b sont les plus abondants lors des fragmentations de basses énergies tel que la CID. Les ions issus de la fragmentation de la chaîne latérale du peptide (d, v, w) ne sont obtenus que dans le cadre de fragmentations à hautes énergies.

2.2. Détermination de séquence peptidique : séquençage *de novo*

Le type de fragmentation le plus communément utilisé en protéomique *bottom-up* est la CID. Ce mode de fragmentation génère des niveaux d'énergies relativement faibles, et par conséquent produit en majorité des fragments y et b. Il est ainsi possible de déterminer partiellement ou en totalité la séquence du peptide fragmenté par identification des fragments consécutifs d'une même série d'ions (y ou b). Deux fragments consécutifs d'une même série auront une différence de masse équivalente à la masse moléculaire de l'acide aminé perdu entre ces deux fragmentations (figure 29). Il existe pourtant certaines ambiguïtés qui peuvent émerger durant l'interprétation des spectres MS/MS. On cite à titre d'exemple les acides aminés isobares tels que leucine et isoleucine ou encore les acides aminés ayant des différences de masse très faibles même si les progrès des spectromètres de masse en ce qui concerne la précision sur la mesure de masse a permis d'éliminer la majorité de ces ambiguïtés.

Dans le cas de peptides issus de digestion trypsique, une charge permanente est portée par la lysine ou l'arginine en position C-terminal. La présence de cette charge favorise la détection des fragments y lors de l'analyse MS/MS ce qui explique une interprétation des spectres MS/MS aisée et la possibilité d'obtenir de meilleurs recouvrements des séquences d'acides aminés pour les protéines identifiées.

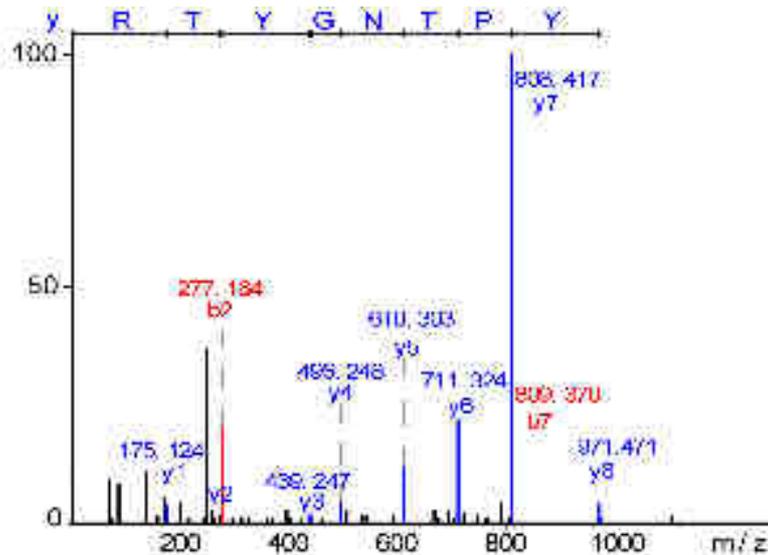


Figure 29. Spectre MS/MS annoté illustrant la détection des différents fragments permettant de déduire la séquence d'acides aminés du peptide détecté.

3. Stratégies d'identification de peptides et de protéines par spectrométrie de masse

3.1. Stratégie de l'empreinte peptidique massique

La stratégie d'identification dite de l'empreinte peptidique massique ou *peptide mass fingerprinting* (PMF) fut introduite simultanément par plusieurs équipes de recherche notamment Yates *et al* [130], James *et al* [131] ou encore Pappin *et al* [132].

Dans cette stratégie, les protéines subissent une digestion enzymatique, l'enzyme de loin la plus couramment utilisée étant la trypsine. Le mélange constitué des peptides protéolytiques est ensuite analysé par MS (MALDI-TOF-MS ou bien ESI-MS) afin de déterminer les masses expérimentales des peptides issus de la digestion, ordonnées sous la forme d'une liste. Cette liste de masses expérimentales est comparée aux listes de masses théoriques générées par digestion théorique (*in silico*) des protéines présentes dans les banques de données. L'identification des protéines est ainsi conditionnée par un certain nombre de critères :

- l'écart entre la mesure du m/z théorique et la mesure expérimentale. La tolérance entre la valeur expérimentale et la valeur théorique est volontairement limitée, notamment en adéquation avec la précision sur la mesure délivrée par l'instrument, afin de limiter la possibilité de faux-positifs.
- Le nombre de peptides identifiés pour une même protéine. L'identification d'une protéine est conditionnée par l'identification de plusieurs peptides correspondant à celle-ci. En effet, l'identification de plusieurs peptides issus d'une même protéine

permet d'améliorer la confiance du résultat en particulier dans le cadre de peptides digérés pouvant correspondre à plusieurs protéines.

- Le recouvrement global de la séquence d'acides aminés. Un recouvrement de séquence élevé justifie ainsi de la confiance au niveau de la protéine identifiée.

Ce type de stratégie nécessite l'utilisation d'outils informatiques adaptés ; ceux-ci prennent la forme de moteur de recherche capable de générer les peptides *in silico* à partir des banques de données et d'effectuer la comparaison avec les données expérimentales. La stratégie PMF possède toutefois un certain nombre de limitations :

- La protéine doit être présente dans les banques de données afin de pouvoir être potentiellement identifiées, ce qui exclue les protéines non séquencées.
- La présence de PTM est généralement inconnue. Ces PTM entraînent le plus souvent des modifications de la masse totale du peptide et donc s'oppose à l'identification des peptides modifiés.

Afin de pallier aux limitations inhérentes à la stratégie PMF et améliorer la confiance des identifications, il est possible de mettre en œuvre des stratégies d'identification mettant à profit la spectrométrie de masse en tandem.

3.2. Stratégie par spectrométrie de masse en tandem (MS/MS)

La stratégie d'identification par MS/MS ou *peptide fragment fingerprinting* (PFF) est dérivée de la stratégie PMF. Il est ainsi nécessaire d'effectuer une digestion protéolytique des protéines contenues dans l'échantillon.

Dans cette stratégie, les ions détectés au cours de l'analyse MS sont isolés et fragmentés à tour de rôle. L'identification des peptides est basée sur la mesure de la masse totale des peptides protéolytiques mais également sur l'identification des fragments de ces peptides obtenus en MS/MS. A partir des données expérimentales, des listes contenant les valeurs des m/z correspondant aux fragments théoriques sont générées pour ensuite être comparées aux données *in silico* générées à partir des banques de données [133]. Ce type de stratégie apparaît donc comme plus fiable que la stratégie PMF puisque l'identification d'un peptide est conditionnée par l'identification d'un maximum de fragments en plus de la masse totale du peptide. L'interrogation des banques de données est également réalisée par l'intermédiaire d'outils informatiques (moteur de recherche notamment) adaptés à ce type d'identification.

L'utilisation de ce type de stratégie d'identification nécessite la mise en œuvre d'instruments adaptés : MALDI-TOF/TOF, ESI-IT ou instruments possédant des analyseurs hybrides de masse (Q-TOF par exemple). En effet, le spectromètre de masse doit alors être capable de réaliser l'analyse MS, la sélection des ions parents, la fragmentation de l'ion sélectionné et

l'analyse des m/z des ions fils générés. Ce type d'approche nécessite la mise en place d'une méthode séparative en amont de l'analyse par MS/MS afin d'éviter que la complexité des échantillons n'entraînent des effets de suppression d'ion, diminuant la sensibilité du signal, ou encore pour éviter que le spectromètre de masse n'ait le temps de sélectionner l'ensemble des ions pour la fragmentation.

L'un des avantages majeurs de ce type de stratégie est la possibilité, dans le cadre de protéines non répertoriées dans les banques de données, d'effectuer le séquençage *de novo* à partir des données MS/MS ([cf. Partie I. V. 2.2. séquençage de novo](#)). De la même manière, il est possible de caractériser de manière précise les PTM par l'intermédiaire du spectre MS/MS.

3.3. Caractérisation de modifications post-traductionnelles (PTM)

3.3.1. Introduction

Les modifications post-traductionnelles (PTM) sont des modifications chimiques covalentes pouvant intervenir sur les acides aminés *in vivo*. Ces modifications ne sont pas le fait de l'expression directe du patrimoine génétique mais induites par modifications de la protéine postérieure à son expression, ceci tout au long de la vie de la cellule. Ces modifications sont diverses et leurs fonctions ne sont à ce jour pas totalement élucidées. Cependant elles mobilisent l'intérêt de la communauté scientifique car il a pu être montré qu'elles influent sur l'activité biologique de certaines protéines [134] ; on parle alors de maturation post-traductionnelles, glycosylation et phosphorylation sont les exemples les plus significatifs de l'influence des PTM sur l'activité des protéines.

3.3.2. Principales modifications post-traductionnelles

Le tableau 3 regroupe les principales PTMs accompagnés des acides aminés portant caractéristiquement ces PTM et les différences de masse induites par ces modifications.

Modifications post-traductionnelles	Acides aminés concernés	Variation de masse (Da)
Phosphorylation	Tyr, Ser, Thr, Arg, Cys, Asp, His	+ 79,966
Acetylation	Cys, Ser, Lys, AA en N-term	+ 42,011
Methylation	Thr, Ser, Glu, Asp, Leu, isoLeu, Arg, Gln, Asn, Lys, His, Cys, AA en N-term	+ 14,016
Glycosylation	Asn (N glycosylation) Ser, Thr, Pro, Lys (O-glycosylation)	> 800
Hydroxyproline	Pro	+ 15,995

Sulfonation	Tyr	+ 79,957
Formation de ponts disulfures	Cys	- 2
Déamidation	Arg, Asn, Gln	+ 0,984
Pyroglutamic acid	Gln en N-term	- 17,027
Nitration	Tyr	+ 45
Oxidation	Met, Trp, His, Cys	+ 15,995
Isomerization	Asp/isoAsp, Leu/isoLeu	± 0

Tableau 3. Récapitulatif des principales modifications post-traductionnelles. Adapté à partir de [135].

L'introduction de la spectrométrie de masse en tandem a permis d'améliorer la caractérisation des PTM. En effet les spectres MS/MS permettent de distinguer des différences de masse au niveau des fragments y et b. Les performances des spectromètres de masse actuels offrent ainsi la possibilité de détecter des faibles écarts de masse des fragments par rapport à la

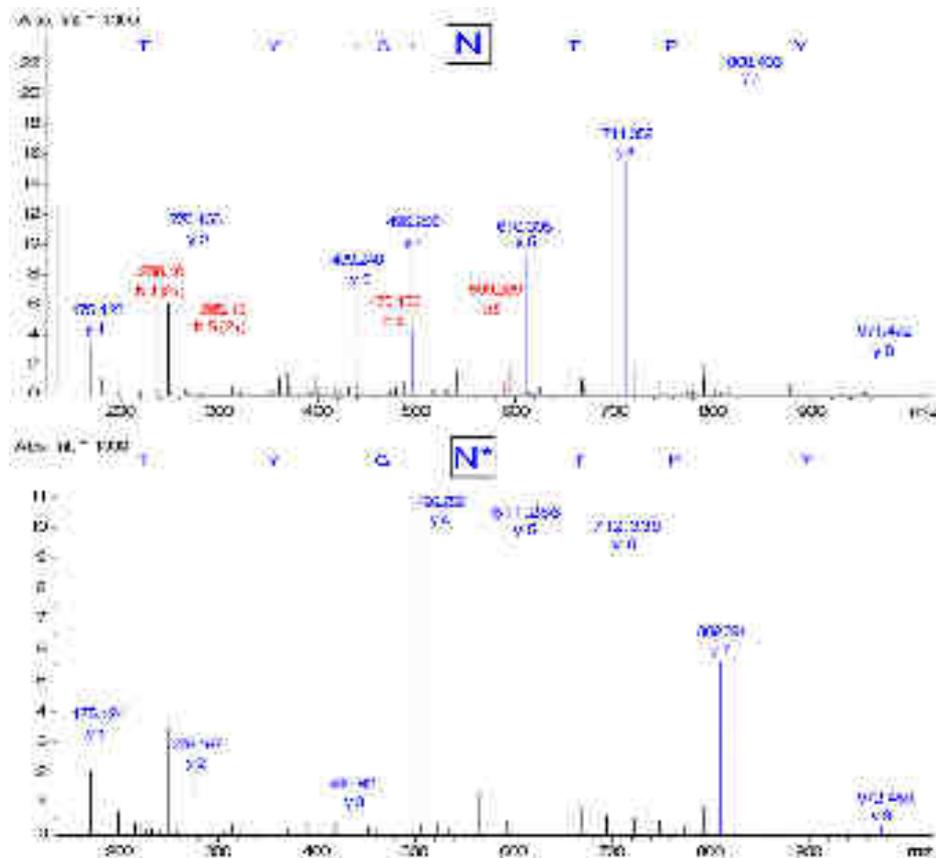


Figure 30. Spectre MS/MS d'un peptide digéré, montrant l'enchaînement d'ions y correspondant à la fragmentation du peptide (30.A) et du même peptide dont l'asparagine a subi une déamidation (+0.98 Da) (30.B).

masse théorique de l'acide aminé ce qui donne permet d'identifier de manière précise la modification chimique subi par l'acide aminé. La figure 30 montre la capacité à partir des spectres MS/MS de distinguer la déamidation d'une asparagine. Cette différence de masse peut être alors confirmée par rapport à la masse totale du peptide visé, qui doit elle aussi posséder un écart de masse similaire.

Toutefois la caractérisation précise de ces modifications est conditionnée par la détection des fragments y et/ou b correspondant à l'acide aminé modifié. De plus, certaines de ces modifications n'entraînent pas de variations de masse du peptide et il est alors nécessaire d'employer des méthodologies spécifiques afin de les mettre en évidence.

3.3.3. Glycosylation des protéines

La glycosylation fait partie des PTM les plus communément présentes. Les glycosylations sont incorporées généralement aux protéines lors de leur excrétion dans le milieu extracellulaire. Elle influe entre autre sur les propriétés physico-chimiques de la protéine tel que la solubilité ou la stabilité. La glycosylation peut également jouer un rôle prépondérant dans l'établissement de la conformation spatiale de la glycoprotéine, l'activité d'une protéine étant largement tributaire de sa conformation spatiale. Ainsi la glycosylation peut impacter de manière indirecte l'activité d'une protéine [136]. Les glycosylations sont généralement spécifiques d'une espèce et jouent un rôle important dans le développement d'un individu mais sont également sujets à une grande variabilité. Pour cette raison l'étude de ce type de PTM apparaît pertinente, de plus les développements de l'industrie biopharmaceutique motivent également ce type d'étude : une part non négligeable de traitements thérapeutiques mettent en jeu l'action de glycoprotéines (anticorps monoclonaux par exemple).

a) Structure des glycosylations

Les glycosylations sont constituées de polysaccharides fixés de manière covalente sur le squelette peptidique de la protéine. On distingue deux types de glycosylation :

- Les N-glycosylations sont fixées sur le squelette peptidique par l'intermédiaire de l'azote d'un acide aminé de type asparagine (Asp)
- Les O-glycosylations sont fixées à la protéine par l'intermédiaire du groupement hydroxyle des acides aminés de type sérine (Ser), thréonine (thr), hydroxyproline ou encore hydroxylysine.

Les N-glycosylations apparaissent sur des sites particuliers de la séquence peptidique, ainsi la présence d'un tripeptide de type Asn-Xaa-Ser/Thr (Xaa ne pouvant être une proline) est nécessaire pour que le résidu Asn soit glycosylé mais pas suffisant [137]. Les N-glycannes ont un motif particulier communs à toutes les N-glycosylations : celui-ci est appelé noyau ou "core"

mannochitobiose, il est constitué de deux résidus N-acétylglucosamine (GlcNac) et d'un mannose (Man). Les N-glycannes sont divisés en trois catégories (figure 31) :

- Les N-glycosylations de type oligomannoses sont caractérisées par la présence, outre le noyau, uniquement de mannose.
- Les N-glycosylations de type complexe voient le mannose composant le noyau disubstitué par deux GlcNac suivi ensuite de saccharides variables.
- Les N-glycosylations de type hybride regroupent les caractéristiques des deux autres catégories de part et d'autre de la substitution du noyau.

b) Analyse des glycosylations par spectrométrie de masse

Les techniques d'ionisation principalement utilisées pour l'analyse de glycosylation par MS sont le MALDI et l'ESI. Ces procédés d'ionisation permettent l'identification de glycannes « libres », de glycopeptides ou de glycoprotéines [138]. La caractérisation structurale des glycosylations par MS a pu s'imposer comme une méthode complémentaire à l'analyse RMN : en effet la MS ne permet pas d'approcher la complexité structurale des glycannes aussi finement que l'analyse RMN mais possède comme avantage majeur une plus grande sensibilité et une tolérance bien plus importante aux impuretés que la RMN. L'analyse des glycannes par MS permet entre autre d'identifier l'hétérogénéité des différents glycoformes en fonction de leur rapport m/z.

Le développement de stratégies de caractérisation des glycannes utilisant la spectrométrie de masse en tandem a également contribué à l'émergence de ce type de caractérisation. L'utilisation d'analyseur de masse de type piège à ions (*ion trap*, IT) apparait tout à fait approprié pour ce genre de caractérisation avec notamment la possibilité de réaliser des fragmentations successives (on parle de MSⁿ) afin d'en déduire l'enchaînement des monosaccharides [139]. Pour autant, la mise en œuvre d'autres types d'analyseur de masse est couramment réalisée pour ce type de caractérisation [140].

La figure 31 reprend ainsi les différents type de glycosylations pouvant être observées ainsi que la nomenclature actuellement utilisée pour représenter les différents glycannes.

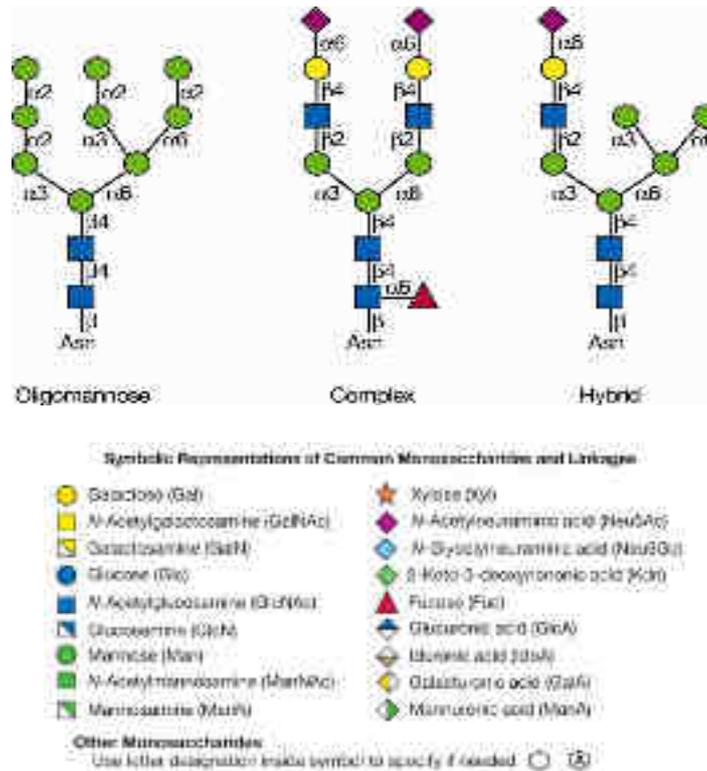


Figure 31. Représentation schématique des différents types de glycosylation accompagnée de la nomenclature de représentation des différents hexoses pouvant composés la glycosylation. Extrait de [141].

c) Fragmentation des polysaccharides

Les fragmentations des glycanes en spectrométrie de masse sont observées au niveau des liaisons interglycosidiques (séries B, C et Y, Z) dans les cas de fragmentations à basses énergies, typiquement mis en jeu dans le cadre de fragmentation par CID (figure 32). La fragmentation à hautes énergies génère la rupture des liaisons intracycliques des monosaccharides (série A et X).

La nomenclature, établie par Domond et Costello, définit les fragments pouvant être obtenus, on différencie [142] :

- Les fragments comportant l'extrémité non réductrice du glycanne : on parle de série A, B et C.
- Les fragments comportant l'extrémité réductrice du glycanne : on parle de série X, Y et Z.

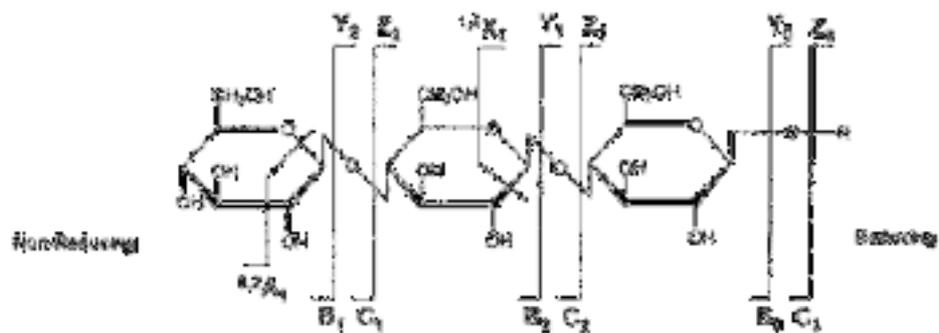


Figure 32. Nomenclature de fragmentation des polysaccharides en spectrométrie de masse en tandem. Adapté à partir de [142].

Références bibliographiques

79. **Wagner, E.**, *Nouvelles approches de la spectrométrie de masse en tandem pour la caractérisation de biomolécules : Applications à la protéomique*. 2004. p. 1 vol. (224 p.).
119. **Kahn, P.**, *MOLECULAR-BIOLOGY - FROM GENOME TO PROTEOME - LOOKING AT A CELLS PROTEINS*. *Science*, 1995. **270**(5235): p. 369-370.
120. **Anderson, L. and J. Seilhamer**, *A comparison of selected mRNA and protein abundances in human liver*. *ELECTROPHORESIS*, 1997. **18**(3-4): p. 533-537.
121. **Yates, J.R., C.I. Ruse, and A. Nakorchevsky**, *Proteomics by Mass Spectrometry: Approaches, Advances, and Applications, in Annual Review of Biomedical Engineering*. 2009. p. 49-79.
122. **Ge, Y., et al.**, *Top down characterization of larger proteins (45 kDa) by electron capture dissociation mass spectrometry*. *Journal of the American Chemical Society*, 2002. **124**(4): p. 672-678.
123. **Kelleher, N.L., et al.**, *Top Down versus Bottom Up Protein Characterization by Tandem High-Resolution Mass Spectrometry*. *Journal of the American Chemical Society*, 1999. **121**(4): p. 806-812.
124. **Han, X., et al.**, *Extending Top-Down Mass Spectrometry to Proteins with Masses Greater Than 200 Kilodaltons*. *Science*, 2006. **314**(5796): p. 109-112.
125. **Fornelli, L., et al.**, *Middle-Down Analysis of Monoclonal Antibodies with Electron Transfer Dissociation Orbitrap Fourier Transform Mass Spectrometry*. *Analytical Chemistry*, 2014. **86**(6): p. 3005-3012.
126. **Scherperel, G. and G.E. Reid**, *Emerging methods in proteomics: top-down protein characterization by multistage tandem mass spectrometry*. *Analyst*, 2007. **132**(6): p. 500-506.
127. **Biemann, K.**, *SEQUENCING OF PEPTIDES BY TANDEM MASS-SPECTROMETRY AND HIGH-ENERGY COLLISION-INDUCED DISSOCIATION*. *Methods in Enzymology*, 1990. **193**: p. 455-479.
128. **Roepstorff, P. and J. Fohlman**, *PROPOSAL FOR A COMMON NOMENCLATURE FOR SEQUENCE IONS IN MASS-SPECTRA OF PEPTIDES*. *Biomedical Mass Spectrometry*, 1984. **11**(11): p. 601-601.
129. **Johnson, R.S., et al.**, *Novel fragmentation process of peptides by collision-induced decomposition in a tandem mass spectrometer: differentiation of leucine and isoleucine*. *Analytical Chemistry*, 1987. **59**(21): p. 2621-2625.
130. **Yates, J.R., et al.**, *Peptide Mass Maps: A Highly Informative Approach to Protein Identification*. *Analytical Biochemistry*, 1993. **214**(2): p. 397-408.
131. **James, P., et al.**, *Protein Identification by Mass Profile Fingerprinting*. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 1993. **195**(1): p. 58-64.
132. **Pappin, D.J.C., P. Hojrup, and A.J. Bleasby**, *Rapid identification of proteins by peptide-mass fingerprinting*. *Current Biology*, 1993. **3**(6): p. 327-332.

133. **Yates, J.R., et al.**, *METHOD TO CORRELATE TANDEM MASS-SPECTRA OF MODIFIED PEPTIDES TO AMINO-ACID-SEQUENCES IN THE PROTEIN DATABASE*. Analytical Chemistry, 1995. **67**(8): p. 1426-1436.
134. **Mann, M. and O.N. Jensen**, *Proteomic analysis of post-translational modifications*. Nat Biotech, 2003. **21**(3): p. 255-261.
135. **Mann, M. and O.N. Jensen**, *Proteomic analysis of post-translational modifications*. Nature Biotechnology, 2003. **21**(3): p. 255-261.
136. **Krapp, S., et al.**, *Structural Analysis of Human IgG-Fc Glycoforms Reveals a Correlation Between Glycosylation and Structural Integrity*. Journal of Molecular Biology, 2003. **325**(5): p. 979-989.
137. **Marshall, R.D.**, *Glycoproteins*. Annual Review of Biochemistry, 1972. **41**(1): p. 673-702.
138. **Jaquinod, M., et al.**, *Mass spectrometric characterisation of post-translational modification and genetic variation in human tetranectin*. Biological chemistry, 1999. **380**(11): p. 1307-1314.
139. **Weiskopf, A.S., P. Vouros, and D.J. Harvey**, *Electrospray Ionization-Ion Trap Mass Spectrometry for Structural Analysis of Complex N-Linked Glycoprotein Oligosaccharides*. Analytical Chemistry, 1998. **70**(20): p. 4441-4447.
140. **Huffman, J.E., et al.**, *Comparative Performance of Four Methods for High-throughput Glycosylation Analysis of Immunoglobulin G in Genetic and Epidemiological Research*. Molecular & Cellular Proteomics, 2014. **13**(6): p. 1598-1610.
141. **Stanley, P.S., H; Taniguchi, N; Varki, A.**, *Essentials of Glycobiology, Chapter 8 N-Glycans*. 2009: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
142. **Domon, B. and C.E. Costello**, *A SYSTEMATIC NOMENCLATURE FOR CARBOHYDRATE FRAGMENTATIONS IN FAB-MS MS SPECTRA OF GLYCOCONJUGATES*. Glycoconjugate Journal, 1988. **5**(4): p. 397-409.

V - Anticorps monoclonaux

1. Introduction

En 1890, Emil Von Behring et Shibasaburo Kitasato ont démontré que l'injection d'une dose non mortelle de toxine diphtérique à un animal (généralement des chevaux) pouvait protéger celui-ci contre une contamination létale ultérieure. De plus, l'immunité peut être transmise à un autre animal en injectant un échantillon de sérum provenant d'un animal dont la réponse immunitaire a été activée [143]. Ils en déduisirent que cette immunité est dû à l'action d'une substance présente dans le sang et responsable de la protection spécifiquement contre un type d'agent infectieux. Les études sur le sérum ont ensuite permis d'identifier les anticorps comme étant des protéines composant les gammas globulines du plasma [144].

Les anticorps, ou encore immunoglobulines sont des protéines présentes dans les fluides biologiques ou en tant que récepteurs membranaires à la surface des lymphocytes. Ils sont produits par le système immunitaire afin d'identifier et de neutraliser les agents étrangers, appelés antigènes, tels que les virus, bactéries... Un anticorps est spécifique d'un antigène, la reconnaissance de l'épitope de l'antigène est possible grâce au site complémentaire présent sur l'anticorps appelé paratope. Des études ont ainsi montré qu'un individu produit près de 10 milliards d'anticorps différents, chacun spécifique d'un antigène unique [145]. Lorsque l'anticorps est en contact avec son antigène associé, il se fixe sur celui-ci afin de faciliter l'élimination de l'agent infectieux par le système immunitaire.

L'utilisation d'anticorps à des fins thérapeutiques a longtemps été limitée par l'absence de méthode de production efficace permettant la production d'anticorps spécifiques à grande échelle mais également la difficulté à identifier un épitope potentiellement d'intérêt. En 1975 Köhler et Milstein décrivent une méthode permettant de produire en grande quantité un type spécifique d'anticorps prédéfini par hybridation cellulaire entre des cellules de rate de souris et des cellules myéloïdes [146], ouvrant la voie à la production d'anticorps monoclonaux c'est-à-dire issu d'une unique lignée cellulaire.

Les progrès considérables effectués dans ces domaines ont permis l'introduction depuis environ deux décennies d'anticorps monoclonaux (mAbs) utilisés en tant que traitements thérapeutiques et font que l'emploi de ce type de protéines est aujourd'hui l'un des secteurs de la recherche thérapeutique les plus actifs.

2. Structure et caractéristiques des anticorps monoclonaux

Les anticorps sont des glycoprotéines de la catégorie des immunoglobulines (Ig), à l'heure actuelle les mAbs produit par l'industrie biopharmaceutique sont essentiellement des immunoglobulines G (IgG). Ils sont composés de deux chaînes lourdes (HC) et deux chaînes légères (LC) identiques. Comme l'illustre la figure 33, chacune des chaînes composant le mAb peut être divisé entre deux domaines :

- Une région variable mise en jeu dans la reconnaissance avec l'épitope de l'antigène : V_H pour la HC et V_L dans le cas de la LC.
- Une région constante, commune à tous les anticorps, impliquée dans la reconnaissance avec le système immunitaire : C_H pour la HC et C_L dans le cas de la LC.

Les différentes parties variables composant le mAb contiennent des régions dites hypervariables : ces régions (également appelées *complementarity determining region*, CDR), restreintes et localisées sur la chaîne peptidique sont responsables de la spécificité entre l'épitope et la paratope (Figure 33). Les différentes chaînes sont reliées entre elles par une série de ponts disulfures, ce qui confère à l'anticorps sa flexibilité et lui donne sa forme en Y caractéristique, dont le nombre varie en fonction de la catégorie d'IgG. Les IgG sont divisées en quatre sous-classes en fonction du nombre de pont disulfures liant les deux HC : deux liaisons pour les IgG 1 et IgG 4, quatre liaisons dans le cas des IgG 2 contre quinze pour les IgG 3. Le domaine variable de l'anticorps F_{ab} est situé sur la partie supérieure de la forme en Y tandis que le domaine constant de l'anticorps F_c sur la partie inférieure.

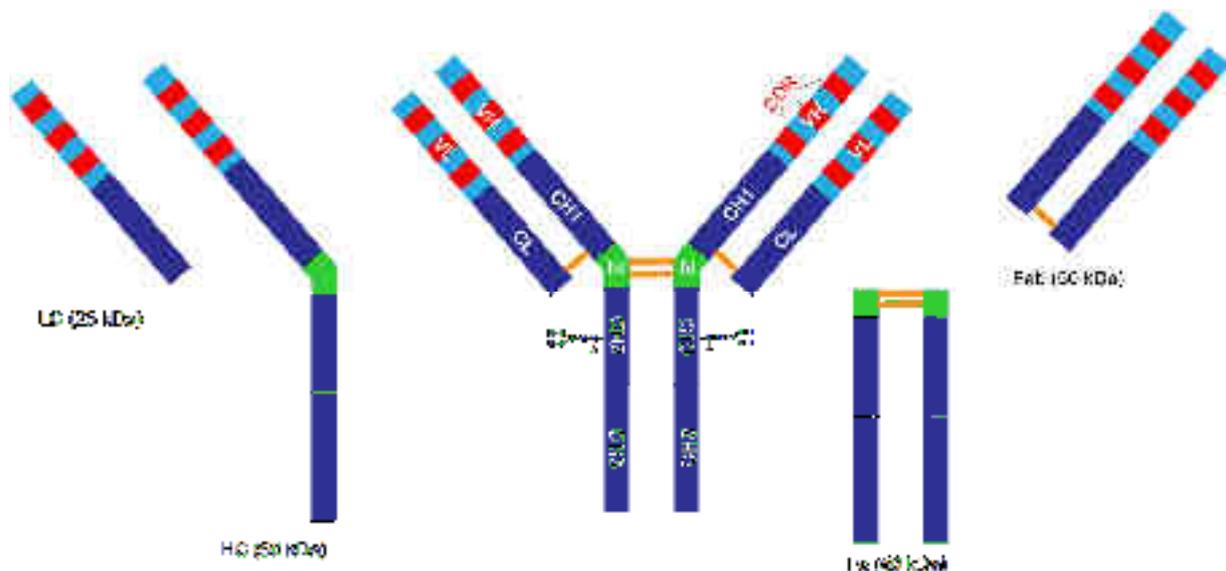


Figure 33. Représentation schématique de la structure d'un mAb et de ces différentes régions. Au centre la structure complète en Y caractéristique des anticorps. Les masses approximatives des différentes régions sont données à titre indicatif.

L'ensemble du mAb a une masse moléculaire proche de 150 kDa. Les mAbs sont des protéines glycosylées. Les glycosylations ne représentent qu'environ 3% de la masse totale du mAb, elles jouent pourtant un rôle important dans leurs propriétés physico-chimiques. La glycosylation des mAbs revêt également un aspect capitale car leur nature influence de manière significative l'activité cytotoxique dépendante des anticorps (*antibody - dependent cell - mediated cytotoxicity*, ADCC) et l'activité cytotoxique par l'intermédiaire du complément (*complement dependent cytotoxicity*, CDC) [136, [147, [148]. Les glycosylations portées par les mAbs actuellement utilisés comme traitements thérapeutiques sont variables au sein même d'une population de mAbs produit par un unique système d'expression : celles-ci sont généralement de type glycosylations complexes ou de manière plus marginale de type mannoside. Les glycosylations fucosylés sont les plus abondantes mais il est commun de détecter faiblement la présence de glycosylations non fucosylés.

La nomenclature utilisée pour nommer les mAbs traduit directement la technologie utilisée pour produire le dit anticorps : le type de mAb produit (murin, chimérique ou humain) ou encore l'origine de l'anticorps sélectionné (Figure 34).

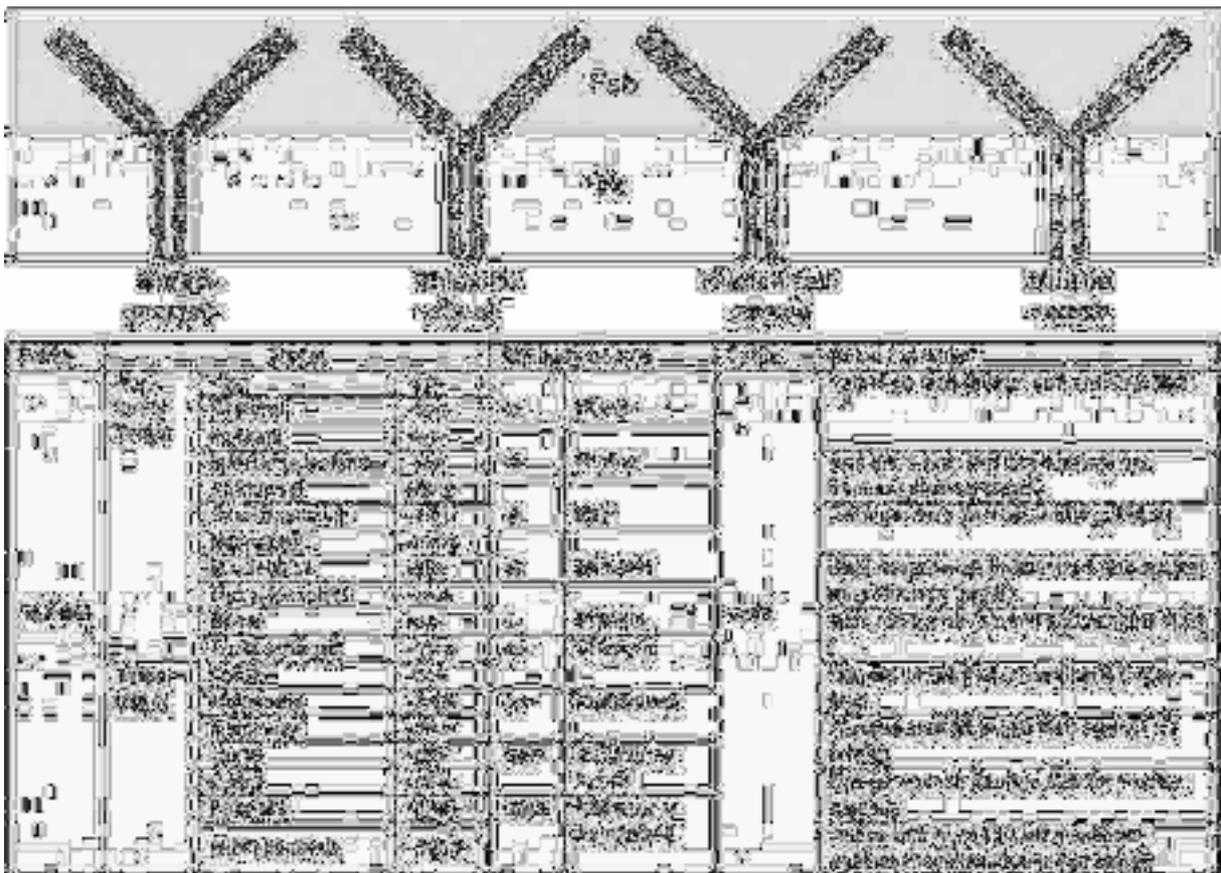


Figure 34. Nomenclature utilisée pour nommer les mAbs. Extrait de [149].

3. Utilisation thérapeutique des anticorps monoclonaux

Le premier mAb approuvé en tant que traitement thérapeutique fut muromomab-CD3 en 1986, celui-ci fut introduit afin de prévenir les risques de rejet dans les cas de greffes du rein. A l'heure actuelle 43 mAbs sont approuvés en tant que traitements thérapeutiques par les différentes autorités compétentes de par le monde ; la Food & Drug administration (FDA) aux USA et l'European Medicines Agency (EMA) pour l'UE sont en pointe dans ce domaine [150], tandis qu'environ 30 sont actuellement en phase 3 d'essais cliniques [151].

Les domaines d'applications thérapeutiques des mAbs se sont largement diversifiés depuis, leur utilisation pour le traitement de plusieurs formes de cancer a notamment permis d'augmenter de manière significative la chance de réussite du traitement. Les mAbs sont ainsi utilisés dans le traitement de certaines formes de cancer du sein (trastuzumab), cancer colorectal (cetuximab) ou cancer de l'estomac (Ramucirumab). Ils sont également employés dans le traitement d'autres pathologies :

- Polyarthrite rhumatoïde
- Maladies cardio-vasculaire
- Leucémies
- lymphome non hodgkinien
- dégénérescence maculaire
- Asthme
- Maladie de Crohn
- Sclérose
- Maladie d'Alzheimer
- Psoriasis

Le succès des mAbs en tant que traitement thérapeutique s'explique par leur grande spécificité permettant de cibler sélectivement un type de cellules par exemple par l'intermédiaire de la reconnaissance d'un épitope spécifique. Les mAbs possèdent également des propriétés pharmacocinétiques (PK) ou pharmacodynamiques (PD) favorables aux traitements thérapeutiques. Ainsi les mAbs sont à l'heure actuelle la classe d'agents thérapeutiques qui enregistre la progression la plus rapide. De plus lors de l'entrée en phase clinique I, le taux de réussite final pour l'approbation d'un nouveau mAb est de 23% [150] alors que le taux de réussite globale toutes molécules confondues est de 10,4% [152].

4. Anticorps monoclonaux biosimilaires : définition et enjeux

Les anticorps monoclonaux de première génération ont été approuvés à partir de la seconde moitié des années 1990. De ce fait, un certain nombre de mAbs vont bientôt tomber dans le

domaine public, y compris certains classés à l'heure actuelle comme étant des « *blockbusters* ». Le passage dans le domaine public des brevets protégeant ces anticorps donne ainsi la possibilité à d'autres compagnies de produire un « mAb générique » équivalent comme cela est courant dans le domaine des petites molécules. Ces « mAbs génériques » sont communément appelés biosimilaires (*biosimilars* ou encore *follow-up biologics* pour la FDA).

Il convient de différencier pour ce type de molécules différentes catégories :

- Les **biosimilaires** qui sont uniquement des versions « génériques » de mAbs déjà commercialisés. Les biosimilaires tentent ainsi de se rapprocher au maximum de la structure du mAb original et sont utilisés pour le traitement des mêmes pathologies.
- Les **biobetters** sont pour leur part également des mAbs « génériques » et sont par conséquent tout aussi proches du point de vue de leur structure au mAb original. Toutefois les biobetters voient leur structure partiellement modifiée afin d'améliorer l'efficacité du traitement, et peuvent par conséquent comporter des différences mineures par rapport au mAb original.

Les mAbs sont des glycoprotéines d'une grande complexité ([cf. Partie I. V. 2. Structure des anticorps monoclonaux](#)), de plus les procédés de production utilisés font que ces molécules sont sujettes à une grande diversité de micro-hétérogénéités. Ces micro-hétérogénéités (ou micro-variants) rendent quasi impossible, pour une compagnie tierce, de produire strictement la même protéine. Prenant en compte de telles considérations, les autorités de régulation travaillent depuis plusieurs années afin d'établir des conditions indispensables permettant d'aboutir à l'approbation de biosimilaires sans pour autant réaliser l'ensemble des essais cliniques comme cela est nécessaire dans le cadre de la validation d'un nouveau type de traitement.

Ces travaux ont récemment abouti à la rédaction par l'EMA de directives décrivant la marche à suivre afin d'obtenir l'approbation d'un candidat biosimilaire [153]. Ces directives expliquent comment démontrer de manière structurée la bio-similarité entre un mAb déjà commercialisé et un candidat biosimilaire. Elles décrivent notamment les points critiques devant être communs entre les deux protéines afin de pouvoir être considérées comme biosimilaires, ces critères concernent notamment la structure à différents niveaux de la protéine tout comme ses propriétés physico-chimiques.

Compte tenu du succès des mAbs dans l'industrie biopharmaceutique, le développement de biosimilaires représentent pour nombres d'acteurs, dont principalement de nouveaux entrants, un secteur de développement d'intérêt. Ceci se traduit par des activités de R&D dans l'industrie soutenues qui ont abouti peu après la publication de directives concernant l'approbation de

biosimilaires à l'approbation par l'EMA d'un biosimilaire de infliximab [154] suivi d'un biosimilaire de trastuzumab en Inde.

5. Utilisation de la spectrométrie de masse pour la caractérisation d'anticorps monoclonaux

5.1. Introduction

L'utilisation de mAbs en tant que traitement thérapeutique implique la capacité de les caractériser de manière approfondie mais également d'estimer le degré d'hétérogénéité d'un échantillon de mAbs (abondance des différentes glycoformes par exemple). La caractérisation des mAbs apparaît donc comme un défi pour les sciences analytiques par plusieurs aspects :

- Les mAbs sont des glycoprotéines tétramériques qui peuvent être soumises à une grande variété de micro-hétérogénéités qui influent de manière importante sur l'immunogénicité de la protéine : glycosylations, PTMs substitution d'acides aminés, etc. Ces hétérogénéités, bien que cruciales, n'induisent qu'une faible variation compte tenu des 150 kDa que représente la protéine complète. De plus, ces hétérogénéités peuvent avoir des niveaux d'occurrence très faibles ce qui rend difficile leur caractérisation.
- La caractérisation de mAbs doit être effectuée sur différents niveaux de la structure de la protéine, ce qui implique l'utilisation de différentes méthodologies analytiques afin de pouvoir réaliser une caractérisation approfondie de l'échantillon (Figure 35).

Dans un tel contexte, la MS occupe désormais un rôle clé dans la caractérisation des mAbs. Cette évolution s'explique notamment par l'excellente sélectivité et sensibilité délivrée par la MS tout comme la possibilité d'obtenir des informations structurales dans un certain nombre de méthodologies par MS. La MS est ainsi impliquée dans la caractérisation de mAbs à tous les niveaux de la structure de la protéine : analyse de la protéine entière [155], caractérisation de la séquence d'acides aminés [156], glycoformes [157], étude du complexe anticorps/antigène [158], ponts disulfures [159], etc.

On constate également dans la littérature qu'un certain nombre d'approches innovantes impliquant l'utilisation de la MS sont actuellement développées afin de contrecarrer la complexité du point de vue analytique qui émerge de la caractérisation de ce type de protéines [125, [160, [161]. Les niveaux de caractérisation abordés dans le paragraphe sont restreints aux types de caractérisation abordés dans le cadre de ces travaux de thèse.

limitation, on réalise communément deux digestions en utilisant des enzymes différentes. Les deux digestats sont analysés par LC-MS/MS indépendamment puis les identifications sont croisées afin d'obtenir un recouvrement complet de la séquence d'acides aminés du mAbs.

5.3. Caractérisation des glycosylations

Les glycosylations peuvent être caractérisées par différentes méthodologies :

- fixées sur la protéine ou sur le peptide digéré portant la glycosylation [164].
- les glycanes libres peuvent être analysés après avoir été libérés par un traitement de l'échantillon avec un enzyme permettant la déglycosylation [165].

La caractérisation des glycosylations, sans cliver au préalable la liaison glycanne-squelette peptidique, peut tout à fait être réalisée conjointement au *peptide mapping*. En effet les enzymes de digestion protéolytique n'ont aucune activité sur la glycosylation. La caractérisation des glycosylations encore présentes sur le peptide digéré possèdent comme principale avantage de pouvoir localiser de manière précise l'acide aminé qui la porte. Les mAbs peuvent également posséder plusieurs sites de glycosylations, il est par conséquent possible de caractériser les sites de glycosylations indépendamment alors qu'une libération préalable des glycanes ne permettrait pas de différencier de cette manière les glycosylations en fonction de leur position sur la protéine. De plus la MS/MS permet la fragmentation des glycanes encore fixée sur le glycopeptide, ce qui permet d'obtenir d'importantes informations sur la structure de la glycosylation.

5.4. Caractérisation de modifications post-traductionnelles d'intérêts

En tant que protéine, les mAbs sont également soumis aux modifications chimiques post-traductionnelles communes. Certaines de ces PTMs sont considérées comme des attributs critiques de qualité (*critical quality attributes*, CQA) car elles modifient la conformation de la protéine et impacte significativement son activité. Ces PTMs, dont la nature et la position sont dépendantes du mAb étudié, peuvent donc être suivies afin d'évaluer la stabilité de l'échantillon. Ces PTMs sont également décrites dans la littérature comme *PTMs hot-spots*.

Parmi les PTMs d'intérêt, on trouve le plus conventionnellement :

- La cyclisation de l'acide glutamique en N-terminal en acide pyroglutamique (pE)
- La déamidation de l'asparagine en acide aspartique (deaN)
- L'oxydation de méthionine (oxiM)
- L'isomérisation de l'acide aspartique (isoD)
- L'oxydation des tryptophanes (oxiW)

La méthodologie de protéomique *bottom-up* s'applique particulièrement à la caractérisation de ce type de PTMs. A l'exception de l'isomérisation de l'acide aspartique, celles-ci induisent une variation de masse qui peut donc être identifiée par le spectromètre de masse. De plus la fragmentation des peptides en MS/MS permet dans la majorité des cas de caractériser sans ambiguïté l'acide aminé modifié [166]. La figure 36 présente ainsi les principaux hot-spots identifiés dans la littérature dans le cas de trastuzumab.

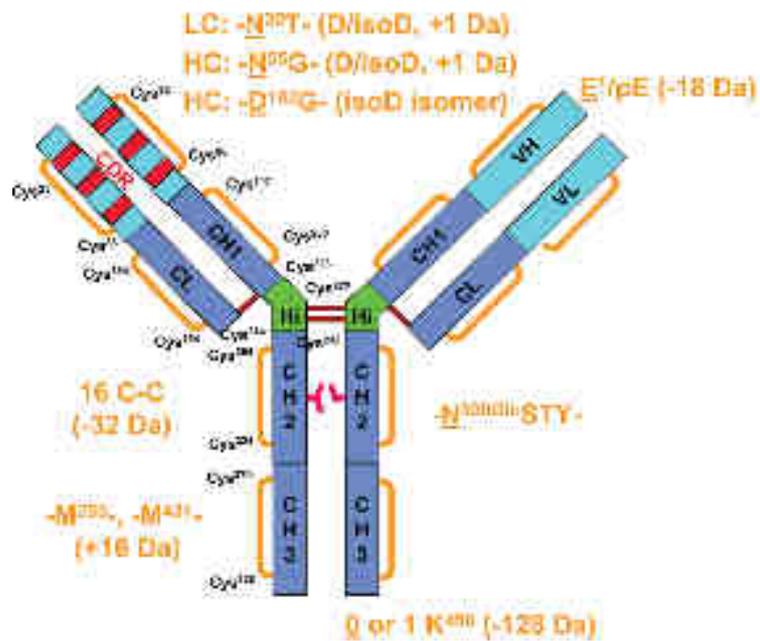


Figure 36. Représentation schématique présentant les principaux PTMs hot-spots portés par Trastuzumab et les différences de masse induites par ces modifications. Extrait de [167].

Références bibliographiques

125. **Fornelli, L., et al.**, *Middle-Down Analysis of Monoclonal Antibodies with Electron Transfer Dissociation Orbitrap Fourier Transform Mass Spectrometry*. Analytical Chemistry, 2014. **86**(6): p. 3005-3012.
136. **Krapp, S., et al.**, *Structural Analysis of Human IgG-Fc Glycoforms Reveals a Correlation Between Glycosylation and Structural Integrity*. Journal of Molecular Biology, 2003. **325**(5): p. 979-989.
143. **Von Behring, E. and S. Kitasato**, [*The mechanism of diphtheria immunity and tetanus immunity in animals. 1890*]. Molecular immunology, 1991. **28**(12): p. 1317, 1319-20.
144. **Tiselius, A. and E.A. Kabat**, *AN ELECTROPHORETIC STUDY OF IMMUNE SERA AND PURIFIED ANTIBODY PREPARATIONS*. The Journal of Experimental Medicine, 1939. **69**(1): p. 119-131.
145. **Fanning, L.J., A.M. Connor, and G.E. Wu**, *Development of the immunoglobulin repertoire*. Clinical Immunology and Immunopathology, 1996. **79**(1): p. 1-14.
146. **Kohler, G. and C. Milstein**, *Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity*. Nature, 1975. **256**(5517): p. 495-497.
147. **Dalziel, M., et al.**, *Emerging principles for the therapeutic exploitation of glycosylation*. Science, 2014. **343**(6166).
148. **Jefferis, R.**, *Recombinant antibody therapeutics: the impact of glycosylation on mechanisms of action*. Trends in Pharmacological Sciences, 2009. **30**(7): p. 356-362.
149. **An, Z.**, *Therapeutic Monoclonal Antibodies: From Bench to Clinic*. 2009: Wiley.
150. **Reichert, J.M.**, *Antibodies to watch in 2014: Mid-year update*. mAbs, 2014. **6**(4): p. 799-802.
151. **Beck, A., et al.**, *Strategies and challenges for the next generation of therapeutic antibodies*. Nat Rev Immunol, 2010. **10**(5): p. 345-352.
152. **Hay, M., et al.**, *Clinical development success rates for investigational drugs*. Nat Biotech, 2014. **32**(1): p. 40-51.
153. **Agency, E.M.**, *Guideline on Similar Biological Medicinal Products*. 22 May 2013. **CHMP/437/04 Rev 1**.
154. **Beck, A. and J.M. Reichert**, *Approval of the first biosimilar antibodies in Europe: A major landmark for the biopharmaceutical industry*. mAbs, 2013. **5**(5): p. 621-623.
155. **Valeja, S.G., et al.**, *Unit Mass Baseline Resolution for an Intact 148 kDa Therapeutic Monoclonal Antibody by Fourier Transform Ion Cyclotron Resonance Mass Spectrometry*. Analytical Chemistry, 2011. **83**(22): p. 8391-8395.
156. **Manuilov, A.V., C.H. Radziejewski, and D.H. Lee**, *Comparability analysis of protein therapeutics by bottom-up LC-MS with stable isotope-tagged reference standards*. mAbs, 2011. **3**(4): p. 387-395.

157. **Wagner-Rousset, E., et al.**, *The way forward, enhanced characterization of therapeutic antibody glycosylation: Comparison of three level mass spectrometry-based strategies*. Journal of Chromatography B, 2008. **872**(1–2): p. 23-37.
158. **Kaltashov, I.A., et al.**, *Advances and challenges in analytical characterization of biotechnology products: Mass spectrometry-based approaches to study properties and behavior of protein therapeutics*. Biotechnology Advances, 2012. **30**(1): p. 210-222.
159. **Almagro, J.C., et al.**, *Characterization of a high-affinity human antibody with a disulfide bridge in the third complementarity-determining region of the heavy chain*. Journal of Molecular Recognition, 2012. **25**(3): p. 125-135.
160. **Rosati, S., et al.**, *In-depth qualitative and quantitative analysis of composite glycosylation profiles and other micro-heterogeneity on intact monoclonal antibodies by high-resolution native mass spectrometry using a modified Orbitrap*. Mabs, 2013. **5**(6): p. 917-924.
161. **Debaene, F., et al.**, *Time Resolved Native Ion-Mobility Mass Spectrometry to Monitor Dynamics of IgG4 Fab Arm Exchange and “Bispecific” Monoclonal Antibody Formation*. Analytical Chemistry, 2013. **85**(20): p. 9785-9792.
162. **Beck, A., et al.**, *Characterization of Therapeutic Antibodies and Related Products*. Analytical Chemistry, 2013. **85**(2): p. 715-736.
163. **Beck, A., et al.**, *Characterization by liquid chromatography combined with mass spectrometry of monoclonal anti-IGF-1 receptor antibodies produced in CHO and NSO cells*. Journal of Chromatography B-Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences, 2005. **819**(2): p. 203-218.
164. **Stadlmann, J., et al.**, *Analysis of immunoglobulin glycosylation by LC-ESI-MS of glycopeptides and oligosaccharides*. PROTEOMICS, 2008. **8**(14): p. 2858-2871.
165. **Zhang, H., et al.**, *Identification and quantification of N-linked glycoproteins using hydrazide chemistry, stable isotope labeling and mass spectrometry*. Nature Biotechnology, 2003. **21**(6): p. 660-666.
166. **Diepold, K., et al.**, *Simultaneous Assessment of Asp Isomerization and Asn Deamidation in Recombinant Antibodies by LC-MS following Incubation at Elevated Temperatures*. PLoS ONE, 2012. **7**(1): p. e30295.
167. **Beck, A., S. Sanglier-Cianfèrani, and A. Van Dorsselaer**, *Biosimilar, Biobetter, and Next Generation Antibody Characterization by Mass Spectrometry*. Analytical Chemistry, 2012. **84**(11): p. 4637-4646.

PARTIE II : Mise en œuvre expérimentale

I - Système d'électrophorèse capillaire Beckman Coulter PA 800 *plus* / CESI8000

1. Introduction

Dans le cadre de ces travaux de thèse, le couplage CESI-MS a dans un premier temps été réalisé par l'intermédiaire d'un système d'électrophorèse capillaire PA 800 *plus* (Sciex separations) modifié en tant que prototype. A la commercialisation du système, le laboratoire a pu être équipé d'un système final CESI8000 (Sciex separations).

Les systèmes sont très largement similaires du point de vue de leur conception. Le système PA 800 *plus* est un instrument d'électrophorèse capillaire (CE) standard. Ce système peut réaliser des séparations sous des champs électriques dont la tension peut être 1 à 30 kV et l'intensité comprise entre 3 à 300 μ A. Pour l'orientation du champ électrique, la polarité des électrodes peut-être inversée. Par défaut en polarité dite « forward » l'électrode d'entrée est l'anode tandis que l'électrode de sortie est la cathode.

Les capillaires sont positionnés dans des cartouches afin d'assurer leur bon placement à l'intérieur du système, notamment au niveau des électrodes, et d'assurer la connexion avec le système permettant de thermostatier le capillaire durant la séparation. En utilisation CE classique, le système peut être équipé avec différents détecteurs : détecteur UV, détecteur à barrettes de diodes ou détecteur à fluorescence induite par laser. On note toutefois que dans le cadre du couplage avec la spectrométrie de masse à source ESI, il n'est pas à l'heure actuelle possible d'utiliser en concomitance avec le couplage l'un de ces détecteurs.

Durant la séparation, le capillaire est thermostaté par l'intermédiaire d'un liquide caloporteur circulant autour du capillaire. Il est important d'éviter l'échauffement du capillaire par effet Joule induit par le champ électrique appliqué pour réaliser la séparation, l'échauffement pouvant endommager le capillaire. Le système est également équipé d'un compartiment à échantillons réfrigéré.

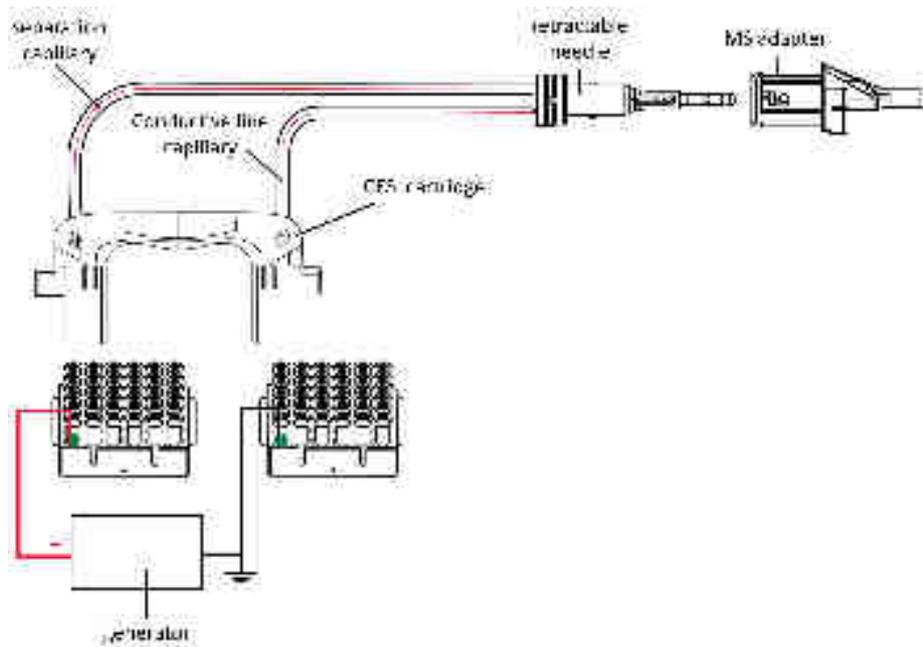


Figure 1. Représentation schématique d'une cartouche CESI8000.

Le système d'injection d'échantillon, mis à profit dans ces travaux de thèse, est constitué d'une seringue et réalise des injections hydrodynamiques. Ce système permet d'appliquer une pression à l'entrée du capillaire comprise entre 0.1 psi (6,89 mbar) et 100 psi (6,89 bar) par incrément de 0,1 psi. Il convient de préciser que l'injection par l'intermédiaire de vial positionné sur le portoir à échantillon du système ne permet pas d'excéder à une pression supérieure à 5 psi (344,74 mbar). Le vial doit être positionné sur le portoir à solution tampon pour pouvoir injecter avec une pression supérieure à 5 psi. Le système peut aussi créer une aspiration à l'une des extrémités du capillaire, cette aspiration peut être comprise entre 0.1 et 5 psi.

Comme cela a été évoqué, le système CESI8000 se rapproche du système PA 800 *plus* du point de vue de ces caractéristiques techniques. Le CESI8000 est dédié au couplage CE-ESI-MS et permet d'accueillir les cartouches de CESI-MS commerciale.

2. Utilisation des capillaires CESI-MS

Les capillaires CESI-MS disponibles à l'heure actuelle ont des caractéristiques et dimensions standards unique. Les capillaires permettant la mise en œuvre du couplage CESI-MS sont ainsi en silice vierge (longueur 95 cm ; diamètre interne 30 μm ; diamètre externe 175 μm) en ce qui concerne le capillaire de séparation. Le second capillaire, utilisé comme capillaire de contact électrique ([cf. Partie I. III.4.3. Interface CESI-MS](#)), est également en silice vierge (longueur 75 cm ; diamètre interne 75 μm ; diamètre externe 300 μm).

Comme évoqué dans la partie précédente, le capillaire de séparation subi une attaque à l'aide d'acide fluorhydrique au niveau de l'extrémité destinée à être positionnée dans la source ESI.

Ce traitement à l'acide rend les parois du capillaire poreuses et permet ainsi au courant électrique appliqué de traverser la paroi du capillaire. Le traitement est opéré sur une longueur d'environ 5 cm. Le capillaire de séparation traverse une canule en acier rempli d'électrolyte support (BGE) par l'intermédiaire du capillaire de contact (Partie I., figure 26). Cette canule est positionnée dans une aiguille rétractable : lorsque le capillaire n'est pas monté sur l'interface CESI-MS, l'aiguille est fermée protégeant ainsi l'extrémité du capillaire. A contrario lorsque le capillaire est positionné dans l'interface, l'aiguille est rétractée laissant apparaître l'extrémité traitée du capillaire de séparation (Figure 3.B).

Pression/Aspiration peuvent être appliquées sur le vial d'entrée du capillaire (sens *forward*) ou sur le vial de sortie du capillaire (sens *reverse*). En CE classique, l'application d'une pression revient à forcer l'introduction du liquide contenu dans le vial par l'entrée du capillaire (on parle d'*inlet*) en *forward* ou par la sortie du capillaire (on parle d'*outlet*) en *reverse*.

Dans le cadre du couplage CESI-MS, le système est composé de deux capillaires (Figure 1). L'application d'une pression sur le vial d'entrée entraîne la circulation du liquide contenu dans ce vial par le capillaire de séparation. L'application d'une pression sur le vial de sortie entraîne la circulation du liquide contenu dans le capillaire de contact. Ainsi appliquer une pression dans le sens *forward* entraîne le rinçage du capillaire de séparation tandis que l'application d'une pression dans le sens *reverse* permet le rinçage du capillaire de contact.

a) Conditionnement de capillaires neufs

Les capillaires n'ayant pas encore été utilisés nécessitent tout d'abord un conditionnement préalable afin de permettre leur bonne utilisation. Ce conditionnement consiste en une série de rinçage dont les objectifs sont multiples :

- Eliminer les traces de réactifs et de solvants résiduels pouvant être encore présente dans le capillaire
- Eliminer les particules de silice, issues de l'attaque acide des parois du capillaire, potentiellement présentes à l'intérieur du capillaire
- Vérifier la protonation de l'ensemble des silanols constituant les parois du capillaire

Les cycles de rinçage permettant le conditionnement des capillaires sont détaillés dans le tableau suivant :

Solution	Pression	Durée	Sens	Notes
methanol	75 psi	10 min	forward	
H ₂ O milliQ	75 psi	10 min	forward	
NaOH 0.1 M	75 psi	10 min	forward	

H ₂ O milliQ	75 psi	3 min	forward	
HCl 0.1 M	75 psi	10 min	forward	
H ₂ O milliQ	75 psi	3 min	forward	
H ₂ O milliQ	75 psi	5 min	reverse	Rinçage capillaire de contact
acide acétique 10%	75 psi	5 min	reverse	Rinçage BGE capillaire de contact
acide acétique 10%	75 psi	5 min	forward	Conditionnement final capillaire de séparation

Tableau 1. Séquence détaillant les différents rinçages permettant le conditionnement du capillaire

b) Rinçage du capillaire

Durant les travaux de thèse, il est apparu indispensable de réaliser un rinçage du capillaire après la séparation, afin d'améliorer la répétabilité des analyses. Les séparations réalisées dans le cadre de ces travaux de thèse ont été effectuées dans des BGE acides (cf. paragraphe suivant). Dans ces conditions, peptides et protéines sont présents sous forme cationique. Lors de l'électrophorèse, une partie des analytes peut s'adsorber sur les silanols non protonés du fait d'interactions électrostatiques. Cette adsorption peut être réversible ou irréversible, dans le cas des peptides elle est réversible. Si les peptides adsorbés ne sont pas éliminés avant l'injection suivante, ils entraînent une modification du potentiel zeta (cf. [Partie I. 1.2.2. Electroosmose](#)) ce qui se traduit expérimentalement par une modification du flux électroosmotique pour les mêmes conditions expérimentales. Sans rinçage entre deux injections, la répétabilité de la séparation est fortement compromise.

Favorablement les rinçages mis au point dans le cadre des travaux de thèse présentés dans cet ouvrage permettent d'éliminer les analytes résiduels et ont contribué à améliorer de manière significative la reproductibilité des analyses. Les cycles de rinçages à réaliser sont détaillés dans le tableau suivant :

Solution	Pression	Durée	Sens	Notes
methanol	75 psi	3 min	forward	
H ₂ O milliQ	75 psi	3 min	forward	
NaOH 0.1 M	75 psi	2 min	forward	
H ₂ O milliQ	75 psi	3 min	forward	
HCl 0.1 M	75 psi	3 min	forward	
H ₂ O milliQ	75 psi	5 min	forward	
acide acétique 10%	75 psi	5 min	forward	

Tableau 2. Séquence détaillant les différents rinçages permettant le rinçage du capillaire

3. Compatibilité des électrolytes supports

Les électrolytes support utilisés pour réaliser la séparation électrophorétique doivent être sélectionnés de manière à être compatible d'une part avec l'électrophorèse mais également avec l'ionisation par électrospray.

Le BGE doit par conséquent être un soluté permettant l'application du champ électrique, tout en étant suffisamment volatile pour favoriser durant l'ionisation ESI la formation de fines gouttelettes et l'évaporation rapide du BGE. De plus, le BGE doit garantir la protonation des analytes dans le cadre d'une analyse MS en mode positif. Enfin le flux électroosmotique généré lors de l'électrophorèse doit être suffisamment important pour maintenir l'ESI généré stable, toutefois un flux trop important entraîne rapidement les analytes vers le spectromètre empêchant ceux-ci de se séparer correctement.

Ainsi les BGE utilisés dans le cadre de ces travaux de thèse sont constitués d'acides faibles (acide acétique ou acide formique) dont la concentration est ajustée afin d'optimiser la force ionique du BGE. Il est possible d'ajouter une faible proportion de solvants organiques (acétonitrile, méthanol) afin de diminuer légèrement les phénomènes d'adsorption.

Il convient de noter qu'un certain nombre de tampons utilisés couramment en électrophorèse capillaire ne sont pas compatibles avec l'ionisation ESI (tampon borate, tampon phosphate), de même la tolérance de l'ESI au dodécylsulfate de sodium est relativement faible et limite son utilisation dans le cadre de couplage CE-ESI-MS.

4. Calculs des paramètres d'analyses

Le mécanisme d'injection du système d'électrophorèse capillaire délivre une pression, pouvant être extrêmement faible, pendant une durée donnée. Pour un volume d'injection désiré, il est donc nécessaire de pouvoir calculer ces deux paramètres. On utilise pour cela l'équation de Poiseuille :

$$V = \frac{\Delta P d^4 \pi t}{128 \eta L} \quad (1)$$

Où V désigne le volume, ΔP la pression appliquée en Pascals, d le diamètre interne du capillaire en mètres, t le durée d'application de la pression, η la viscosité du liquide en Pascals par seconde et L la longueur totale du capillaire.

Il est aussi possible de déterminer la viscosité du liquide contenu dans le vial par l'intermédiaire de cette équation. Pour cela les dimensions du capillaire doivent être connues, un marqueur

de flux est injecté à l'entrée du capillaire avec une pression donnée en continue. On mesure le temps nécessaire au marqueur pour atteindre la détection. Les dimensions du capillaire étant connues, il est possible d'en déduire le volume total du capillaire. L'équation (1) n'a pour inconnue alors que le facteur η , qui peut en être déduit des mesures de temps.

II - Couplage CESI-MS avec le microTOF-Q II

1. Introduction

Le microTOF-Q II (Bruker Daltonics) est un spectromètre de masse hybride de type ESI-Qq-TOF dit « de paillasse ». Ce spectromètre offre la possibilité d'effectuer des analyses MS mais également MS/MS. Le microTOF-Q II est équipé d'un filtre de masse quadripolaire dont la fonction est la sélection des ions parents dans le cadre d'analyse MS/MS. La fragmentation est réalisée dans une cellule de collision, la dissociation est réalisée par la collision de l'ion parent avec un gaz inerte (Ar ou N₂) induisant une fragmentation de type CID ([cf. Partie I. II.2.5.2. Dissociation induite par collision](#)). Cet instrument a été introduit dans les laboratoires à partir de 2008.

Les performances théoriques de ce spectromètre de masse sont les suivantes :

- Gamme de masse : 10 – 8000 m/z
- Précision sur la mesure de masse : inférieure à 10 ppm
- Résolution : 17500 – 20000
- Fréquence maximale d'acquisition : 20 Hz

Cet instrument de haute résolution allie à la capacité de sélection des ions fourni par le filtre quadripolaire, l'excellente résolution et précision sur la mesure de masse délivrée par l'analyseur TOF, notamment en MS/MS.

La figure 11 ([cf. Partie I. II. 2.2. Interface du spectromètre microTOF-Q II](#)) représente de manière schématique les différents éléments qui composent ce spectromètre de masse.

2. Paramètres optimisés dans le cadre du couplage CESI-MS

Lors de la mise en œuvre du couplage CESI-MS avec le microTOF-Q II, un certain nombre de paramètres ont dû être ajustés afin de s'adapter au nanoESI généré par l'intermédiaire de l'interface CESI-MS.

Le système d'interfaçage se présente sous la forme d'une source s'adaptant directement sur le système de fixation du spectromètre de masse, en remplacement de la source ESI

classique. Le système permet de positionner la sortie du capillaire de séparation au centre de l'interface. L'extrémité du capillaire est placée dans une position coaxiale à l'entrée du spectromètre.

Lors du couplage CE-ESI-MS, deux champs électriques sont mis en jeu :

- Le champ électrique nécessaire pour la séparation électrophorétique, pour rappel sa tension peut aller jusqu'à 30 kV
- Le champ électrique utilisé pour l'ionisation ESI, la différence de potentiel est comprise entre 900 et 5000 V en fonction du type d'application

Etant donné leur proximité, le principal risque lors de la mise en œuvre du couplage est la formation d'arc électrique du fait de la différence de potentiel entre les différents éléments du couplage. Il est par conséquent important de comprendre le fonctionnement en détail de l'interface CESI-MS mais aussi le mode de fonctionnement de la source du spectromètre.

Sur les sources ESI de la société Bruker, le nébuliseur ESI est connecté à la terre tandis que la différence de potentiel est appliquée au niveau de l'entrée du spectromètre de masse. Pour le couplage, l'aiguille rétractable du système CESI-MS est l'équivalent du nébuliseur. Il est par conséquent nécessaire que la canule en acier soit connectée à la terre, pour cela un connecteur vient se positionner à son contact pour aller se connecter sur la prise « terre » situé sur l'armature de la CE.

Pour le couplage CESI-MS, la source du microTOF-Q II doit être en mode « nanoESI online », sélectionné par l'intermédiaire du logiciel de pilotage MS. Ce mode supprime le gaz de nébulisation, inutile pour le couplage vu les faibles débits mis en jeu. L'optimisation des paramètres de la source a permis d'aboutir aux données suivantes :

- Potentiel ESI (**ESI voltage**) : entre -900 et -1800 V
- Débit de gaz séchant (**dry gas**) : entre 1,2 et 1,5 L/min
- Température de la source (**dry temp.**) : entre 150 et 180°C

Le potentiel ESI utilisé est certainement le paramètre le plus important. La distance entre l'extrémité du capillaire de séparation et l'entrée du spectromètre de masse est comprise entre 1 et 5 mm, pouvant être ajusté par l'utilisateur. Cette proximité et le faible débit induit par le système expliquent que le potentiel à appliquer pour maintenir un ESI stable est bien inférieur aux valeurs appliqués en ESI classique.

La valeur à appliquer dépend de la position du capillaire, plus il est éloigné de l'entrée MS plus la valeur doit être importante. En outre cette distance n'a pas d'influence sur la sensibilité du signal obtenu comme cela a pu être démontré lors de la caractérisation du spray généré par

le système CESI-MS (cf. [Partie III. I. Etude du couplage CESI-MS](#)). L'usure du capillaire influe aussi sur le potentiel à appliquer, un capillaire dont l'extrémité montre des signes d'usures requiert une augmentation du potentiel de 100-200 V par rapport à un capillaire neuf.

L'un des aspects majeurs lors de l'ajustement du potentiel ESI est de ne pas dépasser une valeur d'environ -1800 V en mode positif. Au-delà de cette valeur, un spray d'apparence normal est généralement observé, celui-ci montre entre autres des pics de polysiloxanes caractéristiques issus de la silice composant le capillaire. Cependant, l'intensité de ces pics est très importante et masque la détection des analytes. Les analyses montrent alors un bruit de fond stable et constant et la détection d'aucuns analytes, ce qui peut s'avérer déconcertant. Ce phénomène a été attribué à l'arrachement de molécules de silices à l'extrémité du capillaire en raison de la grande différence de potentiel appliquée.

La pratique a montré que la position la plus éloignée entre le capillaire et l'entrée MS et un potentiel de -1400 V permettent d'obtenir les meilleurs résultats ainsi que la meilleure stabilité. Il convient dans tous les cas de rechercher la formation d'un spray le plus stable possible au niveau du courant d'ion total (*total ion current*, TIC).

Le débit de gaz séchant a été réduit compte tenu des faibles quantités de matières mise en jeu, en effet un débit trop important à montrer des effets de réduction de la sensibilité du signal, le débit est légèrement ajusté en fonction de la volatilité du BGE.

3. Optimisation et acquisition MS/MS en mode automatique

Lors d'une acquisition MS/MS en mode automatique, un premier scan de la gamme de masse est effectué en MS. Le logiciel sélectionne successivement les ions parents, en fonction des paramètres définis par l'utilisateur, et réalise leur fragmentation et analyse MS/MS. Lorsque les ions parents ont tous été sélectionnés, le cycle se termine et l'instrument balaye à nouveau la gamme de masse en MS. En auto MS/MS, un cycle est donc défini par le scan MS initial ainsi que l'ensemble des spectres MS/MS des ions parents associés (Figure 2).

Les paramètres de sélection doivent par conséquent être adaptés à la séparation dans le but d'obtenir des résultats satisfaisant. Les paramètres majeurs de la méthode d'acquisition dans le cadre d'une acquisition en mode auto MS/MS sont les suivants :

- **Spectra rate** : la fréquence d'acquisition qui définit le temps nécessaire pour obtenir un spectre. Plus le nombre d'ions parents à fragmenter est important ou la fréquence d'acquisition faible, plus la durée d'un cycle sera élevée (ex. pour une fréquence d'acquisition de 2 Hz, le scan MS et la sélection de 3 précurseurs nécessitent un temps de cycle de 2 sec).

- **Precursor ions** : le nombre d'ions parents sélectionnés lors de chaque cycle. L'utilisateur définit le nombre d'ions automatiquement sélectionnés par cycle.
- **Threshold** : Cette valeur définit le seuil d'intensité minimal d'un ion en MS afin que cet ion soit considéré comme un ion précurseur potentiel. En mode auto MS/MS, les ions sont sélectionnés en fonction de leur intensité, absolue ou relative. Ce paramètre doit par conséquent être ajusté avec attention afin d'éviter la non-fragmentation d'un ion d'intérêt qui entraînera une perte d'information.
- **Charge states** : Les états de charges des ions considérés en tant qu'ions précurseurs peuvent être précisés par l'utilisateur (*preferred range*). Il est notamment possible d'exclure un état de charge en particulier, les ions détectés comme possédant cet état de charge ne seront alors pas sélectionnés.
- **Active exclusion** : Définit les paramètres d'exclusion temporaire du processus de sélection/fragmentation d'un ion. Il est possible d'exclure pour une durée définie un ion déjà préalablement sélectionné (paramètre *release after*) après un nombre de fragmentation de cet ion défini (paramètre *exclude after*). Ces paramètres sont particulièrement intéressants dans le cas d'ions d'intensités importantes. Ces ions peuvent être sélectionnés à de multiples reprises du fait de leur importante intensité, ce qui rend l'information MS/MS partiellement redondante et peut entraîner la non-sélection d'ions détectés simultanément mais dont l'abondance est moins importante.
- **Precursor ions list exclude/include** : Il est possible de programmer l'exclusion systématique d'un ou d'une série de rapport m/z du processus de sélection automatique et de fragmentation. L'intérêt de ce paramètre est de permettre l'exclusion de certains ions que l'utilisateur sait sans intérêt afin de favoriser la sélection/fragmentation d'autres ions et par-delà améliorer la qualité et la diversité des données MS/MS générées.

Le mode d'acquisition auto MS/MS trouve son intérêt expérimental dans le fait qu'il permet de réaliser une analyse MS/MS sans a priori. Toutefois il est nécessaire d'ajuster les différents paramètres pour adapter la méthode aux conditions expérimentales, notamment la séparation, et obtenir une analyse MS/MS la plus complète possible. Ces paramètres ont par conséquent subi une optimisation pour le couplage CESI-MS.

La fréquence d'acquisition maximale utilisée pour le couplage CESI-MS avec le microTOF-Q II s'est vue limitée à 2 Hz. La fréquence d'acquisition impacte directement la résolution des spectres générés même si potentiellement, augmenter la fréquence réduit mécaniquement le temps de cycle offrant la possibilité de fragmenter et d'analyser un nombre plus importants d'ions précurseurs. Il s'agit ici de trouver un compromis entre la résolution et la fréquence d'acquisition.

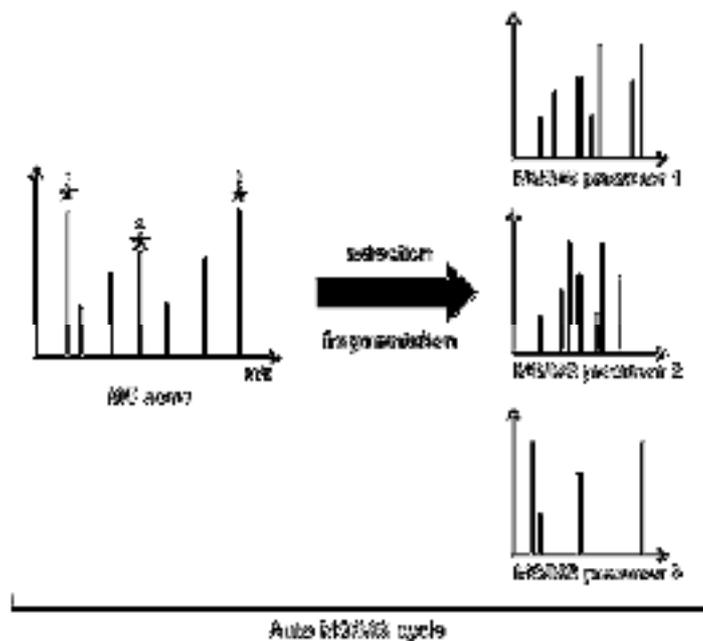


Figure 2. Représentation schématique du fonctionnement du spectromètre de masse microTOF-Q II en mode auto MS/MS illustrant un cycle d'acquisition.

Une fréquence d'acquisition de 2 Hz permet d'avoir une résolution pratiquement maximale par rapport aux caractéristiques techniques du spectromètre, ce qui a été privilégié dans le cadre de ces travaux de thèse.

Le nombre d'ions précurseurs sélectionnés par cycle conditionne directement la durée d'un cycle, ce nombre est par conséquent adapté pour obtenir le temps de cycle désiré. Afin d'obtenir une définition convenable des pics électrophorétiques, il est nécessaire de pouvoir réaliser plusieurs scan MS durant la détection d'un analyte donné car le tracé des électrophérogrammes est réalisé à partir de l'intensité de l'ion en MS. Les pics en CE ont montré une largeur à leur base comprise entre 20 et 30 sec. En conséquence, la méthode auto MS/MS utilise une sélection de 3 précurseurs par cycle, ce qui implique un temps de cycle de 2 sec et engendre une bonne définition des pics d'électrophorèse. Au vu des paramètres de la méthode auto MS/MS précédent, les paramètres d'exclusion temporaire ont été adaptés ; un ion précurseur est exclu pour une durée de 0,5 min après 3 sélections successives.

Comme cela a pu être évoqué dans les paragraphes précédents, durant la séparation, le signal correspondant au bruit de fond présente des pics caractéristiques liés à des polysiloxanes. Ces polysiloxanes sont issus de la silice qui compose le capillaire. Ces pics caractéristiques ont été systématiquement exclus du processus de sélection/fragmentation ce qui a permis d'augmenter de manière significative la qualité des résultats. Le tableau 3 regroupe les différentes masses exclues :

Valeurs des rapports m/z exclus	Largeur (uma)
149.02	± 0.05
355.52	± 0.05
358.47	± 0.05
429.09	± 0.05
445.12	± 0.05

III - Couplage CESI-MS avec le 5600 TripleTOF

1. Introduction

Le TripleTOF® 5600 *plus* (AB Sciex) est un spectromètre de masse hybride de type ESI-qQq-TOF de dernière génération. Tout comme le spectromètre de masse présenté précédemment, cet instrument offre la possibilité d'effectuer des analyses en MS et également en MS/MS. Le 5600+ est équipé d'un filtre de masse quadripolaire dont la fonction est la sélection des ions parents dans le cadre d'analyse MS/MS. La fragmentation est réalisée dans une cellule de collision dont l'atmosphère contient de l'azote. La dissociation est réalisée par collision de l'ion parent avec les molécules de N₂ induisant une fragmentation de type CID ([cf. Partie I. II.2.5.2. Dissociation induite par collision](#)). Cet instrument a été introduit dans les laboratoires à partir de 2011.

Les performances théoriques de ce spectromètre de masse sont les suivantes :

- Gamme de masse : 10 – 8000 m/z (sélection MS/MS < 1250)
- Précision sur la mesure de masse : inférieure à 2 ppm
- Résolution : supérieure à 30000 et jusqu'à 45000
- Fréquence maximale d'acquisition : 100 Hz

Cet instrument de haute résolution a pour caractéristique une vitesse d'acquisition pouvant être élevé tout en maintenant une résolution et une sensibilité importante. Il est ainsi possible de paramétrer l'instrument pour la sélection de 50 ions précurseurs par cycle sans pour autant que la durée du cycle soit supérieur à 3 sec.

En plus de pouvoir réaliser des acquisitions en MS et en MS/MS, le 5600+ possède un mode d'acquisition particulièrement adapté aux analyses quantitatives, le mode SWATH. Ce mode d'acquisition tire profit au maximum de la vitesse d'acquisition du spectromètre de masse. Brièvement, dans ce mode la gamme de masse suivie est divisée en « fenêtre » dont la largeur

peut-être ajustée (valeur minimale ~15 Da). Pour chacune de ces fenêtres, un scan MS est effectué et l'ensemble des ions compris dans cette fenêtre est systématiquement sélectionné pour l'analyse MS/MS. Une fois l'ensemble des ions fragmentés, le même cycle est réalisé sur la fenêtre supérieure, de manière à pouvoir balayer l'ensemble de la gamme par reconstitution des différentes fenêtres au cours du temps. Ce système permet en théorie en une seule analyse de couvrir l'ensemble des ions détectés durant l'analyse de l'échantillon. Dans le cadre d'une stratégie d'analyse protéomique de type SRM/MRM, l'acquisition en mode SWATH permet de choisir les transitions suivies pour la quantification à posteriori ou encore par le biais d'une seule analyse de réaliser la quantification par l'intermédiaire d'un nombre important de peptides. Ce mode d'acquisition, très prometteur, bénéficie des performances en termes de vitesse d'échantillonnage et d'efficacité de transmission des ions délivré par le spectromètre de masse.

La figure 12 ([cf. Partie I. II. 2.2. Interface du spectromètre 5600 plus](#)) représente de manière schématique les différents éléments qui composent le spectromètre.

2. Paramètres optimisés dans le cadre du couplage CESI-MS

Comme dans le couplage précédemment détaillé, la mise en œuvre du couplage CESI-MS avec le 5600+ a nécessité l'adaptation d'un certain nombre de paramètres, notamment au niveau de la source. La conception de la source n'étant pas la même selon les constructeurs, il n'est pas possible d'adapter directement les paramètres de la même manière que sur le microTOF-Q II.

Pour le couplage CESI-MS l'adaptateur permettant de fixer le capillaire à l'entrée de la source est différent de celui utilisé dans le couplage précédent. Pour les travaux de thèse présentés dans cet ouvrage, le modèle finale d'interface CESI-MS pour le 5600+ a pu être utilisé (Figure 3.A.).

Premier point de différence, sur les spectromètres de masse à source d'ionisation ESI de la société AB Sciex, la différence de potentiel est appliqué sur le nébuliseur tandis que l'entrée MS est reliée à la terre, ce qui augmente les risques de formation d'arcs électriques. Afin de prévenir les risques d'électrocution de l'utilisateur, l'adaptateur CESI fixé sur la source est relié à une résistance spéciale hautes tensions, de plus l'adaptateur CESI est connecté à un système qui permet de suivre le courant de fuite et d'arrêter la source en cas de courant trop important.

La source utilisée pour le couplage CESI-MS avec ce type de spectromètre est une version adaptée de la nanospray source III équipant généralement les 5600+. L'adaptateur se fixe sur

le sillon prévu à cet effet (Figure 3.A.). Le type de source utilisé est automatiquement détecté par le logiciel pilotant l'instrument.

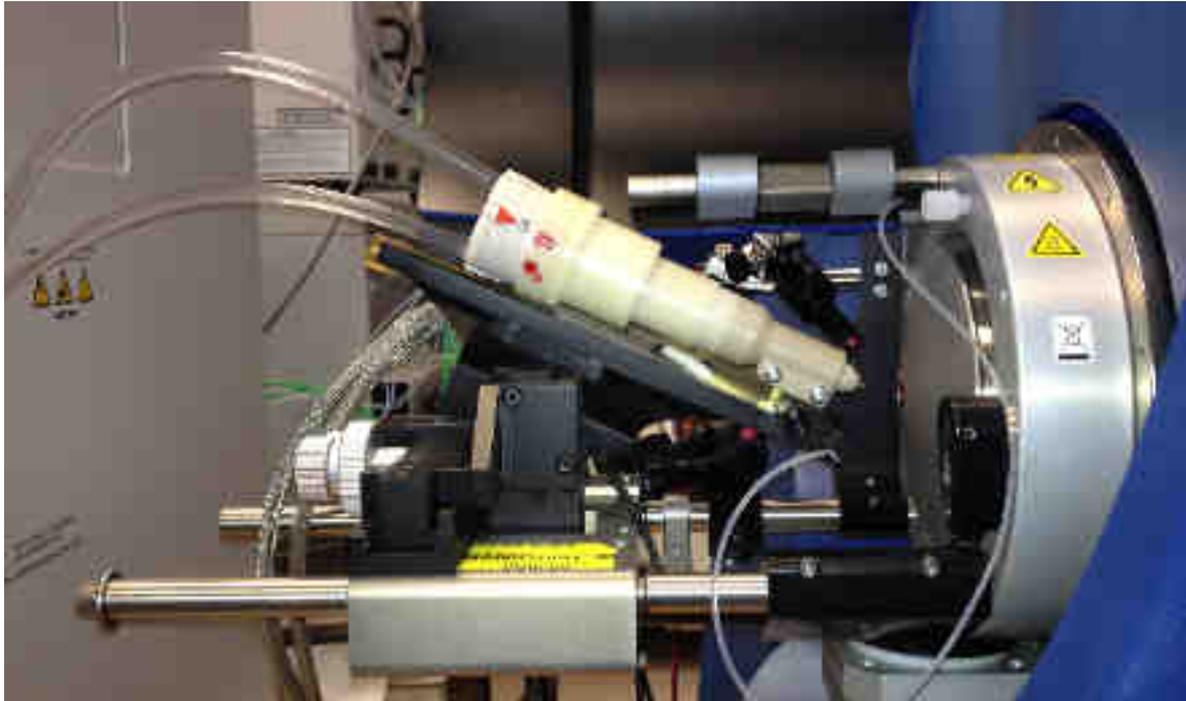


Figure 3. Visuel du couplage CESI8000 sur le spectromètre 5600 + (partie gauche). Vue proche de l'extrémité du capillaire face à la curtain plate du spectromètre (partie droite)

L'un des aspects importants lors de la mise en œuvre de ce couplage est le gaz rideau (*curtain gas*). Comme cela a été évoqué dans la partie précédente, le gaz rideau est un flux continu dont la direction est orthogonale au flux des ions ([cf. partie I. II.2.2.b.](#)). Ce flux entraîne

l'élimination des molécules de solvants résiduelles, sa valeur est adaptée en fonction du débit d'introduction du liquide dans le spectromètre. Par défaut, la valeur indiquant le débit de gaz rideau ne peut être inférieure à 10. Cette sécurité a pour but d'éviter que l'utilisateur n'abaisse trop ou désactive le gaz rideau ce qui entrainerai un encrassement des quadripôles et une perte de résolution obligeant rapidement l'arrêt de l'instrument et sa maintenance. Les valeurs de gaz rideau sont ainsi initialement adaptées aux faibles débits que représente une séparation en nanoLC-MS, c'est-à-dire 300 nL/min.

Le débit induit par le flux électroosmotique est généralement de quelques dizaines de nL/min, les premières expériences ont montré une perte de la sensibilité du signal et surtout une instabilité du spray même pour une valeur de *curtain gas* de 10. Ces phénomènes ont été rapidement attribués à une valeur excessive du *curtain gas*. Avec l'aide des équipes techniques d'AB Sciex, la restriction logicielle a pu être levée permettant de profiter au maximum de la sensibilité du couplage CESI-MS.

Le gaz de nébulisation (**gas supply 1**) et le gaz chauffant (**gas supply 2**) sont désactivés en appliquant une valeur nulle lors de la mise en œuvre du couplage CESI-MS.

L'optimisation des paramètres de la source a permis d'aboutir aux données suivantes :

- Potentiel ESI (**ionspray Voltage Floating**) : entre -1500 et -1900 V
- Gaz rideau (**curtain gas**) : entre 2 et 5
- Température de la source (**Interface Heater Temperature**) : entre 150 et 180°C

Comme dans le cadre du couplage précédent, il est indispensable d'ajuster correctement le potentiel permettant de générer l'électrospray ; une valeur trop importante pour la différence de potentiel résulte en l'impossibilité de détecter les analytes, masqués par les signaux caractéristiques des polysiloxanes.

L'extrémité du capillaire de séparation et l'entrée du spectromètre de masse (centre de la *curtain plate*) sont coaxiales comme cela est visible sur la figure 3.B. La distance entre ces deux éléments doit être au minimum de 5 mm. En effet, les expériences réalisées ont permis de mettre en évidence qu'une partie du flux de gaz rideau circule par l'obturation de la *curtain plate* vers l'extérieur. Si le capillaire est positionné de manière trop rapproché par rapport à la *curtain plate*, le gaz rideau perturbe alors l'électrospray généré ce qui a pour principale conséquence un spray instable.

La valeur du potentiel ESI à appliquer dépend une fois de plus de la distance séparant le capillaire de séparation et l'entrée MS mais également de l'usure du capillaire. Il est nécessaire de garder à l'esprit que la tension ESI doit être adaptée de sorte à obtenir un spray dont le TIC

est stable au maximum. La pratique a montré qu'une distance d'environ 8 mm entre le capillaire et l'entrée MS et un potentiel de -1650 V permettent d'obtenir la meilleure stabilité.

3. Acquisition en mode Information Dependent Acquisition (IDA)

Le mode d'acquisition *information dependent acquisition* (IDA) est le mode de fonctionnement du 5600+ permettant de réaliser des analyses MS/MS automatiques. Dans ce mode fonctionnement, un premier scan de la gamme de masse est réalisé (scan TOF MS), les précurseurs sont ensuite sélectionnés pour être fragmentés à tour de rôle en fonction du nombre d'ions précurseurs désirés. Lorsque le nombre d'ions précurseurs est atteint, le cycle est terminé et un nouveau cycle débute.

Sur cet instrument, les paramètres sont entrés indépendamment pour le scan MS et les fragmentations MS/MS. Dans le cadre du scan initial en MS, les paramètres de la méthode importants sont :

- Le nombre d'ions précurseurs sélectionnés par cycle (***experiment number***).
- La durée d'accumulation (***accumulation time***) définit la durée pendant laquelle les ions sont accumulés avant l'analyse MS. L'augmentation de la valeur de la durée d'accumulation permet d'augmenter potentiellement l'intensité du signal. Une durée d'accumulation de 250 msec est généralement utilisée pour obtenir un scan MS satisfaisant.
- La gamme de masse (***TOF Masses***) concerné par le scan MS.

Noter que même si le 5600+ est capable de réaliser le balayage MS sur une gamme de masse étendue, le processus de sélection/fragmentation ne peut être effectué que sur des ions dont le rapport m/z est inférieur à 1250 uma, ce qui représente une restriction majeure dans l'utilisation du spectromètre de masse. Dans le cadre de ces travaux de thèse, uniquement la caractérisation en MS/MS de certains glycopeptides a souffert légèrement de cette limitation. Pour le processus de sélection/fragmentation des ions précurseurs les paramètres importants sont les suivants :

- La durée d'accumulation (***accumulation time***) définit de la même manière la durée d'accumulation des ions avant l'analyse MS/MS. Ce paramètre peut avoir une valeur différente de celle utilisée pour le scan MS. Une durée d'accumulation de 100 msec est communément utilisée.
- La gamme de masse (***TOF Masses***) balayée en MS/SM afin de détecter les différents fragments. Comme pour l'analyse MS, la gamme de masse pouvant être balayée en MS/MS peut être supérieure à 1250 uma.

- L'énergie de collision (**collision energy**) utilisée pour la fragmentation. Cette énergie est généralement ajustée en utilisant une fonction affine qui définit l'énergie de collision à appliquer en fonction du rapport m/z de l'ion précurseur.

Pour la mise au point des paramètres de la méthode, il a tout d'abord été nécessaire d'adapter le temps de cycle à la séparation délivrée par la CE. Le logiciel calcule automatiquement le temps de cycle en fonction des valeurs de temps d'accumulation et du nombre d'ions précurseurs sélectionnés par cycle.

Cet instrument, du fait de sa grande fréquence d'acquisition et de l'efficacité de son interface, offre la possibilité de sélectionner un nombre important de précurseurs (jusqu'à 50 à chaque cycle MS/MS). D'autres paramètres ont subi un ajustement afin de mieux s'adapter à la séparation électrophorétique. Le plus généralement, les peptides s'ionisent dans la source ESI pour donner des ions multi-chargés, il n'est ainsi pas rare d'exclure les ions monochargés dans le but de favoriser la sélection de peptides. Comme cela a pu être démontré pendant les travaux de thèse, la mise en œuvre de la CE en amont de l'analyse MS/MS facilite la détection de peptides de faibles masses moléculaires et il a pu être constaté qu'un nombre significatif de ces peptides s'avèrent être monochargés.

Les paramètres de sélection ont donc été ajustés afin de considérer les ions monochargés pour les analyses CE-ESI-MS/MS. De la même manière, les paramètres de sélection des ions précurseurs ont été ajustés pour être adaptés au maximum aux caractéristiques de la séparation électrophorétique. Les ions précurseurs dont le rapport m/z est compris entre 150 et 1250 uma ont été considérés, le système IDA possède un système d'exclusion temporaire permettant d'éviter la sélection à de multiples reprises du même ion précurseur du fait de son importante intensité relative, alors que l'information concernant cet analyte est déjà acquise, empêchant la sélection d'autres ions dont l'intensité relative est moins importante.

L'énergie de collision est ajustée automatiquement durant les analyses MS/MS notamment en fonction du rapport m/z de l'ion précurseur. Ces paramètres ont aussi été légèrement modifiés, en particulier pour la fragmentation des ions possédant les rapports m/z les plus élevés. En effet, l'étude des spectres MS/MS a dans un premier temps montré un manque d'efficacité de la fragmentation, une augmentation de l'énergie d'activation de 15-20eV pour les ions dont le rapport m/z excède 1000 uma a permis d'augmenter de manière significative la qualité des spectres MS/MS associé.

IV - Précautions inhérentes à l'utilisation du couplage CESI-MS

1. Introduction

Les techniques analytiques utilisées à l'heure actuelle mettent en œuvre des instruments de hautes technologies qui nécessitent une utilisation et des précautions spécifiques à chaque type d'instrumentation. Une utilisation adaptée est indispensable afin d'éviter des problèmes techniques récurrents et aussi de tirer parti au maximum des performances délivrées par la méthode en question. Ceci est d'autant plus vrai dans le cadre de couplage impliquant l'utilisation en concomitance de deux instruments analytiques ce qui multiplie les sources d'avaries. Le couplage utilisant le système CESI-MS ne déroge pas à cette règle.

Les travaux exposés dans le présent ouvrage décrivent la mise en œuvre du couplage CESI-MS effectués en partie durant le développement du système commerciale CESI8000 par la société Sciex separations. Le chapitre qui suit se propose d'exposer les différentes méthodologies et précautions mises en place au fur et à mesure des travaux de thèse, à force d'expérience, pour améliorer les conditions d'utilisation et la robustesse du système. Cette partie éclairera certainement les futurs utilisateurs du système CESI8000 sur les points les plus sensibles du couplage CESI-MS.

2. Mise en place du couplage et démarrage des analyses

L'utilisation du système CESI-MS a montré, sans réelle surprise, que la cartouche contenant le capillaire de CE est la source principale de problèmes. Le capillaire utilisé pour réaliser la séparation est relativement fragile du fait de son faible diamètre (diamètre interne 30 μm , diamètre externe 75 μm). De plus, le design de la cartouche fait que ce capillaire n'est pas visible par l'utilisateur sur la totalité de sa longueur, notamment au niveau de sa partie terminale contenant la partie poreuse du capillaire traitée à l'acide (Figure 3.A), ce qui complique l'établissement d'un diagnostic en cas de problèmes.

Une méthodologie simple a été mise en place dans le but de vérifier rapidement l'intégrité du capillaire et le spray ESI qu'il génère. Au démarrage des analyses, cette méthodologie permet de vérifier le capillaire de séparation en ciblant les points les plus sensibles. La méthodologie est la suivante :

1. **Vérification de l'entrée du capillaire.** La fragilité et la souplesse du capillaire fait que celui-ci peut se briser au niveau de l'entrée (*inlet*) lors d'un changement de vial par exemple. Il convient de vérifier que l'entrée du capillaire n'est pas endommagée et que

la longueur apparente est suffisante par rapport à la hauteur des liquides dans les différents vials. Un repérage visuel est suffisant.

2. **Vérification de l'intégrité du capillaire.** Cette étape sert à vérifier que le capillaire n'est pas endommagé ou complètement brisé sur une partie non visible par l'utilisateur. Ce test se réalise avec le couplage CESI-MS mis en place sur la source MS, la source ESI doit être à l'arrêt (potentiel ESI nulle). Il suffit de faire circuler du BGE (de l'acide acétique 10% par exemple) pendant 3-5 min dans le capillaire de séparation en appliquant une pression à l'entrée. Si une goutte se forme à la sortie du capillaire, on peut en conclure qu'il n'est pas endommagé. Si la goutte ne se forme pas, le capillaire est soit bouché soit brisé et par conséquent inutilisable.
3. **Vérification de la continuité du champ électrique et du flux électroosmotique.** Ce test est à réaliser en ayant au préalable rincé les capillaires de séparation et de contact avec de l'acide acétique 10%, toujours couplage en place et source ESI à l'arrêt. Appliqué alors, par l'intermédiaire de l'interface *direct control* du logiciel pilotant la CE, un potentiel de 20 kV. Le courant enregistré doit alors rapidement se stabiliser à une valeur de 2.4 μA (l'application d'un potentiel de 30 kV génère un courant d'environ 4 μA). Si la valeur du courant reste nulle, l'un des capillaires est endommagé rendant la cartouche inutilisable. Si la valeur obtenue est inférieure à 2.4 μA mais non nulle, rincer à nouveau chaque capillaire et réitérer le test. Si la valeur reste inférieure à la valeur théorique, considérer un changement de capillaire.
4. **Vérification de la stabilité du spray généré.** Alors que le potentiel appliqué est toujours de 20 kV. Mettre en fonction la source ESI en appliquant un potentiel de -1400 V. Le spray est alors généré, le signal MS doit montrer un bruit de fond comportant des pics dont ceux correspondant aux polysiloxanes (429, 445 uma). Si le signal MS n'affiche rien, augmenter la tension ESI, sans excéder la limite décrite plus haut, ou approcher légèrement l'extrémité du capillaire et l'entrée du spectromètre.
5. **Ajustement des paramètres ESI.** Une fois le spray généré, l'étape ultime consiste à ajuster la position du capillaire et le potentiel ESI de manière à stabiliser le spray. Il est indispensable de garder à l'esprit que le spray doit être le plus stable possible. Ajuster très légèrement la position du capillaire dans la source de sorte que le TIC soit le plus stable possible. Si le TIC forme un signal en dent de scie, cela signifie que le BGE forme à nouveau régulièrement une micro-goutte qui explose à intervalle régulier entraînant une augmentation subite du signal. Approcher alors le capillaire de 0.5 - 1 mm suffit généralement à stabiliser le signal. Une fois le spray stabilisé, réduire progressivement la tension ESI jusqu'à perte de l'électrospray, ajouter 200 V à la valeur obtenue. Le système est alors opérationnel.

3. Conseils particuliers relatifs à l'utilisation du couplage CESI8000

a) Vials échantillons

En CE classique, le volume d'échantillon pouvant être injecté est relativement limité par rapport à la chromatographie en phase liquide, notamment du fait du volume totale du capillaire (les capillaires de CESI-MS ont un volume totale de 640 nL). Différentes méthodes de préconcentration existent mais elle requiert généralement des capillaires spécifiquement modifiés à cet effet. La conséquence directe est que les échantillons utilisés en CESI-MS sont généralement plus concentrés par rapport à la nanoLC-MS, ce qui induit généralement un volume d'échantillon disponible plus faible. Pour réaliser l'injection sans encombre, l'entrée du capillaire doit venir « tremper » dans la solution.

Durant les travaux de thèse, les vials échantillons ont été modifié au laboratoire afin de pouvoir réaliser l'injection même pour des échantillons ne contenant que quelques microlitres. En effet, un certain nombre de problèmes ont été rencontrés car les vials prévus à l'origine ne pouvaient réaliser des injections que si celui-ci contenait au moins 50 μ L d'échantillon sachant que le volume d'échantillon injecté pour une analyse durant l'ensemble de ces travaux de thèse n'a pas excéder 100 nL.

Ainsi les rainures présentent sur les parois des vials ont été poncés de manière à obtenir un vial dont l'intérieur est uniformément évidé. Un ressort similaire à ceux utilisé pour les vials de CE de type PACE/MDQ (Beckman Coulter) est placé à l'intérieur du vial. On utilise enfin un tube PCR dont la partie supérieur a été coupé, ce tube repose sur le ressort. Avec ce système, même si l'électrode ou le capillaire butent sur le fond du tube PCR, le ressort laisse descendre le tube progressivement empêchant l'électrode de se tordre ou le capillaire de se casser (figure 4).

La mise en place de ce système permet de réaliser avec des injections avec un minimum de 2 μ L d'échantillons dans le tube.



Figure 4. Vues des différentes modifications apportées au vials CESI-MS. A gauche vial CESI8000 et tube PCR standard. A droite les mêmes éléments ont été modifiés permettant l'injection d'échantillon dont la quantité est faible.

b) Obstruction du capillaire

L'extrémité du capillaire positionné dans la source peut se retrouver partiellement ou totalement bouchée notamment à cause de la cristallisation de sels contenu dans le BGE ou l'échantillon. Concrètement, cela se traduit par une perte de l'électrospray ou diminution très importante du signal MS tandis que le courant enregistré au niveau de la CE reste normal. Dans ce cas, il est nécessaire de couper l'extrémité du capillaire à l'aide d'un carreau de découpe, sur environ 1 mm pour retrouver un spray satisfaisant. Naturellement le recours à cette solution est limité par la portion de capillaire accessible à l'utilisateur. L'extrémité traitée du capillaire (Figure 3.B.) peut paraître de prime abord d'une grande fragilité, cependant l'expérience a montré que cette partie du capillaire peut être manipulée par l'utilisateur avec seulement quelques précautions.

De la même manière, l'expérience a montré que l'entrée du capillaire de séparation peut se boucher et il est conseillé de couper sur 1-2 mm si cela est le cas, la manœuvre est ici plus simple car le capillaire est plus facilement accessible. Il convient de noter que durant les expériences réalisées dans le cadre de ces travaux de thèse, il a pu être constaté que l'entrée du capillaire de séparation était plus fréquemment sujette à des phénomènes d'obstruction que l'extrémité traitée du capillaire. En cas de diagnostic d'obstruction du capillaire de séparation, il est donc conseillé de couper dans un premier temps l'entrée du capillaire, si le

problème persiste il convient alors de couper au niveau de l'extrémité traitée du capillaire positionnée dans l'aiguille rétractable.

Le capillaire de contact possède un diamètre interne et une couche de gaine en polyimide plus importantes que le capillaire de séparation. Ce capillaire de contact ne requiert pas de précautions particulières et il n'a pas montré de signes d'obstruction du les travaux de thèse.

c) Arrêt du système – conservation des capillaires

Lorsque le système n'est pas en fonctionnement pendant une durée de plusieurs heures, il est indispensable de plonger l'aiguille rétractable dans un tube falcon contenant de l'eau ultrapure afin d'éviter que l'extrémité du capillaire ne sèche et se bouche. Noter que l'arrêt pour une nuit nécessite d'utiliser une telle précaution.

De plus dans le cadre d'un arrêt prolongé du système, il est conseillé de conditionner le capillaire de séparation avec du méthanol.

PARTIE III : Résultats – Applications du couplage CESI-MS

I - Etude du couplage CESI-MS et application en tant que plateforme d'infusion nanoESI pour l'étude de complexes non-covalents biologiques

1. Introduction

L'étude des structures de protéines maintenues sous leur forme native ainsi que des complexes protéiques permet la compréhension des mécanismes biochimiques. Les interactions non-covalentes jouent un rôle prépondérant dans un grand nombre de processus biochimiques, en effet la formation de complexes protéiques est généralement à l'origine de la spécificité de nombre de mécanismes de reconnaissance, liaison ou transport. La spectrométrie de masse (MS), notamment avec les développements des sources d'ionisation à électrospray (ESI) s'est affirmée comme une technique de choix dans le cadre d'études de complexes non-covalents. L'ESI en tant que source d'ionisation douce permet le transfert en phase gazeuse des complexes protéiques tout en maintenant les interactions non-covalentes.

Afin de maintenir les protéines et les complexes non-covalents sous leur forme native, il est indispensable d'utiliser des tampons aqueux ne perturbant pas la structure quaternaire des protéines et dont la volatilité est suffisante pour être compatible avec l'ionisation par ESI : l'acétate d'ammonium est de ce fait l'un des tampons les plus couramment utilisé, les concentrations pouvant varier de 20 mM à 1 M selon les cas. L'utilisation de telles concentrations n'est pas sans conséquence et l'ESI-MS native souffre généralement d'un défaut de l'intensité du signal et d'une sensibilité réduite en raison des effets de suppression d'ions dus aux sels. L'une des alternatives généralement utilisée pour augmenter l'intensité du signal est d'utiliser des échantillons dont la concentration en analytes est relativement élevée, aux risques de favoriser des interactions non spécifiques ou l'agrégation de protéines. De plus, le volume d'échantillon nécessaire pour réaliser une acquisition est relativement important lors de l'utilisation d'une source ESI conventionnelle (environ 100 µL). L'utilisation de quantités importantes d'échantillon peut s'avérer être un frein notamment dans le cadre d'étude d'échantillons biologiques dont la disponibilité est limitée. Il apparaît donc nécessaire de pouvoir améliorer le rapport signal/bruit tout en diminuant la quantité d'échantillon consommée par acquisition afin de pouvoir profiter au maximum des performances de la MS pour l'étude de ces complexes.

Dans le but de pallier à ces limitations, Wilm et Mann ont introduit en 1994 une source dite nano électrospray (nanoESI). En nanoESI, les échantillons sont injectés dans la source par l'intermédiaire d'un capillaire dont le diamètre interne est faible (de 1 à 5 µm), il est ainsi

possible d'infuser l'échantillon dans le spectromètre de masse à de faibles débits diminuant ainsi la quantité d'échantillon nécessaire pour réaliser une injection. L'utilisation d'une source nanoESI favorise la formation de gouttelettes de diamètre plus faibles par rapport à l'ESI classique. La formation de gouttelettes plus petites favorise le processus d'ionisation car elles facilitent les divisions de Rayleigh durant le processus de désolvatation. La conséquence directe au niveau des spectres MS est une sensibilité du signal améliorée et une réduction du phénomène de suppression d'ions.

L'objectif de cette étude est d'utiliser le système CESI-MS en tant que plateforme semi-automatisée d'infusion nanoESI et de démontrer la compatibilité de cette approche pour l'étude de protéines en conditions natives et de complexes non-covalents par MS native. Il ne s'agit pas dans ce cas d'utiliser l'électrophorèse capillaire (CE) en tant que méthode séparative mais d'exploiter les caractéristiques intrinsèques du système CESI-MS pour produire de manière robuste et parfaitement contrôlée un nanoESI : diamètre interne du capillaire faible (30 μm), possibilité de réaliser des injections d'échantillon contrôler à des débits de l'ordre du nL/min grâce au système d'injection équipant la CE.

Les travaux se sont tout d'abord concentrés sur l'étude des caractéristiques de l'ESI formé par l'intermédiaire du système CESI-MS : débits d'infusions accessibles, influence du débit d'infusion sur la sensibilité en particulier, et de comparer les performances d'ionisation avec celle d'une source ESI conventionnelle. Les résultats obtenus sur des protéines modèles ont permis de mettre en évidence la capacité du système CESI-MS à maintenir un ESI stable et parfaitement contrôlé pour des débits d'infusions d'échantillon de 900 nL/min abaissés jusqu'à 4 nL/min. Les études de sensibilité, réalisées sur une protéine modèle en conditions natives, ont montré qu'une réduction du débit d'infusion permet d'augmenter de manière importante la sensibilité du signal MS : par l'intermédiaire du système CESI-MS, il a été possible d'améliorer la sensibilité 46 fois en réduisant le débit d'infusion de 457 à 14 nL/min. De plus le rapport signal/bruit s'est vu amélioré d'un facteur proche de 5 par la réduction du débit d'infusion. Ces résultats illustrent le gain en sensibilité pouvant être apporté à la MS native par ce type d'approche instrumental. L'étude du débit d'infusion a également mis en évidence que le débit appliqué par le système d'injection délivre une infusion parfaitement contrôlée et reproductible.

L'infusion réalisée par l'intermédiaire du système CESI-MS a ensuite été comparée à l'infusion en ESI classique. Dans le cadre de cette comparaison, l'étude d'une protéine a été réalisée en conditions natives. L'anneau beta est une protéine présente *in vivo* sous la forme d'un homodimère de 85 kDa. Elle a pour fonction d'améliorer la processivité entre l'ADN et l'ADN polymérase. En plus de l'étude de la protéine sous forme native, la formation du complexe entre l'anneau beta et un peptide synthétique (P14) a été aussi étudiée. Le peptide P14 a pour

particularité d'interagir en formant un complexe non-covalent avec l'anneau beta par l'intermédiaire du même site consensus que celui utilisé par l'ADN *in vivo*. Les résultats obtenus ont ainsi permis de déterminer les différentes stœchiométries du complexe formé entre l'anneau beta et le peptide P14. La comparaison des spectres MS en infusion ESI conventionnelle et infusion CESI-MS du même échantillon a permis de mettre en évidence une intensité du signal environ 4 fois plus importante dans le cas de l'infusion CESI-MS. De plus le débit d'injection utilisé pour l'infusion CESI-MS (50 nL/min) permet de diminuer de manière drastique la quantité d'échantillon nécessaire pour une acquisition : celle-ci a pu être réduite 80 fois en comparaison avec l'infusion ESI classique. Une réduction si importante de la quantité d'échantillon offre la possibilité de réaliser des acquisitions prolongées. Ces expérimentations ont ainsi permis de démontrer la compatibilité de ce type d'approche par l'intermédiaire du système CESI-MS avec l'étude de protéines en conditions natives mais également la faculté du système CESI-MS à maintenir les interactions non-covalentes que l'on observe dans les complexes protéine-protéine ou protéine-ligand.

Enfin le système CESI-MS a été mis en œuvre afin de réaliser l'étude de complexes non-covalents de haut poids moléculaire : les hémocyanines sont des protéines impliquées dans le transport d'oxygène chez les arthropodes et les mollusques, elles forment des complexes multi-hexamériques dont chaque sous-unité possède une masse aux alentours de 75 kDa. Les résultats obtenus ont montré la capacité du système CESI-MS à maintenir des interactions non-covalentes qui structurent ces complexes. Il a ainsi été possible par l'étude d'échantillons d'hémolymphe de *carcinus maenas* d'observer les formes 6-mers, 12-mers et 18-mers d'hémocyanines dont les masses sont respectivement de 445 kDa, 900 kDa et 1.34 MDa. Les infusions ont pu être réalisées avec un débit de 10 nL/min soit un volume total de 75 nL, ce qui représente un volume d'échantillon réduit 400 fois par rapport à une acquisition en ESI classique équivalente.

Les résultats présentés dans cette partie ont fait l'objet d'une publication dans le journal scientifique *Analytical and Bioanalytical Chemistry* (Springer-Verlag Berlin Heidelberg 2014).

2. Publications: Novel sheathless CE-MS interface as an original and powerful infusion platform for nanoESI study

Rabah Gahoual, Jean-Marc Busnel, Philippe Wolff, Yannis Nicolas François, Emmanuelle Leize-Wagner. **Novel sheathless CE-MS interface as an original and powerful infusion platform for nanoESI study: from intact proteins to high molecular mass noncovalent complexes**, *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 2014, 406(4), 1029-1038.

Abstract

Development of nano-electrospray (nanoESI) sources allowed to increase significantly the sensitivity which is often lacking when studying biological noncovalent assemblies. However, the flow rate used to infuse the sample into the mass spectrometer cannot be precisely controlled with nanoESI and the robustness of the system could represent an issue. In this study, we have used a sheathless capillary electrophoresis–mass spectrometry (CESI) prototype as a nanoESI infusion device. The hydrodynamic mobilization of the capillary content was characterized and the ability of the system to generate a stable electrospray under controlled flow rate conditions ranging from 4 up to 900 nL/min was demonstrated. The effect of the infusing flow rate on the detection of an intact model protein analyzed under native conditions was investigated. Results demonstrated a significant increase in sensitivity of 46-fold and a signal-to-noise ratio improvement of nearly 5-fold when using an infusing flow rate from 456.9 down to 13.7 nL/min. The CESI prototype was further used to detect successfully the β ring homodimer in its native conformation. Obtained results were compared with those achieved with conventional ESI. Intensity signals were increased by a factor of 5, while sample consumption decreased 80 times. β ring complexed with the P14 peptide was also studied. Finally, the CESI interface was used to observe the quaternary structure of native hemocyanins from *Carcinus maenas* crabs; this high molecular complex coexisting under various degrees of complexation and resulting in masses ranging from 445 kDa to 1.34 MDa.

Article soumis à droits d'auteur :

Gahoual et al., Novel sheathless CE-MS interface as an original and powerful infusion platform for nanoESI study: from intact proteins to high molecular mass noncovalent complexes, *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 2014, 406(4), 1029-1038. (DOI : 10.1007/s00216-013-7226-1)

Article soumis à droits d'auteur :

Gahoual et al., Novel sheathless CE-MS interface as an original and powerful infusion platform for nanoESI study: from intact proteins to high molecular mass noncovalent complexes, *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 2014, 406(4), 1029-1038. (DOI : 10.1007/s00216-013-7226-1)

Article soumis à droits d'auteur :

Gahoual et al., Novel sheathless CE-MS interface as an original and powerful infusion platform for nanoESI study: from intact proteins to high molecular mass noncovalent complexes, *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 2014, 406(4), 1029-1038. (DOI : 10.1007/s00216-013-7226-1)

Article soumis à droits d'auteur :

Gahoual et al., Novel sheathless CE-MS interface as an original and powerful infusion platform for nanoESI study: from intact proteins to high molecular mass noncovalent complexes, *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 2014, 406(4), 1029-1038. (DOI : 10.1007/s00216-013-7226-1)

Article soumis à droits d'auteur :

Gahoual et al., Novel sheathless CE-MS interface as an original and powerful infusion platform for nanoESI study: from intact proteins to high molecular mass noncovalent complexes, *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 2014, 406(4), 1029-1038. (DOI : 10.1007/s00216-013-7226-1)

Article soumis à droits d'auteur :

Gahoual et al., Novel sheathless CE-MS interface as an original and powerful infusion platform for nanoESI study: from intact proteins to high molecular mass noncovalent complexes, *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 2014, 406(4), 1029-1038. (DOI : 10.1007/s00216-013-7226-1)

Article soumis à droits d'auteur :

Gahoual et al., Novel sheathless CE-MS interface as an original and powerful infusion platform for nanoESI study: from intact proteins to high molecular mass noncovalent complexes, *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 2014, 406(4), 1029-1038. (DOI : 10.1007/s00216-013-7226-1)

Article soumis à droits d'auteur :

Gahoual et al., Novel sheathless CE-MS interface as an original and powerful infusion platform for nanoESI study: from intact proteins to high molecular mass noncovalent complexes, *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 2014, 406(4), 1029-1038. (DOI : 10.1007/s00216-013-7226-1)

Article soumis à droits d'auteur :

Gahoual et al., Novel sheathless CE-MS interface as an original and powerful infusion platform for nanoESI study: from intact proteins to high molecular mass noncovalent complexes, *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 2014, 406(4), 1029-1038. (DOI : 10.1007/s00216-013-7226-1)

Article soumis à droits d'auteur :

Gahoual et al., Novel sheathless CE-MS interface as an original and powerful infusion platform for nanoESI study: from intact proteins to high molecular mass noncovalent complexes, *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 2014, 406(4), 1029-1038. (DOI : 10.1007/s00216-013-7226-1)

Article soumis à droits d'auteur :

Gahoual et al., Novel sheathless CE-MS interface as an original and powerful infusion platform for nanoESI study: from intact proteins to high molecular mass noncovalent complexes, *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 2014, 406(4), 1029-1038. (DOI : 10.1007/s00216-013-7226-1)

Article soumis à droits d'auteur :

Gahoual et al., Novel sheathless CE-MS interface as an original and powerful infusion platform for nanoESI study: from intact proteins to high molecular mass noncovalent complexes, *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 2014, 406(4), 1029-1038. (DOI : 10.1007/s00216-013-7226-1)

Article soumis à droits d'auteur :

Gahoual et al., Novel sheathless CE-MS interface as an original and powerful infusion platform for nanoESI study: from intact proteins to high molecular mass noncovalent complexes, *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 2014, 406(4), 1029-1038. (DOI : 10.1007/s00216-013-7226-1)

Article soumis à droits d'auteur :

Gahoual et al., Novel sheathless CE-MS interface as an original and powerful infusion platform for nanoESI study: from intact proteins to high molecular mass noncovalent complexes, *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 2014, 406(4), 1029-1038. (DOI : 10.1007/s00216-013-7226-1)

Article soumis à droits d'auteur :

Gahoual et al., Novel sheathless CE-MS interface as an original and powerful infusion platform for nanoESI study: from intact proteins to high molecular mass noncovalent complexes, *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 2014, 406(4), 1029-1038. (DOI : 10.1007/s00216-013-7226-1)

Article soumis à droits d'auteur :

Gahoual et al., Novel sheathless CE-MS interface as an original and powerful infusion platform for nanoESI study: from intact proteins to high molecular mass noncovalent complexes, *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 2014, 406(4), 1029-1038. (DOI : 10.1007/s00216-013-7226-1)

Article soumis à droits d'auteur :

Gahoual et al., Novel sheathless CE-MS interface as an original and powerful infusion platform for nanoESI study: from intact proteins to high molecular mass noncovalent complexes, *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 2014, 406(4), 1029-1038. (DOI : 10.1007/s00216-013-7226-1)

Article soumis à droits d'auteur :

Gahoual et al., Novel sheathless CE-MS interface as an original and powerful infusion platform for nanoESI study: from intact proteins to high molecular mass noncovalent complexes, *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 2014, 406(4), 1029-1038. (DOI : 10.1007/s00216-013-7226-1)

3. Additional discussions

The next paragraph is intended to present and discuss additional results which could be obtained during the characterization of the nanoESI generated by the intermediate of the CESI-MS system. Those results were not included in the publication presented previously.

3.1. Evaluation and optimization of the capillary position

a) Experimental settings description

To evaluate the influence of the position of the capillary, a sample of model protein (myoglobin 1 μ M) in denaturing conditions (H₂O/CAN 50/50) was injected to the MS using the CESI-MS as the infusion platform. The flow rate used for those injection was 50 nL/min. The injection was performed using different length separating the capillary and the MS inlet (from 1 to 3.5 mm). In each case the MS signal was recorded while ranging the ESI voltage from -1100 V to -2000 V. The signal corresponding to the protein was recorded (investigated m/z: 808.16 – 893.15).

b) Results and discussion regarding capillary position

The objective here is to optimize to the position of the capillary inside the source as it can be adjusted because the MS adapter is fixed on a mobile xyz axis. The results obtained are compiled in the figure 6.

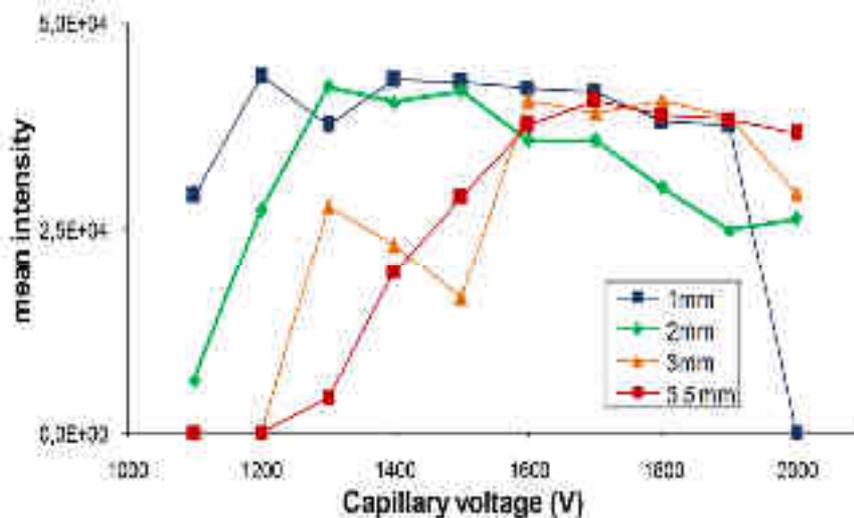


Figure 6. Graphical representation of the intensity corresponding to the signal of the model protein depending on ESI voltage applied, for several position of the separation capillary

Results recorded during the experiments showed first that the position of the capillary inside the source does not influence significantly the maximum MS intensity which can be achieved for a given sample. However the position is impacting the ESI potential which needs to be applied in order to generate the ESI. Indeed, if the distance between the CE capillary and the

MS inlet is increased, the ESI potential have to be increased also in order to obtain the best signal.

In the context of using the CESI-MS as infusion platform, in regard to those results, it was decided to use systematically a distance of 2 mm because it allows to maintain a spray for a wide range of ESI potential. That behavior is indicating that distance is compatible with various buffer having different volatilities.

3.2. Application of the CESI-MS as an infusion platform

Results described previously allowed to characterize the nanoESI generated by the CESI-MS system. Also the characteristics of the system (controlled and accurate injections, tolerance to clogging, multiple uses of capillary) proved its compatibility to non-covalent complexes studies in native MS.

From those results, the CESI-MS has been progressively adopted as a routine instrument to perform sample infusion in nanoESI and highly demanding experiments in native MS could be performed. Especially, experiments on ribosomes could be performed. Those experiments are particularly demanding because in order to be maintained, those analytes requires high concentration of salts (up to 1M) which would normally induced a consequent ion suppression effect rendering impossible the detection of the complex. As it is emphasize in figure 7, the use of the CESI-MS allowed to detect ribosomes.

That results is quite encouraging in the integration of the system for the study of highly complex non-covalent edifices such as ribosomes.

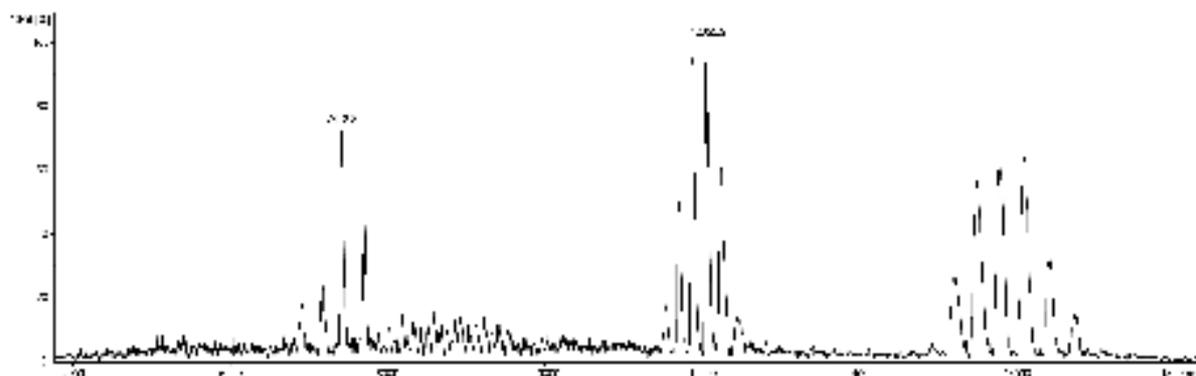


Figure 7. MS spectrum of 30S ribosome (buffer ammonium acetate 500 mM) obtained using the CESI-MS injection system (flow rate 50 nL/min)

4. Conclusions

Les travaux présentés dans cette première partie se sont, dans un premier temps, focalisés sur la caractérisation de l'ESI généré par l'intermédiaire du couplage CESI-MS. Pour ce faire, le système CESI-MS a été mis en œuvre en tant que plateforme d'infusion d'échantillons. L'objectif de cette étude est de profiter du système d'injection d'échantillon miniaturisé équipant la CE et des caractéristiques intrinsèques du capillaire afin de favoriser le processus d'ionisation en ESI et d'améliorer la qualité et la sensibilité du signal MS. Les résultats obtenus ont permis de démontrer que le système CESI-MS est capable de produire un ESI stable pour des débits d'infusion d'échantillon inférieurs à 4 nL/min, le système génère par conséquent un nanoESI. De plus les études effectuées ont permis de démontrer que le système d'injection hydrodynamique équipant la CE peut réaliser des infusions d'échantillons parfaitement contrôlées et reproductibles même pour des débits inférieurs à 10 nL/min. Au cours des expériences, aucun effet d'aspiration de l'échantillon n'a pu être observé. L'absence de phénomènes d'aspiration, potentiellement dû au champ électrique présent dans l'ESI et à la proximité entre l'extrémité du capillaire et l'entrée de spectromètre de masse, participe au bon contrôle du débit d'infusion de l'échantillon.

L'influence du débit d'infusion de l'échantillon par le système CESI-MS a de la même manière été évaluée dans des conditions de MS native, domaine qui souffre généralement d'un défaut de sensibilité. Les résultats obtenus ont montré que la sensibilité du signal peut être améliorée d'un facteur 46 par la diminution du débit d'infusion de 457 à 14 nL/min tout en améliorant le rapport signal/bruit d'un facteur proche de 5, ce résultat illustre l'amélioration de la qualité spectrale induite par l'ionisation en nanoESI. En plus du débit d'infusion faible, les caractéristiques du couplage CESI-MS, dont notamment le diamètre interne du capillaire, permettent de former des gouttelettes dont le diamètre réduit favorise l'efficacité d'ionisation. La possibilité d'automatiser l'infusion d'échantillon et l'amélioration de la sensibilité du signal de manière significative sont autant d'aspects qui suggèrent l'utilisation du système CESI-MS en tant que plateforme d'infusion nanoESI pour l'étude de protéines et de complexes non-covalents en conditions natives.

Le système CESI-MS a été utilisé pour réaliser l'étude d'un complexe protéique sous la forme d'un homodimère de 85 kDa, le même échantillon a également été analysé par ESI conventionnel afin de comparer les deux types de sources. Les résultats obtenus ont montré une intensité du signal 4 fois plus importante dans le cas de l'infusion par CESI-MS par rapport à l'infusion ESI classique. De plus, l'utilisation du débit réduit a permis de diminuer 80 fois la quantité d'échantillon nécessaire pour réaliser une acquisition. Les interactions entre ce même complexe protéique et un peptide synthétique (P14) ont pareillement été étudiées. Les

résultats obtenus ont permis de déterminer les trois différentes stœchiométries adoptées par ce complexe, la limitation des effets de suppression d'ions participe à l'obtention de spectres MS de qualité ce qui dans le cadre de cette étude a permis d'obtenir les masses exactes des différents complexes avec une précision largement satisfaisante. Ces résultats illustrent la capacité du système CESI-MS à réaliser l'ionisation de ce type de complexes tout en maintenant les interactions non-covalentes et par conséquent la compatibilité de cette approche instrumentale avec l'étude de complexes non-covalents.

Le système CESI-MS a également été utilisé pour étudier des complexes non-covalents de haut poids moléculaires. L'analyse d'échantillons d'hémolymphes de *Carcinus Maenas* par CESI-MS a été réalisée. Il a été ainsi possible d'observer les formes 6-mers, 12-mers et 18-mers d'hémocyanines dont les masses sont respectivement de 445 kDa, 900 kDa et 1.34 MDa. De tels résultats illustrent parfaitement la compatibilité de l'infusion par CESI-MS pour ce type d'étude. L'ionisation par l'interface CESI-MS délivre un rendement d'ionisation important tout en maintenant ce type de complexes structurés par des liaisons non-covalentes. Les infusions, réalisées avec un débit de 10 nL/min, représentent une quantité de 75 nL par acquisition. La quantité d'échantillon disponible est généralement un facteur limitant pour ce type d'analyse et l'infime quantité utilisée apparaît donc comme un atout majeur. De plus les infusions ont pu être réalisées sans observer d'obstruction du capillaire ou de contamination croisée. Un simple rinçage du capillaire en utilisant le même tampon permet d'éliminer l'échantillon et plusieurs dizaines d'infusions ont pu être réalisées avec le même capillaire.

Ces travaux ont permis de démontrer la robustesse du système CESI-MS pour réaliser des infusions et le gain en sensibilité significatif pouvant être délivré par l'interface de couplage CESI-MS. Ces travaux ont initié plusieurs projets au laboratoire qui utilisent le système CESI-MS en tant que plateforme d'infusion nanoESI dans le cadre d'étude de complexes non-covalents en conditions natives. En plus de la possibilité d'utiliser le système CESI-MS en tant que plateforme d'infusion semi-automatisée d'échantillons, ces travaux mettent en évidence la capacité d'ionisation du couplage CESI-MS. Les expériences effectuées suggèrent que ce système de couplage fournit une excellente ionisation en ESI et font apparaître le potentiel en terme de sensibilité que ce type de couplage peut fournir pour des analyses CE-ESI-MS, notamment du fait de l'absence de liquide additionnel ([cf. partie I. III.4.3. Interface CESI-MS](#)).

Il convient d'étudier la sensibilité que le couplage CESI-MS pour la caractérisation de peptides et de protéines dans le cadre d'analyses conventionnelles utilisant cette fois la CE en tant que méthode séparative.

II - Caractérisation rapide et multi-niveaux d'anticorps monoclonaux par CESI-MS/MS

1. Introduction

L'avènement des anticorps monoclonaux (mAbs) a débuté en 1986 avec l'autorisation de mise sur le marché de muromomab-CD3 par la Food and Drug Administration (FDA) comme traitement contre les rejets de greffes du rein. Les mAbs thérapeutiques ont depuis pris une part de marché significative dans l'industrie pharmaceutique et leurs développements sont en constante augmentation. Ce succès s'explique en partie par la grande spécificité de l'anticorps pour son antigène, ce qui ouvre de nouvelles possibilités en termes de voie de traitement, en particulier en oncologie. Les mAbs possèdent également une pharmacodynamique (PD) et pharmacocinétique (PK) favorable pour une utilisation en tant que traitement thérapeutique (leur demi-vie dans le plasma est de 21 jours).

Les mAbs sont des glycoprotéines d'une grande complexité qui peuvent abriter un nombre conséquent de micro-hétérogénéités dont les sources sont variées (procédés de production inadapté, conservation prolongée). La complexité de ces protéines et leur utilisation en tant que traitement thérapeutique justifient la nécessité d'améliorer les méthodologies analytiques de caractérisation. Ceci de manière à obtenir une caractérisation rapide et précise de ce type de molécules. La spectrométrie de masse (MS) a su rapidement s'imposer comme une méthode de choix pour la caractérisation des mAbs, notamment en raison de son excellente spécificité, sensibilité mais aussi car elle permet d'obtenir des informations structurales dans certain cas. La MS peut ainsi être utilisée dans le développement de nouveaux mAbs ou encore pour suivre différents lots d'un mAb afin de distinguer des différences mineures. L'enjeu dans un tel contexte est de fournir rapidement des informations structurales permettant en amont d'orienter les activités de R&D (optimisation du procédé de production, élimination d'un candidat non satisfaisant) et de production (libération de lots). Les méthodes analytiques utilisées doivent ainsi être capables de couvrir un large champ de la structure des mAbs : séquence d'acides aminés, glycosylation, modifications post-traductionnelles (PTMs), ponts disulfures. En amont de l'analyse par MS, il convient d'utiliser un certain nombre de méthodes orthogonales destinées à caractériser la protéine sur les différents niveaux qui définissent sa structure. Ainsi la MS est généralement couplée à la chromatographie liquide en phase inverse (RP-LC), la chromatographie d'échange d'ions (IEC) ou encore la chromatographie d'exclusion stérique (SEC).

La caractérisation de la séquence d'acides aminés (*peptide mapping*) des mAbs est communément réalisée en utilisant la dégradation d'Edman ou encore une stratégie de type protéomique *bottom-up* car en plus d'obtenir des informations importantes concernant la séquence d'acides aminés, elle permet dans une certaine mesure d'avoir accès aux PTMs.

Les travaux présentés dans cette partie décrivent le développement d'une méthode de CE-ESI-MS/MS, utilisant le système CESI-MS, permettant la caractérisation rapide et précise d'un digestat de mAb. Le mAb étudié dans le cadre de ces travaux est trastuzumab (Herceptin®, Roche). Ce mAb, dont la commercialisation a été approuvée entre 1998 et 2000, est utilisé comme traitement contre le cancer du sein HER positif. Trastuzumab est une immunoglobuline gamma 1 humanisée (H₂LgG1) dirigée contre le récepteur HER2/neu. Il est composé de deux chaînes lourdes (HC) et deux chaînes légères (LC) identiques qui comptent respectivement 449 et 214 acides aminés. La HC du mAb porte un site de N-glycosylation situé sur l'acide aminé asparagine 300 (Asn³⁰⁰). L'ensemble formant une glycoprotéine tétramérique dont la masse se situe aux alentours de 148 kDa. Trastuzumab est un mAb largement décrit dans la littérature et souvent considéré comme représentatif de ce type de molécules thérapeutiques.

Afin de réaliser la digestion trypsique des échantillons d'anticorps, un protocole de digestion en solution a été mis en place. Le digestat a ensuite été séparé et analysé par CESI-MS/MS afin d'obtenir la caractérisation de la protéine simultanément sur différents niveaux. Tout d'abord la caractérisation de la séquence d'acides aminés a été réalisée par l'intermédiaire des données CESI-MS/MS. L'identification des spectres MS/MS a été effectuée par l'utilisation d'un algorithme de recherche afin de diminuer le temps nécessaire au traitement des données. Les résultats obtenus ont permis, à partir des données issues d'une seule injection, d'obtenir le recouvrement complet de la séquence d'acides aminés de trastuzumab. L'ionisation des analytes délivrée par le système CESI-MS s'est avérée, comme évoqué dans la précédente partie, d'une grande efficacité. Cette caractéristique du couplage se répercute directement sur la qualité des spectres notamment en MS/MS : les spectres générés ont permis d'obtenir un grand nombre des fragments y et b, ce qui améliore de manière significative la confiance des identifications mais également fournit de précieuses informations sur l'enchaînement précis des acides aminés le long du squelette peptidique.

Les PTMs ont également été étudiées par l'intermédiaire des données CESI-MS/MS. En particulier, les sites dits PTMs *hot-spots* ont été étudiés. Ces sites sont décrits dans la littérature comme étant induit par une dégradation de la protéine, influencent l'activité thérapeutique du mAb, et peuvent par conséquent être utilisés pour estimer l'état de conservation d'un échantillon de mAb. Par l'intermédiaire de la même analyse CESI-MS/MS que celle utilisée pour la caractérisation de la séquence d'acides aminés, il a été possible de

caractériser 6 PTMs d'intérêt de nature variées (cyclisation de l'acide glutamique en N-terminal, déamidation d'asparagine, oxydation de méthionine). La qualité des données générées par la méthode développée permet en outre d'obtenir le spectre MS/MS du peptide modifié mais également de son homologue n'ayant pas subi la modification. Ceci permet d'en déduire à une modification partielle de l'échantillon ce qui informe sur la dégradation partielle de l'échantillon. De plus, les spectres MS/MS permettent de caractériser précisément l'acide aminé portant la modification.

Enfin les données de CESI-MS/MS ont été utilisées pour réaliser la caractérisation structurale de glycosylations les plus abondantes portées par trastuzumab. En utilisant le même set de données que précédemment, l'identification des 5 glycosylations les plus abondantes portées par trastuzumab a pu être obtenue. En particulier les spectres MS/MS montrent la fragmentation du glycanne, ce qui permet d'en déduire la structure de la glycosylation.

Les résultats présentés dans cette partie ont fait l'objet d'une publication dans le journal scientifique *mAbs* (Landes Bioscience 2013).

2. Publication: Rapid and multi-level characterization of trastuzumab using sheathless capillary electrophoresis-tandem mass spectrometry

Rabah Gahoual, Alicia Burr, Jean-Marc Busnel, Lauriane Kuhn, Phillippe Hammann, Alain Beck, Yannis Nicolas François, Emmanuelle Leize-Wagner. **Rapid and multi-level characterization of trastuzumab using sheathless capillary electrophoresis-tandem mass spectrometry**, mAbs 2013, 5(3), 479-490.

Abstract

Monoclonal antibodies (mAbs) are highly complex proteins that display a wide range of microheterogeneity that requires multiple analytical methods for full structure assessment and quality control. As a consequence, the characterization of mAbs on different levels is particularly product - and time - consuming. This work presents the characterization of trastuzumab sequence using sheathless capillary electrophoresis (referred as CESI) – tandem mass spectrometry (CESI-MS/MS). Using this bottom-up proteomic-like approach, CESI-MS/MS provided 100% sequence coverage for both heavy and light chain via peptide fragment fingerprinting (PFF) identification. The result was accomplished in a single shot, corresponding to the analysis of 100 fmoles of digest. The same analysis also enabled precise characterization of the post-translational hot spots of trastuzumab, used as a representative widely marketed therapeutic mAb, including the structural confirmation of the five major N-glycoforms.

Article soumis à droits d'auteur :

Gahoual et al., Rapid and multi-level characterization of trastuzumab using sheathless capillary electrophoresis-tandem mass spectrometry, *mAbs* 2013, 5(3), 479-490. (DOI : 10.4161/mabs.23995)

Article soumis à droits d'auteur :

Gahoual et al., Rapid and multi-level characterization of trastuzumab using sheathless capillary electrophoresis-tandem mass spectrometry, *mAbs* 2013, 5(3), 479-490. (DOI : 10.4161/mabs.23995)

Article soumis à droits d'auteur :

Gahoual et al., Rapid and multi-level characterization of trastuzumab using sheathless capillary electrophoresis-tandem mass spectrometry, *mAbs* 2013, 5(3), 479-490. (DOI : 10.4161/mabs.23995)

Article soumis à droits d'auteur :

Gahoual et al., Rapid and multi-level characterization of trastuzumab using sheathless capillary electrophoresis-tandem mass spectrometry, *mAbs* 2013, 5(3), 479-490. (DOI : 10.4161/mabs.23995)

Article soumis à droits d'auteur :

Gahoual et al., Rapid and multi-level characterization of trastuzumab using sheathless capillary electrophoresis-tandem mass spectrometry, *mAbs* 2013, 5(3), 479-490. (DOI : 10.4161/mabs.23995)

Article soumis à droits d'auteur :

Gahoual et al., Rapid and multi-level characterization of trastuzumab using sheathless capillary electrophoresis-tandem mass spectrometry, *mAbs* 2013, 5(3), 479-490. (DOI : 10.4161/mabs.23995)

Article soumis à droits d'auteur :

Gahoual et al., Rapid and multi-level characterization of trastuzumab using sheathless capillary electrophoresis-tandem mass spectrometry, *mAbs* 2013, 5(3), 479-490. (DOI : 10.4161/mabs.23995)

Article soumis à droits d'auteur :

Gahoual et al., Rapid and multi-level characterization of trastuzumab using sheathless capillary electrophoresis-tandem mass spectrometry, *mAbs* 2013, 5(3), 479-490. (DOI : 10.4161/mabs.23995)

Article soumis à droits d'auteur :

Gahoual et al., Rapid and multi-level characterization of trastuzumab using sheathless capillary electrophoresis-tandem mass spectrometry, *mAbs* 2013, 5(3), 479-490. (DOI : 10.4161/mabs.23995)

Article soumis à droits d'auteur :

Gahoual et al., Rapid and multi-level characterization of trastuzumab using sheathless capillary electrophoresis-tandem mass spectrometry, *mAbs* 2013, 5(3), 479-490. (DOI : 10.4161/mabs.23995)

Article soumis à droits d'auteur :

Gahoual et al., Rapid and multi-level characterization of trastuzumab using sheathless capillary electrophoresis-tandem mass spectrometry, *mAbs* 2013, 5(3), 479-490. (DOI : 10.4161/mabs.23995)

Article soumis à droits d'auteur :

Gahoual et al., Rapid and multi-level characterization of trastuzumab using sheathless capillary electrophoresis-tandem mass spectrometry, *mAbs* 2013, 5(3), 479-490. (DOI : 10.4161/mabs.23995)

Article soumis à droits d'auteur :

Gahoual et al., Rapid and multi-level characterization of trastuzumab using sheathless capillary electrophoresis-tandem mass spectrometry, *mAbs* 2013, 5(3), 479-490. (DOI : 10.4161/mabs.23995)

Article soumis à droits d'auteur :

Gahoual et al., Rapid and multi-level characterization of trastuzumab using sheathless capillary electrophoresis-tandem mass spectrometry, *mAbs* 2013, 5(3), 479-490. (DOI : 10.4161/mabs.23995)

Article soumis à droits d'auteur :

Gahoual et al., Rapid and multi-level characterization of trastuzumab using sheathless capillary electrophoresis-tandem mass spectrometry, *mAbs* 2013, 5(3), 479-490. (DOI : 10.4161/mabs.23995)

Article soumis à droits d'auteur :

Gahoual et al., Rapid and multi-level characterization of trastuzumab using sheathless capillary electrophoresis-tandem mass spectrometry, *mAbs* 2013, 5(3), 479-490. (DOI : 10.4161/mabs.23995)

Article soumis à droits d'auteur :

Gahoual et al., Rapid and multi-level characterization of trastuzumab using sheathless capillary electrophoresis-tandem mass spectrometry, *mAbs* 2013, 5(3), 479-490. (DOI : 10.4161/mabs.23995)

Article soumis à droits d'auteur :

Gahoual et al., Rapid and multi-level characterization of trastuzumab using sheathless capillary electrophoresis-tandem mass spectrometry, *mAbs* 2013, 5(3), 479-490. (DOI : 10.4161/mabs.23995)

3. Conclusion

Les travaux présentés dans cette seconde partie détaillent le développement d'une méthode d'analyse par CE-ESI-MS/MS, par l'intermédiaire du système CESI-MS, pour la caractérisation d'anticorps monoclonaux. La méthodologie adoptée dans le cadre de cette caractérisation est basée sur une stratégie de type protéomique *bottom-up*. Les échantillons ont au préalable subi une digestion protéolytique à la trypsine en utilisant un protocole de digestion en solution. Aucune étape de dessalage n'a été effectuée afin d'éviter la perte des peptides hydrophiles, non retenus sur la phase stationnaire lors de l'extraction sur phase solide (SPE). Le digestat a ensuite été séparé et analysé par CESI-MS/MS.

Les résultats obtenus pour la caractérisation de la séquence d'acides aminés ont permis d'en déduire 100% de recouvrement de séquence en une seule injection correspondant à 100 fmol de peptides digérés. Un tel résultat est sans précédent. Ainsi la littérature ne décrit pas un recouvrement complet d'une protéine par l'analyse MS/MS en une unique injection. La mise en œuvre du couplage CESI-MS pour ce type de caractérisation joue un rôle central dans l'obtention de ce résultat par plusieurs aspects. L'identification de peptides hydrophiles et les peptides de faibles masses moléculaires (1-3 acides aminés) peut s'avérer problématique par des approches classiques utilisant des méthodes de RP-LC-MS/MS. En effet, ces peptides ne sont pas ou peu retenus par la phase stationnaire et sont généralement élués dans le volume mort. En CE, tous les peptides migrent sous l'effet du champ électrique quel que soit leur structure ou leur taille et sont donc transférés successivement au spectromètre de masse. Il en résulte la possibilité en CE-MS d'obtenir la séparation et l'analyse MS/MS d'une grande variété de peptides : l'analyse développée a montré la possibilité d'obtenir la séparation et l'identification d'un peptide de faible masse moléculaire composé de seulement 4 acides aminés et également d'un peptide composé de 63 acides aminés dont la masse excède les 6 kDa. L'excellent rendement d'ionisation délivré par le système CESI-MS, décrit dans la partie précédente, a également démontré un intérêt singulier dans ce type de caractérisation. L'analyse de seulement 100 fmol de peptides digérés a permis d'obtenir le recouvrement complet de la séquence du mAb illustrant la sensibilité que permet d'atteindre le système. De plus le rendement d'ionisation a un impact significatif sur la qualité des spectres générés notamment en MS/MS. Les spectres ont montré l'identification d'un nombre important de fragments, ce qui se traduit en la capacité de caractérisation de 109/120 et 97/108 des acides aminés composant le domaine variable de trastuzumab respectivement sur la HC et la LC. Un tel niveau de caractérisation est particulièrement intéressant et illustre l'intérêt de ce type de couplage.

Parallèlement, la caractérisation des PTMs *hot-spots* a été réalisée en utilisant les mêmes données que la caractérisation de la séquence. Les données CESI-MS/MS ont ainsi permis la caractérisation de 6 hot spots présents sur le mAb. Les résultats ont montré la capacité, par le biais de la méthodologie développée, à obtenir conjointement le spectre de fragmentation du peptide modifié et de son homologue intacte, ce qui offre la possibilité entre autres de définir de manière précise l'acide aminé concerné par la modification.

Enfin les différentes glycosylations portées par trastuzumab ont aussi pu être caractérisées en utilisant le même set de données que précédemment. Les données MS/MS ont ainsi permis l'identification des 5 glycosylations majeures portées par trastuzumab, qui selon la littérature représente plus de 80% des glycosylations portées par le mAb. L'étude des spectres MS/MS des différents glycopeptides a montré la fragmentation du glycanne porté par ce peptide, ce qui a permis d'en déduire les structures des glycosylations. Une fois de plus l'utilisation de la CE en tant que méthode séparative apparaît comme un atout. Les différents glycopeptides ont pu être partiellement séparés en fonction du glycoforme, notamment dans le cas d'une différence d'un galactose. Cette sélectivité est particulièrement intéressante afin de limiter les effets de suppression d'ions et participe de manière significative à la sensibilité de la caractérisation sur cet aspect de la protéine.

La méthode développée a permis de caractériser, en une seule injection, l'anticorps monoclonal trastuzumab simultanément sur plusieurs niveaux définissant sa structure. Ces résultats montrent le potentiel en termes de sensibilité et de qualité spectrale offerts par ce type de couplage CE-ESI-MS. De plus l'utilisation de la CE pour cette caractérisation a permis de mettre en lumière l'intérêt d'utiliser la sélectivité de cette méthode séparative.

Il convient de démontrer que la méthodologie développée dans cette partie permet d'obtenir une caractérisation aussi avancée que dans le cas de trastuzumab pour d'autres protéines et d'étudier en détail l'apport que la séparation par CE peut apporter à la caractérisation structurale de protéines par MS.

III - Caractérisation complète de la structure primaire et des micro-hétérogénéités d'anticorps en une seule injection par isotachophorèse et CESI-MS/MS

1. Introduction

L'électrophorèse capillaire (CE) est une technique permettant la séparation d'analytes sous l'effet d'un champ électrique. La CE a pour avantage majeur de permettre la réalisation de séparation en quelques minutes tout en maintenant une grande efficacité de séparation. La littérature fait ainsi état de séparations dont l'efficacité est supérieure à 500 000 plateaux théoriques. Une telle efficacité de séparation s'explique notamment par l'absence de phase stationnaire ce qui a pour effet de diminuer de manière importante la diffusion longitudinale et l'opposition au transfert de masse, à l'origine de l'élargissement des pics. Malgré d'importants développements instrumentaux, les systèmes permettant le couplage entre la CE et la spectrométrie de masse à source électrospray (ESI-MS) sont employés de manière marginale par rapport au couplage chromatographique. Cette tendance est directement liée à la difficulté à maintenir le champ électrique, nécessaire à la séparation, à l'intérieur du capillaire de CE tout en positionnant l'extrémité de celui-ci à l'intérieur de la source ESI. De plus, la plupart des systèmes permettant la mise en œuvre du couplage CE-ESI-MS utilisent généralement un système pour maintenir le contact électrique induisant une diminution de la sensibilité. A titre d'exemple l'interface dite *sheath liquid* utilise un liquide additionnel pour maintenir la continuité du champ électrique durant la séparation, ce liquide induit un effet de dilution de l'échantillon et tend à diminuer la sensibilité du signal ([cf. partie I. III.2. Interfaces sheath-liquid](#)). Par opposition, le couplage entre la chromatographie liquide et la spectrométrie de masse (LC-ESI-MS), plus simple d'un point de vue instrumental, est souvent préféré du fait de sa facilité de mise en œuvre et de sa robustesse.

Depuis son développement, l'ESI a largement démontré son intérêt pour l'ionisation des protéines et des peptides. Ainsi une séparation électrophorétique en complément de l'analyse MS devrait d'un point de vue théorique être privilégiée pour les analytes biologiques par plusieurs aspects. En particulier la CE est une méthode séparative miniaturisée, ce qui est favorable à la formation d'un nanoESI et garantie une ionisation optimale. De plus, la CE est particulièrement adaptée à la séparation de ce type de molécules, ainsi l'électrophorèse est largement utilisée en biologie pour la séparation et la purification d'analytes variées (ADN,

ARN, protéines, peptides). La CE mise en œuvre en couplage avec la MS, peut permettre d'outrepasser certaines des limitations relatives aux couplages utilisant la chromatographie liquide, notamment du fait que les principes physico-chimiques mis en jeu pour induire la séparation sont différents. Le système CESI-MS permet la mise en œuvre du couplage CE-ESI-MS sans utiliser de liquide additionnel ce qui permet d'obtenir une sensibilité maximale d'autant que les débits générés par le flux électroosmotique ne sont que de quelques dizaines de nL/min ([cf. partie I. III.4.3. Interface CESI-MS](#)). Les travaux présentés dans cette partie ont pour objectif de démontrer l'intérêt d'utiliser une méthode de séparation électrophorétique en amont de l'analyse MS, par l'intermédiaire du système CESI-MS, pour la caractérisation de la structure primaire de protéines.

Ces travaux décrivent la mise en œuvre et le développement d'une méthode analytique permettant la caractérisation fine de la structure primaire de plusieurs anticorps monoclonaux (mAbs) dont notamment trastuzumab (Herceptin®, Roche) et cetuximab (Erbix®, Merck KGaA). La caractérisation d'échantillons de mAbs apparaît d'un fort intérêt car ces glycoprotéines regroupent différentes problématiques communément observées sur une large gamme de protéines : caractérisation de la séquence d'acides aminés, glycosylation, modifications post-traductionnelles (PTMs). Ils représentent donc des molécules de choix pour démontrer le degré de caractérisation pouvant être atteint par la méthodologie développée.

Les échantillons ont tout d'abord subis une digestion trypsique. Par rapport aux résultats présentés dans la partie précédente, le protocole de digestion a été modifié afin d'améliorer la compatibilité entre l'échantillon et la méthode d'analyse par CESI-MS/MS, ce qui a pour effet d'améliorer significativement le niveau de caractérisation. Le digestat de peptides a ensuite été séparé et caractérisé par isotachophorèse transitoire (t-ITP) et CESI-MS/MS. L'isotachophorèse transitoire est une méthode de préconcentration utilisée en électrophorèse capillaire. La t-ITP autorise un volume d'injection correspondant à 25% de volume total du capillaire de CE tout en maintenant une efficacité de séparation optimale ([cf. partie I. I.3.2. Isotachophorèse](#)). Les données de CESI-MS/MS ont dans un premier temps été utilisées pour caractériser la séquence d'acides aminés. Les résultats obtenus ont montré la capacité de la méthodologie développée à obtenir systématiquement 100% de recouvrement de séquence en une seule injection pour chacun des mAbs étudiés. Pour chacun des mAbs étudiés, la caractérisation de la séquence d'acides aminés a pu être réalisée uniquement par l'identification de peptides sans *miscleavages* et ne portant aucune PTMs. Les résultats obtenus illustrent l'important rendement d'ionisation du système CESI-MS ce qui impacte directement la qualité spectrale : l'identification des peptides a montré la capacité en utilisant cette méthode d'en déduire systématiquement plus de 70% des fragments y/b et dans le cas de trastuzumab cette valeur excède les 90%.

Les données de t-ITP CESI-MS/MS ont également été utilisées pour caractériser les glycosylations portées par ces différents mAbs. Dans le cas de trastuzumab, il a été possible de caractériser au total 15 glycosylations différentes dont les abondances se sont avérées largement hétérogènes. Les performances de la méthode développée, au regard de la caractérisation des glycosylations, sont directement reliées avec la capacité de la CE à séparer les différents glycopeptides en fonction du glycanne qu'ils portent.

Les PTMs *hot-spots* ont également pu être caractérisés pour chacun des mAbs. Dans chacun des cas, l'ensemble des PTMs *hot-spots* portés par la protéine ont pu être caractérisés. L'utilisation de la CE en tant que méthode séparative en amont de l'analyse MS a démontré sa pertinence en particulier dans le cadre de la caractérisation des PTMs. En effet les résultats obtenus ont montré la faculté de la méthodologie développée à séparer complètement un peptide modifié de son homologue resté intact. Ce type de sélectivité, délivrée par l'utilisation de la séparation électrophorétique, a pu être observée même dans le contexte de modification impactant relativement peu le peptide tel que la déamidation d'une asparagine (+0.98 Da) ou encore l'isomérisation de l'acide aspartique (+ 0 Da). La séparation de cette dernière modification est particulièrement intéressante puisqu'elle ne peut être caractérisée en MS par l'intermédiaire d'instruments utilisant un analyseur TOF. Des expériences complémentaires ont d'ailleurs été réalisées afin de démontrer sans aucune ambiguïté la séparation de peptides portant des isomères différents d'acide aspartique.

Les résultats présentés dans cette partie font l'objet d'une publication dans le journal scientifique *Analytical Chemistry* (ACS publications).

2. Publication: Full antibody primary structure and micro-variant characterization in a single injection using transient isotachopheresis and sheathless capillary electrophoresis – tandem mass spectrometry

Rabah Gahoual, Jean-Marc Busnel, Alain Beck, Yannis-Nicolas François, Emmanuelle Leize-Wagner, **Full antibody primary structure and micro-variant characterization in a single injection using transient isotachopheresis and sheathless capillary electrophoresis – tandem mass spectrometry**, *Analytical Chemistry* 2014, 86 (18), 9074–9081.

Abstract

Here we report the complete characterization of the primary structure of a multimeric glycoprotein in a single analysis by capillary electrophoresis (CE) coupled to mass spectrometry (MS). CE was coupled to electrospray ionization tandem MS by the mean of a sheathless interface. Characterization was based on an adapted bottom-up proteomic strategy. Using trypsin as the sole proteolytic enzyme and data from a single injection per considered protein, 100% of the amino acid sequences of four different monoclonal antibodies could be achieved. Furthermore illustrating the effectiveness and overall capabilities of the technique, such results were possible through identification of peptides without tryptic miscleavages nor posttranslational modifications illustrating the potency of the technique. In addition to full sequence coverages, PTMs were simultaneously identified demonstrating further the capacity of this strategy to structurally characterize glycosylations as well as faint modifications such as asparagine deamidation or aspartic acid isomerization. Together with the exquisite detection sensitivity observed, the contribution of both CE separation mechanism and selectivity were essential to the fineness of the characterization in regard to what is achieved with conventional MS strategies. The quality of the results indicates that recent improvements in interfacing CE-MS coupling leading to a considerably improved sensitivity, allows characterizing the primary structure of proteins in a robust and faster manner. Taken together, these results open new research avenues for characterization of proteins through MS.

Article soumis à droits d'auteur :

Gahoual et al., Full antibody primary structure and micro-variant characterization in a single injection using transient isotachopheresis and sheathless capillary electrophoresis – tandem mass spectrometry, *Analytical Chemistry* 2014, 86 (18), 9074–9081. (DOI : 10.1021/ac502378e)

Article soumis à droits d'auteur :

Gahoual et al., Full antibody primary structure and micro-variant characterization in a single injection using transient isotachopheresis and sheathless capillary electrophoresis – tandem mass spectrometry, *Analytical Chemistry* 2014, 86 (18), 9074–9081. (DOI : 10.1021/ac502378e)

Article soumis à droits d'auteur :

Gahoual et al., Full antibody primary structure and micro-variant characterization in a single injection using transient isotachopheresis and sheathless capillary electrophoresis – tandem mass spectrometry, *Analytical Chemistry* 2014, 86 (18), 9074–9081. (DOI : 10.1021/ac502378e)

Article soumis à droits d'auteur :

Gahoual et al., Full antibody primary structure and micro-variant characterization in a single injection using transient isotachopheresis and sheathless capillary electrophoresis – tandem mass spectrometry, *Analytical Chemistry* 2014, 86 (18), 9074–9081. (DOI : 10.1021/ac502378e)

Article soumis à droits d'auteur :

Gahoual et al., Full antibody primary structure and micro-variant characterization in a single injection using transient isotachopheresis and sheathless capillary electrophoresis – tandem mass spectrometry, *Analytical Chemistry* 2014, 86 (18), 9074–9081. (DOI : 10.1021/ac502378e)

Article soumis à droits d'auteur :

Gahoual et al., Full antibody primary structure and micro-variant characterization in a single injection using transient isotachopheresis and sheathless capillary electrophoresis – tandem mass spectrometry, *Analytical Chemistry* 2014, 86 (18), 9074–9081. (DOI : 10.1021/ac502378e)

Article soumis à droits d'auteur :

Gahoual et al., Full antibody primary structure and micro-variant characterization in a single injection using transient isotachopheresis and sheathless capillary electrophoresis – tandem mass spectrometry, *Analytical Chemistry* 2014, 86 (18), 9074–9081. (DOI : 10.1021/ac502378e)

Article soumis à droits d'auteur :

Gahoual et al., Full antibody primary structure and micro-variant characterization in a single injection using transient isotachopheresis and sheathless capillary electrophoresis – tandem mass spectrometry, *Analytical Chemistry* 2014, 86 (18), 9074–9081. (DOI : 10.1021/ac502378e)

Article soumis à droits d'auteur :

Gahoual et al., Full antibody primary structure and micro-variant characterization in a single injection using transient isotachopheresis and sheathless capillary electrophoresis – tandem mass spectrometry, *Analytical Chemistry* 2014, 86 (18), 9074–9081. (DOI : 10.1021/ac502378e)

Article soumis à droits d'auteur :

Gahoual et al., Full antibody primary structure and micro-variant characterization in a single injection using transient isotachopheresis and sheathless capillary electrophoresis – tandem mass spectrometry, *Analytical Chemistry* 2014, 86 (18), 9074–9081. (DOI : 10.1021/ac502378e)

Article soumis à droits d'auteur :

Gahoual et al., Full antibody primary structure and micro-variant characterization in a single injection using transient isotachopheresis and sheathless capillary electrophoresis – tandem mass spectrometry, *Analytical Chemistry* 2014, 86 (18), 9074–9081. (DOI : 10.1021/ac502378e)

Article soumis à droits d'auteur :

Gahoual et al., Full antibody primary structure and micro-variant characterization in a single injection using transient isotachopheresis and sheathless capillary electrophoresis – tandem mass spectrometry, *Analytical Chemistry* 2014, 86 (18), 9074–9081. (DOI : 10.1021/ac502378e)

Article soumis à droits d'auteur :

Gahoual et al., Full antibody primary structure and micro-variant characterization in a single injection using transient isotachopheresis and sheathless capillary electrophoresis – tandem mass spectrometry, *Analytical Chemistry* 2014, 86 (18), 9074–9081. (DOI : 10.1021/ac502378e)

Article soumis à droits d'auteur :

Gahoual et al., Full antibody primary structure and micro-variant characterization in a single injection using transient isotachopheresis and sheathless capillary electrophoresis – tandem mass spectrometry, *Analytical Chemistry* 2014, 86 (18), 9074–9081. (DOI : 10.1021/ac502378e)

3. Additional discussion regarding characterization of mAbs by t-ITP CESI-MS/MS

3.1. Sample preparation

As it has been described previously, the sample preparation was modified for different purposes: improve digestion yield and perform transient isotachopheresis. MAbs structures are ambivalent, the Y shaped quaternary structure is “souple” however their primary structure is quite organized in order to interact selectively with the antigen epitope. That organization tend to limit the access of trypsin to several lysine and arginine which is the cause of proteolytic digestion miscleavages occurrence.

In order to limit the occurrence of peptide with miscleavages, it is required to disrupt the primary structure of the mAbs, without chemical modifying the protein, prior to the tryptic digestion. That precaution enables trypsin to have access efficiently to the protein. In the characterization presented in the previous chapter ([cf. Partie III. II.](#)) a chaotropic agent composed of guanidine hydrochloride 6M. Using this chaotropic agent, identification results showed a significant proportion of peptides with miscleavages and the complete sequence coverage could be successfully by the identification of digested peptides exhibiting miscleavages ([cf. Part III. II. Figure 2](#)). Guanidine hydrochloride was replaced by another chaotropic agent which is Rapigest SF (Waters). That surfactant is originally used to perform highly efficient tryptic digestion in a reduced time but demonstrated its ability to improved the digestion yield especially for mAbs digestion. After the digestion, lowering the pH of the sample enables to cleave and precipitate the surfactant allowing its elimination

Results showed the use of that surfactant improves significantly the digestion yield. The digestion still is not complete for the entire sample however all lysine and arginine can be accessible to trypsin as it has been demonstrated by the complete sequence coverage performed using only tryptic peptides without miscleavages (figure 1).

3.2. Y / B fragment ions recovery

The characterization performed by t-ITP CESI-MS/MS enabled to systematically obtain more than 70% of the y/b ions induced by the fragmentation of the digested peptides. This results imply the possibility to retrace the exact amino acids succession on an extended part of the protein and also emphasize the important amount of information fragmentation spectra obtained using the CESI-MS/MS system are providing.

To determine the proportion of y/b ions retrieved, all the MS/MS spectra leading to the identification of a peptide were considered, including peptides containing miscleavages or

PTMs as long as they could be identified. Fragment ions identification from a single analysis were considered to estimate the proportion of y/b ions retrieved. The figure shows the fragment ions obtained in the case of trastuzumab.

The nature of the fragmented peptide is clearly influencing the proportion of its fragment which can be identified. Digested peptides composed of a few amino acids enables the identification of all the fragment whereas the fragment ion identification is less efficient in the case of bigger peptides. That trend is linked first to the collision energy range used for the fragmentation in CID. Also, MS/MS spectra are showing the different fragmentation possible for the selected precursor ion. As the number of amino acids is increased, the number of possibilities is mechanically increased as well. As a consequence, it is necessary to ionize and select an important number of the selected precursor ions to generate as much fragment ions which will give a decent signal for all the possible y/b fragment leading to their identification.

The improvement of the digestion yield is showing its interest. A complete digestion is generating a mixture composed of the smallest peptides, those peptides are allowing the identification of a maximum number of fragment ions. Indeed the part of the protein which could not see their fragment ions retrieved are located on high molecular mass peptides. Those peptides have not been cleaved further because they do not contain a lysine or an arginine. In that aspect it is possible to affirm that the proportion of y/b ions is partially conditioned by the peptides generated from its digestion which explains in this work differences from one mAb to another. The ionization efficiency of the CESI-MS system is also participating to the ability to retrieve almost the entire y/b ions.

The beneficial ionization efficiency provided by the CESI-MS is a direct consequence of the separation conditions used for the CE separation and the ionization process. Indeed the internal diameter of the capillary (30 μm) is enabling the formation of droplets having a reduced volume. In addition the flow rate of BGE generated by the electroosmotic flow is only of a few tenth nL/min which is favorable to ESI ionization process by enabling to evaporate the BGE easily.

The use of an electrophoretic separation before the MS/MS analysis demonstrated previously the ability to separate and transfer successfully to the MS an extended variety of peptides regarding their chemical structures and properties. That characteristic cumulated to the ability to retrieve almost in totality the y/b ions from peptides fragmentation is particularly interesting. Those characteristics suggest that the implementation of the t-ITP CESI-MS/MS method can give the opportunity to develop alternative MS characterization strategies especially because the consistency of the performance of the system.

3.3. Electrophoretic separation of the modified peptides

The following sub-chapter is describing the separation of digested peptides affected by PTMs which results could only be briefly mentioned in the article presented previously. That sub-chapter also contains additional experiments performed to validate unambiguously the separation of peptides because of aspartic acid isomerization.

a) Methionine oxidation

Similarly to the separation of peptides because of a deamidation of an asparagine, the separation selectivity provided by the implementation of CE enables to generate the separation of a peptide which has an oxidated methionine from the very same peptide without modification. As a reminder, methionine oxidation involves a mass shift of 15.99 Da however it does not imply a change of the charge state of the amino acid at the BGE pH.

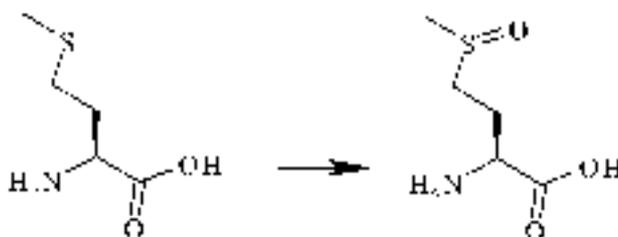


Figure 6. Reaction mechanism describing the oxidation of methionine lateral chain to give methionine sulfoxide.

Characterization of the primary structure performed using the t-ITP CESI-MS/MS methodology developed in this work demonstrated the ability of the conditions used to perform the electrophoretic separation lead to a change of the mobilities of the modified peptide compared to the unmodified one. Study of the corresponding MS/MS spectra proves the separation without any ambiguity as it is emphasize in figure 7.

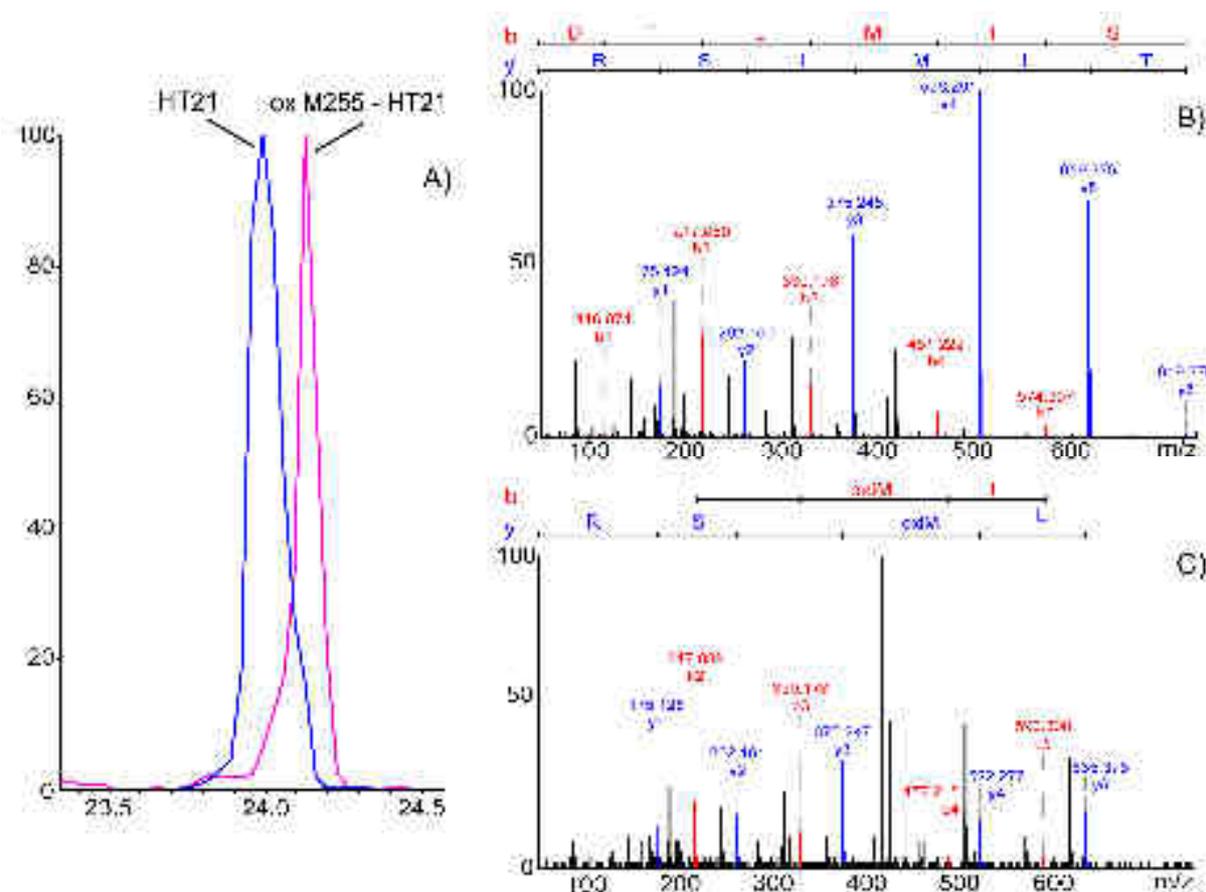


Figure 7. A) EIE corresponding to the m/z of trastuzumab peptide HT21 (heavy chain, position 252-258) and HT21 with oxidated Met255. MS/MS spectra corresponding to B) peptide HT21 and C) HT21 with oxidated met255 (oxidation represented by oxiM).

b) Aspartic acid isomerization

The separation of similar peptides because they are composed of aspartic acid in two different conformation has been described previously. The isomerization of aspartic acid does not imply a mass change of the entire peptide or a distinguishable change in the fragmentation which mean that it can not be identified from the MS or MS/MS data. As a consequence, in case of a co-migration, this modification could not be identified. Therefore the separation in this case is interesting because it allows to give additional information in the context of the primary structure characterization.

As separation is based also on the difference of hydrodynamic radius of the analytes, a conformation change of one amino acid composing the peptide is modifying the hydrodynamic radius of the affected peptide. A change of the hydrodynamic radius of the modified peptide leads to a difference of electrophoretic mobilities between the two peptides which is observed during the electrophoretic separation.

The article previously presented shows that the MS/MS spectra corresponding to both peaks in CE led to the same identification suggesting that the separation is induced by different

aspartic acid isomers. In order to confirm this assumption, additional experiments have been performed using synthetic peptides.

Those synthetic peptides were designed to be similar to a digested peptides, their amino acid sequences are as follow:

- $_2\text{HN-GLEWIGYISY}\underline{\text{D}}\text{GTNNYKPSLK-OH}$
- $_2\text{HN-GLEWIGYISY}\underline{\text{isoD}}\text{GTNNYKPSLK-OH}$

Different mixtures composed of those synthetic peptides were analyzed using the same t-ITP CESI-MS/MS method as the mAb characterization. Peptide ratios were different from one mixture to another in order to distinguish and identify the separation of the peptides. Figure 8 shows the separation obtained from the different mixtures.

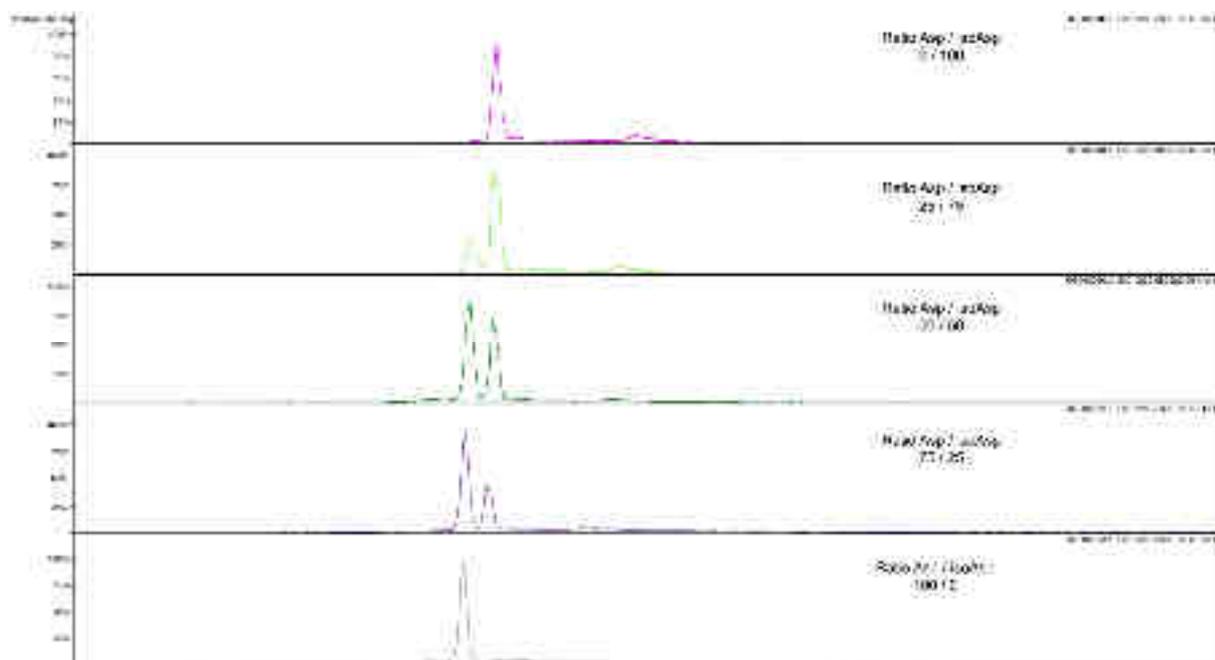


Figure 8. EIE corresponding to the m/z of the synthetic peptides considered for Asp isomerization separation study. Theoretical mass: 1209.5899 ± 0.05 (charge state 2+). Ratios expressed between two peptide conformations are based on absolute injected quantities.

The extraction of the m/z ratio corresponding to the peptides shows systematically two distinctive peak in the case a mixture of both peptides and one peak when only one of the peptide conformation was injected. In addition the abundances are in complete agreement with the ratio prepared. Those results validate without any ambiguity that the CE separation conditions used for the characterization allows to separate peptides based uniquely on aspartic acid isomerization.

4. Conclusion

Les travaux présentés dans cette partie détaillent l'utilisation du système CESI-MS afin de réaliser en une seule injection, la caractérisation complète de la structure primaire d'un anticorps et de démontrer l'intérêt d'utiliser une séparation électrophorétique en amont de l'analyse MS/MS pour fournir une caractérisation fine de la structure primaire de ces protéines. Dans le cadre de ces travaux une stratégie de protéomique *bottom-up* a été adoptée. La méthodologie a été significativement adaptée du point de vue de la préparation d'échantillon afin d'améliorer l'efficacité de la digestion et la compatibilité entre le contenu de l'échantillon et la séparation électrophorétique. L'isotachophorèse transitoire (t-ITP) a également été introduite dans la méthode d'analyse. Le bénéfice de cette technique est double : la t-ITP est une méthode de pré-concentration utilisée en CE, elle permet notamment de travailler avec des concentrations proches de celles utilisées en protéomique classique. De plus la t-ITP permet une standardisation du contenu de l'échantillon et tend à améliorer dans une certaine mesure l'efficacité de la séparation. Le traitement des données MS/MS a également dû être adapté en partie afin d'améliorer l'identification des peptides de faibles masses moléculaires. Différents mAbs ont été caractérisés. Ces protéines regroupent diverses problématiques de caractérisation généralement rencontrées dans une grande variété de protéines. Des répliques techniques ont été également analysés afin de démontrer la robustesse de la méthodologie développée.

Les résultats de ces travaux ont montré pour une injection correspondant à 200 fmol de peptides, la possibilité d'obtenir la caractérisation complète de la séquence d'acides aminés de manière systématique sur les différents mAbs analysés en utilisant la méthodologie développée. La caractérisation de la séquence d'acides aminés a pu être effectuée uniquement par l'identification de peptides ne portant ni *miscleavages* ni PTMs. Cette caractéristique est particulièrement intéressante et démontre que l'utilisation de la CE couplée à la MS permet la séparation et l'identification de l'ensemble des peptides composant le mélange indépendamment de leur structure. La caractérisation de la totalité de la séquence uniquement par l'intermédiaire de peptides intacts offre la possibilité de générer des cartes peptidiques qui pourront être utilisées pour le contrôle de la production de mAbs. L'annotation des spectres MS/MS a également montré que systématiquement plus de 70% des ions y/b ont pu être identifiés, cette valeur dépassant même les 90% dans le cas de trastuzumab. Ce résultat en particulier, a permis d'en déduire l'enchaînement complet des acides aminés composant le domaine variable de trastuzumab. La fonction principale du domaine variable des mAbs est de reconnaître et d'interagir avec l'antigène. La possibilité de caractériser de manière aussi précise une partie aussi importante de la protéine apparaît donc comme un atout majeur. Ces résultats de *peptide mapping* corrélés sur les différents mAbs montrent que

la mise en œuvre du couplage CESI-MS permet d'améliorer le degré de caractérisation par MS par rapport à une approche protéomique utilisant une méthodologie analytique conventionnelle (nanoLC-MS/MS). La possibilité d'identifier une large majorité de fragments et l'ensemble des peptides composant le digestat ouvrent la voie à de nouvelles applications pour la caractérisation de protéines notamment en se détachant progressivement des banques de données de protéines dont l'analyse protéomique est souvent tributaire ou encore d'identifiés des erreurs de transcription.

En concomitance avec la caractérisation de la séquence d'acides aminés, les différentes glycosylations portées par ces mAbs ont également été analysées. L'incorporation de la t-ITP a permis d'augmenter de manière significative le nombre de glycoformes pouvant être caractérisés. Ainsi dans le cas de trastuzumab, 15 glycosylations différentes ont pu être identifiées. L'intensité du signal MS correspondant aux glycopeptides a aussi été utilisée pour estimer l'abondance relative de chacune des glycosylations. Les résultats montrent la compatibilité de la gamme dynamique délivrée par le couplage CESI-MS pour cet aspect de la caractérisation : la glycosylation la plus abondante représentant une abondance de 44% tandis que la glycosylation la plus faiblement représentée possède une abondance de 0,1%. Notons que parmi les glycosylations identifiées, certaines contiennent un acide sialique. La sélectivité de la séparation joue un rôle dans la détection de glycoformes si faiblement abondants. L'étude de la séparation a montré que la sélectivité de la CE entraîne la séparation complète des glycopeptides possédant un galactose de différence. De la même manière, les glycopeptides portant une différence d'un fucose se sont vu partiellement séparés. La séparation des différents glycopeptides tend à minimiser les effets de compétition au moment de l'ionisation (suppression d'ions), ce qui se traduit au niveau du résultat par une sensibilité importante et une quantification relative dont la justesse est améliorée. La méthodologie décrite dans cette partie permet la caractérisation des glycanes encore liés de manière covalente sur le peptide. Les spectres MS/MS illustrent la fragmentation du glycanne ce qui laisse en déduire la structure des glycanes.

Dans le cas de cetuximab, dont l'une des particularités est d'abriter deux sites de glycosylations, l'analyse par CESI-MS/MS a permis de considérer chaque site de glycosylations indépendamment. Les résultats de cette étude ont permis d'identifier les différentes glycosylations portées par chacun des sites de N-glycosylation et d'en déduire la structure pour la plupart d'entre elles.

Dans le cadre de la caractérisation de la structure primaire de la protéine, les PTMs ont également été étudiées. La caractérisation de PTMs illustre clairement la pertinence de l'utilisation d'une séparation électrophorétique en amont de l'analyse MS/MS. En effet ces

modifications induisent une variation de la mobilité électrophorétique du peptide ce qui entraîne, sous l'effet du champ électrique, une séparation du peptide modifié et de son homologue n'ayant pas subi la modification. L'application de la CE a permis la séparation de peptide dont les modifications ont une influence significative sur la masse du peptide (cyclisation de l'acide glutamique N-terminal, oxidation de méthionine) mais également de modifications dont l'impact sur la masse du peptide est faible (déamidation d'asparagine).

En particuliers, ces travaux démontrent que l'utilisation de la CE comme méthode séparative permet d'obtenir une séparation complètement résolue pour des peptides de séquence identique et dont la seule différence est la présence d'un isomère différent d'acide aspartique. Ce résultat est tout fait significatif car l'isomérisation de l'acide aspartique n'entraîne pas de variation de la masse du peptide, les différents isomères ne peuvent être identifiés en MS par l'intermédiaire d'un analyseur TOF et nécessitent des stratégies analytiques spécifiques pour être caractérisés. Les travaux montrent que l'identification de ces isomères a pu être intégrée dans la méthodologie globale de la caractérisation de la structure primaire des mAbs étudiés. L'application d'une séparation électrophorétique permet par conséquent dans ce cas d'étoffer le degré de caractérisation pouvant être atteint.

Les résultats présentés illustrent donc la possibilité de réaliser en une seule analyse une caractérisation avancée de la structure primaire de protéines thérapeutiques. Différents mAbs ont été étudiés afin de démontrer la robustesse de la caractérisation obtenue par l'intermédiaire de la méthodologie développée. De la même manière, des répliques techniques ont également été analysés afin de prouver la reproductibilité de la caractérisation avec succès.

Les mAbs étudiés étant relativement bien détaillé dans la littérature, il convient de démontrer l'applicabilité de la stratégie de caractérisation par t-ITP CESI-MS/MS dans le cas de protéines inconnues ou ayant subies des modifications.

IV - Evaluation de la biosimilarité d'anticorps monoclonaux par isotachophorèse transitoire et CESI-MS/MS

1. Introduction

Les anticorps monoclonaux (mAbs) ont été introduit en tant que traitement thérapeutique seulement à la fin des années 1980, ils représentent à l'heure actuelle la classe d'agent thérapeutique qui enregistre la croissance la plus importante. Les mAbs du fait de leur spécificité pour l'antigène associé ouvrent de nouvelles perspectives en termes de traitement thérapeutique, de plus certaines de leurs propriétés sont favorables à l'application pour le traitement de pathologies (réductions des effets secondaires, pharmacocinétique et pharmacodynamique favorables). A l'heure actuelle, une quarantaine de mAbs ont été approuvés comme traitement thérapeutique dans le monde et 30 autres mAbs sont en Phase 3 d'essai clinique. Les champs d'application de ce type de protéines sont principalement l'oncologie, ils sont également utilisés dans le traitement de maladie inflammatoire, de maladies auto-immune ou plus récemment pour le traitement de la maladie d'Alzheimer.

Les brevets protégeant la première génération de mAbs, dont plusieurs *blockbusters* (traitements générant plus d'un milliards de dollar de chiffre d'affaires par an), tomberont dans les prochains mois dans le domaine public. La fin de cette protection offre l'opportunité à des entreprises tierces de produire des versions « bio-générique » de ces mAbs. Ces copies portent le nom de biosimilaires.

Les anticorps monoclonaux sont des protéines recombinantes produites à partir de lignées cellulaires sélectionnées et de ce fait protégées. La complexité structurale des mAbs et le fait qu'ils soient soumis à d'importantes micro-hétérogénéités sont autant de difficultés s'opposant à la production d'une protéine strictement similaire par des entreprises tierces comme cela est communément le cas dans le domaine des petites molécules. Prenant en compte ce type de limitations les autorités du médicament, EMA et FDA en pointe, travaillent depuis plusieurs années sur l'établissement de lignes directrices pavant la voie à l'approbation de biosimilaires sans recourir à l'ensemble des essais cliniques comme pour l'approbation d'un nouveau traitement. Ces directives prennent en compte les limitations induites par la production de protéines recombinantes et définissent des critères de qualité (*critical quality attributes*, CQA) qui doivent impérativement être communs entre un mAb original et un candidat pour être considéré comme biosimilaire, ces critères concernent notamment la structure de la protéine. Ces critères suggèrent ainsi que l'immunogénicité aussi bien que les PK/PD entre un mAb et

son biosimilaire ne sont pas significativement différentes. Ces directives récemment publiées ont par conséquent pour but d'aider à la démonstration de la biosimilarité entre un mAb déjà commercialisé et un candidat biosimilaire.

Preuve de l'intérêt industriel pour le développement de mAb biosimilaires, l'EMA a approuvé la commercialisation du premier mAb biosimilaire (infiximab) fin de l'année 2013. L'évaluation de la biosimilarité entre deux protéines implique une caractérisation complète de sa structure et de propriétés physico-chimiques tout comme l'étude de ses PK et PD. Certaines différences mineures peuvent être tolérées, toutefois il convient de souligner que l'émergence de différences significatives pourra faire l'objet d'essais cliniques afin de démontrer que celles-ci n'induisent sur les propriétés toxicologiques et cliniques du biosimilaire.

Dans le but de fournir une caractérisation structurale la plus aboutie possible, l'application de méthodologie analytique innovante pourra jouer un rôle important dans le développement et la validation de biosimilaires mais également de mAbs de nouvelle génération. Il est impératif de développer des outils analytiques permettant d'obtenir une large gamme d'information concernant la structure de la protéine de manière fiable et robuste. De tels outils pourraient se révéler des atouts majeurs d'un point de vue sécurité et pourraient aider aux développements de nouveaux traitements. La possibilité par le biais de données analytiques d'éliminer durant la phase de R&D un candidat biosimilaire non satisfaisant permettrait d'améliorer les chances de réussite dans le contexte du développement d'un biosimilaire. La spectrométrie de masse (MS) joue un rôle de plus en plus important en ce qui concerne la caractérisation de mAbs notamment du fait qu'elle permet d'accéder à une grande variété d'informations concernant la structure de la protéine. Pourtant la MS nécessite l'utilisation de différentes techniques orthogonales (RP-LC, SEC, CEX) afin de réaliser l'étude de la protéine sur les différentes facettes qui composent sa structure.

Les travaux de thèse détaillés dans cette partie décrivent l'application de la méthodologie t-ITP CESI-MS/MS, développée dans la partie précédente, pour l'étude de biosimilarité de plusieurs mAbs. Ces travaux ont pour objectif de démontrer ou d'infirmer la similarité entre un mAb déjà commercialisé et un candidat biosimilaire du point de vue de la structure primaire de ces protéines. Trastuzumab et cetuximab ont ainsi été confrontés chacun à un candidat biosimilaire respectif. Les comparaisons ont été effectuées en utilisant les données provenant d'une seule injection pour chacun des échantillons considérés.

Les résultats obtenus pour la caractérisation de la séquence d'acides aminés ont montré pour chacun des mAbs analysés la possibilité de caractériser la totalité de la séquence en une seule analyse. Dans chacun des cas, la caractérisation est basée sur l'identification de peptides sans *miscleavages* ni modifications post-traductionnelles (PTMs). Les données CESI-MS/MS

ont permis dans le cadre de l'étude trastuzumab/biosimilaire de mettre en évidence une différence d'un unique acide aminé entre les deux protéines. Les données ont ainsi permis de caractériser rapidement la présence d'une différence majeure au niveau de la séquence d'acides aminés du candidat biosimilaire, mais également de déterminer l'acide aminé en cette position dans le cas du candidat. Dans le cadre de l'étude de la biosimilarité cetuximab/biosimilaire, les données CESI-MS/MS ont permis de démontrer sans ambiguïté une complète similitude entre cetuximab et le candidat du point de vue de la séquence d'acides aminés.

Concernant les différentes glycosylations portées par les mAbs étudiés. Les glycanes ont pu être caractérisés du point de vue de leur structure et les abondances relatives ont été estimées, afin de comparer les profils d'expression des glycosylations entre les mAbs originaux et leur candidat biosimilaire. Les résultats de l'analyse CESI-MS/MS ont montré la capacité de cette méthodologie à permettre pour chacun des échantillons étudiés l'identification d'un nombre significatif de glycosylations (entre 10 et 16 selon le mAb étudié). Les comparaisons des profils de glycosylation entre les mAbs originaux et leur candidat biosimilaire démontrent la capacité de la méthode pour caractériser des différences mineures entre les profils de glycosylation. La comparaison entre trastuzumab et le candidat biosimilaire a mis en évidence uniquement des différences d'abondance entre les deux échantillons.

Pour cetuximab, les deux sites de glycosylations ont pu être caractérisés de manière totalement indépendante. Les données de CESI-MS/MS montrent des différences d'abondances entre cetuximab et son candidat biosimilaire. De plus les données recueillies ont servi pour prouver qu'une partie des glycosylations exprimées par le candidat biosimilaire n'étaient pas présente chez cetuximab, ce qui a abouti à l'impossibilité de considérer ces deux protéines comme étant biosimilaires.

Dans le contexte de l'évaluation de la biosimilarité entre les échantillons de mAbs originaux et les candidats biosimilaires, les PTMs d'intérêt ont également été caractérisées. Les données issues des analyses CESI-MS/MS ont permis l'identification de ces PTMs, le degré de modification a aussi été estimé à partir des données. L'objectif de cet aspect est de détecter des modifications surexprimées pouvant mettre en doute l'activité du candidat biosimilaire par rapport au mAb original. Les résultats présentés dans cette partie montrent qu'il a été possible d'identifier chacune des PTMs d'intérêts présentes sur les échantillons caractérisés, quelle que soit la nature de la modification. Les comparaisons effectuées, sur cet aspect de la protéine, entre les mAbs originaux et leur candidat biosimilaire ont démontré la capacité de la méthode à mettre en évidence des différences de degré de modification relativement faibles.

Dans la partie précédente, nous avons démontré la séparation de peptides portant une isomérisation d'un acide aspartique. Cette caractéristique a pu être mise à profit dans les travaux présentés ci-après. Ainsi les niveaux de modifications ont pu également être obtenus pour cette modification, en l'intégrant directement au processus de caractérisation.

Les résultats de la caractérisation réalisée par t-ITP CESI-MS/MS ont permis de conclure sur la biosimilarité de chacun des candidats aussi bien dans le cas de trastuzumab ou cetuximab. D'autant plus, la qualité des données générées et la diversité de la caractérisation pouvant être accomplie en une seule analyse a permis dans chacune des études de mettre en lumière l'aspect du candidat qui n'a pu être jugé comme suffisamment similaire au mAb original.

2. Publication: Monoclonal antibodies biosimilarity assessment using transient isotachopheresis capillary zone electrophoresis-tandem mass spectrometry

Rabah Gahoual, Michaël Biacchi, Johana Chicher, Lauriane Kuhn, Philippe Hammann, Alain Beck, Emmanuelle Leize-Wagner, Yannis-Nicolas François, **Monoclonal antibodies biosimilarity assessment using transient isotachopheresis capillary zone electrophoresis-tandem mass spectrometry**, mAbs 2014, accepted.

Abstract

Out of all categories, monoclonal antibody (mAb) therapeutics attract the most interest due to their strong therapeutic potency and specificity. Six of the ten top-selling drugs are antibody-based therapeutics that will lose patent protection soon. The European Medicines Agency has pioneered the regulatory framework for approval of biosimilar products and approved the first biosimilar antibodies by the end of 2013. As highly complex glycoproteins with a wide range of micro-variants, mAbs require extensive characterization through multiple analytical methods for structure assessment rendering manufacturing control and biosimilarity studies particularly product and time-consuming. Here, capillary zone electrophoresis coupled to mass spectrometry by a sheathless interface (CESI-MS) was used to characterize marketed reference mAbs and their respective biosimilar candidate simultaneously over different facets of their primary structure. CESI-MS/MS data were confronted between approved mAbs and their biosimilar candidates to prove/disconfirm biosimilarity regarding recent regulation directives. Using only a single sample injection of 200 fmol, CESI-MS/MS data enabled 100% amino acids (AA) sequence characterization, which allows a difference of even one AA between two samples to be distinguished precisely. Simultaneously glycoforms were characterized regarding their structures and position through fragmentation spectra and glycoforms semiquantitative analysis was established, showing the capacity of the developed methodology to detect up to 16 different glycans. Other posttranslational modifications hotspots were characterized while their relative occurrence levels were estimated and compared to biosimilars. These results proved the value of using CESI-MS because the separation selectivity and ionization efficiency provided by the system allowed substantial improvement in the characterization workflow robustness and accuracy. Biosimilarity assessment could be performed routinely with a single injection of each candidate enabling improvements in the biosimilar development pipeline.

Article soumis à droits d'auteur :

Gahoual et al., Monoclonal antibodies biosimilarity assessment using transient isotachopheresis capillary zone electrophoresis-tandem mass spectrometry, mAbs 2014

Article soumis à droits d'auteur :

Gahoual et al., Monoclonal antibodies biosimilarity assessment using transient isotachopheresis capillary zone electrophoresis-tandem mass spectrometry, mAbs 2014

Article soumis à droits d'auteur :

Gahoual et al., Monoclonal antibodies biosimilarity assessment using transient isotachopheresis capillary zone electrophoresis-tandem mass spectrometry, mAbs 2014

Article soumis à droits d'auteur :

Gahoual et al., Monoclonal antibodies biosimilarity assessment using transient isotachopheresis capillary zone electrophoresis-tandem mass spectrometry, mAbs 2014

Article soumis à droits d'auteur :

Gahoual et al., Monoclonal antibodies biosimilarity assessment using transient isotachopheresis capillary zone electrophoresis-tandem mass spectrometry, mAbs 2014

Article soumis à droits d'auteur :

Gahoual et al., Monoclonal antibodies biosimilarity assessment using transient isotachopheresis capillary zone electrophoresis-tandem mass spectrometry, mAbs 2014

Article soumis à droits d'auteur :

Gahoual et al., Monoclonal antibodies biosimilarity assessment using transient isotachopheresis capillary zone electrophoresis-tandem mass spectrometry, mAbs 2014

Article soumis à droits d'auteur :

Gahoual et al., Monoclonal antibodies biosimilarity assessment using transient isotachopheresis capillary zone electrophoresis-tandem mass spectrometry, mAbs 2014

Article soumis à droits d'auteur :

Gahoual et al., Monoclonal antibodies biosimilarity assessment using transient isotachopheresis capillary zone electrophoresis-tandem mass spectrometry, mAbs 2014

Article soumis à droits d'auteur :

Gahoual et al., Monoclonal antibodies biosimilarity assessment using transient isotachopheresis capillary zone electrophoresis-tandem mass spectrometry, mAbs 2014

Article soumis à droits d'auteur :

Gahoual et al., Monoclonal antibodies biosimilarity assessment using transient isotachopheresis capillary zone electrophoresis-tandem mass spectrometry, mAbs 2014

Article soumis à droits d'auteur :

Gahoual et al., Monoclonal antibodies biosimilarity assessment using transient isotachopheresis capillary zone electrophoresis-tandem mass spectrometry, mAbs 2014

Article soumis à droits d'auteur :

Gahoual et al., Monoclonal antibodies biosimilarity assessment using transient isotachopheresis capillary zone electrophoresis-tandem mass spectrometry, mAbs 2014

Article soumis à droits d'auteur :

Gahoual et al., Monoclonal antibodies biosimilarity assessment using transient isotachopheresis capillary zone electrophoresis-tandem mass spectrometry, mAbs 2014

Article soumis à droits d'auteur :

Gahoual et al., Monoclonal antibodies biosimilarity assessment using transient isotachopheresis capillary zone electrophoresis-tandem mass spectrometry, mAbs 2014

Article soumis à droits d'auteur :

Gahoual et al., Monoclonal antibodies biosimilarity assessment using transient isotachopheresis capillary zone electrophoresis-tandem mass spectrometry, mAbs 2014

Article soumis à droits d'auteur :

Gahoual et al., Monoclonal antibodies biosimilarity assessment using transient isotachopheresis capillary zone electrophoresis-tandem mass spectrometry, mAbs 2014

Article soumis à droits d'auteur :

Gahoual et al., Monoclonal antibodies biosimilarity assessment using transient isotachopheresis capillary zone electrophoresis-tandem mass spectrometry, mAbs 2014

Article soumis à droits d'auteur :

Gahoual et al., Monoclonal antibodies biosimilarity assessment using transient isotachopheresis capillary zone electrophoresis-tandem mass spectrometry, mAbs 2014

3. Conclusion

Les travaux présentés dans cette partie détaillent l'application de la méthode de caractérisation par t-ITP CESI-MS/MS pour l'évaluation la biosimilarité entre deux échantillons de mAbs commercialisés et leur candidat biosimilaire respectif. L'objectif de ces travaux était de démontrer la possibilité d'utiliser le couplage entre la CE et la MS pour réaliser une caractérisation avancée des différents échantillons de mAbs et de déceler les éventuelles différences de structures entre un mAb de référence et son candidat biosimilaire. A partir des données générées en une seule injection, les mAbs ont été caractérisés simultanément sur plusieurs aspects composant leur structure primaire : séquence d'acides aminés, glycosylations, PTMs.

Les résultats obtenus concernant la caractérisation de la séquence montrent que, pour chacun des mAbs étudiés, la méthodologie analytique employée permet un recouvrement de séquence de 100% uniquement par l'intermédiaire d'identifications de peptides sans *miscleavages* ni PTMs. La comparaison des données entre trastuzumab et son candidat biosimilaire a mis en évidence une différence d'un unique acide aminé entre les séquences de ces deux protéines. De plus l'excellente qualité spectrale délivrée par le système CESI-MS a permis d'identifier sans ambiguïté que le candidat était composé d'une arginine en position 217 (HC) tandis que trastuzumab possède une lysine pour cette position. Cette différence est rédhibitoire pour le candidat ne pouvant être considéré comme un biosimilaire de trastuzumab conformément aux directives récemment publiées par l'EMA. Dans le cas de l'étude entre cetuximab et son candidat biosimilaire, les données issues de l'analyse CESI-MS/MS ont permis de conclure à une complète similitude entre les deux mAbs concernant cet aspect.

Les glycosylations ont également été caractérisées en utilisant le même set de données. Les données de CESI-MS/MS permettant d'identifier la structure de la glycosylation par l'intermédiaire des spectres de fragmentations, mais aussi d'estimer l'abondance relative de chaque glycanne. Les profils de glycosylation des mAbs originaux ont pu être confrontés à leur candidat biosimilaire respectif.

Les comparaisons de ces profils ont mis en lumière dans le cas de trastuzumab des différences mineures d'abondances relatives même si les glycosylations exprimées se sont avérées communes aux deux mAbs. Dans le cadre de l'étude de la biosimilarité entre cetuximab et son candidat biosimilaire, la méthodologie développée a rendu possible le traitement de chaque site de N-glycosylation indépendamment. Cette caractéristique est particulièrement intéressante pour les mAbs qui comme cetuximab possèdent plusieurs sites de glycosylations. Dans le cas du site présent dans le domaine Fc/2, les données ont montré des différences dans la distribution des glycanes entre les deux protéines. En ce qui concerne

la glycosylation présente dans le domaine Fd du mAb, les données MS/MS ont permis de conclure qu'une partie des glycosylations exprimées n'étaient pas communes aux deux mAbs. Ainsi le profil de glycosylation établi pour le candidat biosimilaire montre que les glycosylations terminée par le motif galactose- α -1,3-galactose sont bien moins abondantes par rapport au profil de cetuximab. Ce type de glycosylation est responsable d'effets secondaires d'hypersensibilité chez certains patients.

Compte tenu de ces résultats, le candidat biosimilaire de cetuximab ne peut être considéré comme étant un biosimilaire de celui-ci. Pour autant les glycosylations exprimées par le candidat indiquent un risque de réaction dû à une hypersensibilité réduit. Ce candidat pourrait donc potentiellement être considéré comme un *biobetter* de cetuximab. On parle de *biobetter* lorsque par exemple le processus de production du mAbs a été amélioré afin de minimiser l'expression d'une des formes du mAbs non satisfaisante ou alors favoriser l'expression de formes dont l'activité est importante. De nombreux travaux de recherches illustrent cette volonté notamment afin d'obtenir un profil de glycosylation optimale (*glyco-engineering*). L'autorisation de mise sur le marché de *biobetter* est également prévue par les directives de l'EMA.

La dernière partie de l'étude de la biosimilarité entre ces différents échantillons concernent les PTMs *hot-spots*. En effet ces modifications influent sur l'immunogénicité du mAb, il convient par conséquent de vérifier que les candidats biosimilaires ne voient pas ces PTMs surexprimées. De la même manière que pour la caractérisation des glycosylations, les PTMs ont pu être identifiées à partir des spectres MS/MS et le degré de modification de l'échantillon au regard de chaque PTM a pu être évalué. Les résultats obtenus ont avant tout permis de caractériser l'ensemble des PTMs d'intérêt pour chacun des échantillons caractérisés par CESI-MS/MS. Notamment la méthodologie utilisant le couplage entre la CE et la MS par l'intermédiaire du système CESI-MS a offert la possibilité de mettre en pratique l'identification d'isomérisation d'acide aspartique ; ainsi chacun des sites potentiels d'isomérisation a montré une isomérisation partielle. Dans le cadre de l'étude de la biosimilarité entre trastuzumab et son biosimilaire, cela démontre que la méthode CESI-MS/MS peut distinguer de faibles variations du niveau de modifications. La possibilité de distinguer ces différences mineures est possible car la CE permet d'obtenir la séparation de ces peptides avant leur transfert dans la source du spectromètre ce qui offre une sensibilité optimale. Les niveaux de modification entre ces deux mAbs se sont avérés relativement proche et n'ont pas suggérer une quelconque sur-modification du candidat biosimilaire.

La même comparaison inscrite dans l'étude entre cetuximab et son candidat biosimilaire ont permis également de mettre en évidence des variations faibles du niveau de modifications. La

comparaison entre les mAbs n'a pas montré de taux de modifications anormalement élevés en ce qui concerne le candidat biosimilaire ce qui a permis de conclure que les deux mAbs pouvaient être considéré comme similaire du point de vue des PTMs.

Les travaux présentés dans cette partie illustrent le niveau de caractérisation pouvant être atteint grâce à la méthodologie t-ITP CESI-MS/MS mise en place. En effet une seule analyse de chaque échantillon, correspondant à une injection de 200 fmol de peptides digérés, a permis d'effectuer la caractérisation complète de la structure primaire des différents anticorps mais également de conclure sur leur biosimilarité au niveau de leur structure primaire. Les données CESI-MS/MS ont permis dans chaque cas, d'identifier les différences entre un mAbs référence et son candidat biosimilaire avec une grande finesse délivrée par le couplage entre la CE et la MS. Les données recueillies ont mis en avant l'aspect du candidat qui n'a pu donner satisfaction dans l'étude de la biosimilarité avec le mAb référence. Ce type d'information est particulièrement intéressant puisqu'il permet d'orienter les activités de R&D devant être mené pour obtenir l'autorisation du candidat ou dans le pire des cas abandonner rapidement un candidat jugé non prometteur, afin de maîtriser les coûts de développement.

La mise en œuvre du couplage entre la CE et la MS a montré au travers de ces travaux son intérêt dans ce type de problématique. La sensibilité délivrée par le couplage CESI-MS et son important rendement d'ionisation génère une excellente qualité spectrale notamment en MS/MS, ce qui se traduit concrètement dans la possibilité d'obtenir pratiquement la totalité des ions y/b pour une molécule aussi complexe qu'un mAb. De plus comme cela est évoqué dans les parties précédentes, la séparation de peptides par CE entraîne la migration de tous les peptides indépendamment de leur structure et évitent la « perte » de certains peptides. Ces deux caractéristiques contribuent à la finesse de la caractérisation et surtout ont permis d'identifier et de caractériser la substitution d'un seule acide aminé. Outre la validation par une étude pratique de cet aspect évoqué à la fin de la partie III, les performances de la méthode ouvrent des perspectives extrêmement intéressantes notamment pour des approches d'analyse protéomique n'utilisant pas de banque de données de protéines pour l'identification, la caractérisation d'erreur de transcription lors de la production de protéines ou encore l'utilisation en tant que méthode orthogonale aux techniques déjà utilisées pour la caractérisation fine des structures de protéines.

L'utilisation du couplage CE-ESI-MS/MS a enfin montré son intérêt pour la caractérisation des glycosylations et autres PTMs. Ces problématiques bénéficient également de la capacité d'ionisation importante du système CESI-MS. Les mécanismes de séparation mises en jeu lors de l'électrophorèse se sont avérés particulièrement intéressant pour séparer des peptides modifiés en raison de l'influence de ces modifications sur la mobilité électrophorétique du

peptide. Il a été ainsi possible de séparer des glycopeptides ayant pour unique différence un galactose. Il en va de même pour des modifications ne donnant pas lieu en RP-LC à la séparation des peptides modifiés de leurs homologues restés intacts tel que la déamidation. L'exemple de l'isomérisation de l'acide aspartique est d'autant plus flagrant que la capacité à séparer ces peptides en CE donne des informations supplémentaires venant augmenter la profondeur de la caractérisation réalisée. La capacité à séparer ces peptides permet de minimiser les effets de suppression d'ions durant l'ionisation, la conséquence directe est une quantification relative dont la justesse et la sensibilité sont intéressantes comme cela a pu être montré dans ces travaux.

La profondeur de la caractérisation pouvant être obtenue par l'intermédiaire de la méthodologie t-ITP CESI-MS/MS développée dans ces travaux de thèse ne s'applique pas uniquement aux mAbs et d'un point de vue théorique les mêmes caractéristiques peuvent permettre d'améliorer le degré de caractérisation atteint dans d'autre problématique tel que la protéomique quantitative ou encore la métabolomique.

Conclusion générale et perspectives

The CESI-MS system (CESI8000) is a recently developed instrument allowing the coupling of capillary electrophoresis (CE) to electrospray ionization mass spectrometry (ESI-MS). The aim of the research work is to implement a CE-MS methodology, using the CESI-MS system, for the comprehensive characterization of proteins and the analysis of biological samples. Such work intended to demonstrate the interest of using an electrokinetically driven separation prior to the MS analysis in complementarity with already applied methodologies.

In the first part of this work, the electrospray generated by the mean of the CESI-MS system was characterized. Results demonstrated that the system is able to produce a stable nanoESI even in the case of flow rate as low as 4 nL/min. Plus, the sample injection system which equips the CE showed to deliver a fully controlled and reproducible injection flow rate. The system was then used a nanoESI platform infusion for the study of intact proteins and noncovalent complexes in native MS. Study of the sensitivity of the signal depending on the sample infusion flow rate proved the possibility to improve significantly the sensitivity of the MS signal as well as the signal/noise ratio even in the case of native MS. The system proved its ability, while infusing the sample using nano flow rates, to keep the conformation of intact proteins and complexes structured by noncovalent interactions in native MS.

The use of the system as a nanoESI infusion platform allowed the observation of high molecular masses noncovalent complexes demonstrating the interest of this instrumental approach. Indeed the forms of 6-mers, 12-mers and 18-mers of haemocyanins could be observed, those complexes having respectively masses of 445 kDa, 900 kDa and 1.34 MDa. While allowing to reduce greatly the sample consumption for each acquisition.

The system was used to perform the characterization of a monoclonal antibody (mAb) simultaneously over different levels defining its structure. A CE-ESI-MS/MS method was therefore developed for the characterization of trastuzumab (Herceptin®, Roche). The strategy adopted to perform the characterization is derived from a bottom-up proteomic approach; the sample was digested by trypsin and the digest was separated and analyzed by CESI-MS/MS. Results demonstrated that the analysis of a single injection, corresponding to 100 fmol of digested to obtain 100% amino acid sequence characterization of the mAb demonstrating for the first time the complete sequence coverage in a single digestion. Data from the same analysis allowed, in addition to amino acid sequence characterization, to characterized posttranslational modifications (PTMs) including glycosylations. Results proved that the developed method allowed to obtain the characterization in case of amino acid PTMs of the

modified peptides and its intact equivalent by using the fragmentation spectra. MS/MS spectra could provide as well the structural characterization of the 5 major glycosylations potentially present on trastuzumab by showing the fragmentation of the glycan. Those results demonstrate that the electrophoretic separation of the CE allows to induce the separation and correct transfer to the mass spectrometer of peptides regardless of their structure in a systematic manner, which partly explains the complete sequence coverage.

The obtained results proved that the characteristic of the CE (sample loading, peak capacity) are compatible to the coupling with electrospray ionization MS, the sensitivity of the CESI-MS system was even suggested from those experiments.

In order to demonstrate the robustness of the characterization performed using the CESI-MS coupling, four different mAbs have been studied using a similar methodology. The aim was to characterize simultaneously the different aspects defining the primary structure of the protein, in a single injection. Transient isotachopheresis (t-ITP) was introduced as a pre-concentration technique for the characterization, that pre-concentration step allows to increase the efficiency of the separation. Results obtained demonstrated the ability of the CE-ESI-MS/MS method developed to deduce the complete characterization of the amino acid sequence using a single digestion. Improvement of the method allowed to perform the amino acid sequence characterization only through the identification of digested peptides without miscleavages or posttranslational modifications. The amino acids sequence characterization gave similar results for each mAb studied and technical replicates was also prepared demonstrating the robustness of the methodology. The ionization efficiency provided by the CESI-MS system proved its capabilities as well. Indeed the study of the fragmentation spectra demonstrated the possibility to identify systematically more than 70% of the y/b fragment ions and even more than 90% in favorable cases. The identification of a large number of fragment ions was particularly interesting as it increase the confidence of the peptide identifications on one hand, and on the other hand gives precious information of the amino acids sequence exact order. The resulted in the possibility in the case of trastuzumab to deduce the exact amino acids succession completely for the variable domain of this mAb.

The glycoforms of those mAbs were characterized, in this case the structural characterization was completed by the semiquantitative analysis of the glycoforms. The results obtained demonstrated the possibility to identify systematically more than a dozen glycoforms; in the case of trastuzumab 16 different glycosylations could be identified, some of them containing sialic acid. The results of the relative distribution demonstrated the capacity of the CE-ESI-MS/MS methodology to characterize simultaneously glycoforms which abundances are extremely different revealing the sensitivity and appropriateness of the method regarding this

aspect of the characterization. Despite the ionization efficiency of the coupling, the sensitivity obtained regarding this particular aspect of the protein was also supported by the fact that CE separation allowed to obtain the partial separation of the different glycopeptides. Glycopeptides having a difference of one galactose could be completely separated while a difference one fucose led to a partial separation. Those characteristics participate to the sensitivity and accuracy of the relative quantitation as those peptides if not separated could induce competition during the ionization process. Also the CESI-MS/MS developed as it does not induce glycan release prior to MS analysis permits, in the case of several glycosylation sites which is the case of cetuximab (Erbix®[®], Merck KgaA), to distinguish during the characterization each glycosylation sites.

PTMs hot-spots were also characterized using the CESI-MS/MS data. Results demonstrated the possibility to characterize every single hot-spots for each mAb studied. The identification of also the totality of the y/b fragments ions was in that case informative and allow the precise identification of the amino acid concerned by the modification and the possibility to characterize several modifications experienced by the same digested peptide. The study of the impact of the separation selectivity provided by the CE demonstrated the pertinence of using an electrophoretic separation prior to the MS analysis. Digested peptides experiencing modifications could be consistently separated from their unmodified homologous. Separation proved to be more important for modifications impacting greatly the electrophoretic mobility of the peptide: N-terminal glutamic acid cyclization induced separation of several minutes while a deamidated asparagine involved a separation of 0.5 minutes. However all the modifications studied induced a separation of the peptides during the electrophoresis. Especially the separation of peptides containing different isomers of aspartic acid could be demonstrated which was explained by a change of a hydrodynamic radius of the peptide due to the different conformation of aspartic acid thus inducing a variation of the electrophoretic mobility. In the context of the primary structure characterization, such selectivity is particularly interesting because aspartic acid isomerization cannot be separated in reverse phase liquid chromatography and cannot be identified by MS using a time-of-flight (TOF) analyzer. The separation provided by the CE enabled the identification of this particular modification and therefore allows to expand the level of the characterization.

Results obtained on the different mAbs demonstrated the comprehensive characterization of the primary structure of mAbs in a single t-ITP CESI-MS/MS analysis. They demonstrated the variety of aspect of the glycoprotein which can be characterized using the developed methodology. The performance in term of characterization level and sensitivity proved to challenge already applied method designated for specific characteristics, while in this case performed in an overall characterization of the protein. The developed method proved finally

to be fully adequate as a characterization tool which can be used as an orthogonal method to already routinely applied methods.

The characterization using CE coupled to ESI-MS was then applied to the complex problematic that represents biosimilarity assessment. Due to the structural complexity and variability of mAbs, biosimilars as “bio-generic” versions of a marketed mAbs, needs to go through extensive analytical characterization in order to demonstrate the similarity between the marketed mAb and the biosimilar candidate. The research work focused on the application of the designed methodology by t-ITP CESI-MS/MS to evaluate the similarity of trastuzumab and cetuximab to their respective biosimilar candidate. The objectives were to point potential differences between the reference mAb and its biosimilar candidate and to evaluate if the method allows to characterize precisely the nature of this difference included in the overall characterization of the primary structure of the mAb.

The characterization of the amino acids sequences were performed and compared. In the case of trastuzumab, results allowed to obtain 100% sequence coverage in a single analysis and enabled to distinguish a difference of only one amino acid between trastuzumab and its biosimilar candidate. Thus the nature of that difference could be precisely characterized from the CESI-MS/MS data and the substitution of a lysine as an arginine could be unraveled. From a regulatory point of view, such difference would lead to the immediate rejection of the candidate to be considered as a biosimilar. In the case of cetuximab, the single analysis of both sample by CESI-MS/MS allowed to attest the complete similarity of the biosimilar candidate regarding the sequence.

Glycoforms were characterized regarding their structure and abundance and glyco-profiling established confronted in the context of the biosimilarity study. Results obtained from the same CESI-MS/MS data allowed in each case to characterize the structure of a consequent number of glycans. In the case of trastuzumab, results showed that the glycans exhibited by both were similar regarding their structure while it was possible to distinguish minor variations of the distribution of the glycoforms. In the case of cetuximab which possess two different glycosylation sites, each one of them could be considered independently enabling to determinate the glycan diversity and relative abundance depending on the N-glycosylation sites for biosimilarity assessment. In the case of the Fc glycosylation, results demonstrated as well the capacity of the CESI-MS/MS method to distinguish minor differences in relative abundances from cetuximab's biosimilar candidate while eliminating the expression of glycosylation capped by a galactose- α -1,3-galactose which can induce undesired side-effects in the case of hypersensitivity. Concerning the Fd glycosylation sites, confrontation of the CESI-MS/MS data allowed to determine that glycan expressed were significantly different

between the reference mAb and the candidate biosimilar which opposed to the acceptance of the candidate as a biosimilar of cetuximab. The candidate exhibited the reduction of the expression of glycan capped by a galactose- α -1,3-galactose, a significant proportion (about 22%) of glycans containing N-acetylneuraminic acid (NANA) could also be detected. As the biosimilar candidate was satisfying regarding the previous aspect of the protein structure, the reduction of the expression of glycans containing NANA because it is undesired could potentially lead to the approval of that candidate as a biobetter of cetuximab.

Finally PTMs hot-spots were studied and modification degree were evaluated and compared in order to verify that biosimilar candidates did not exhibit over modifications which could negatively impact the activity of the protein. Each PTMs hot-spots could be successfully characterize and modification degrees could be evaluate. The ability, implied by the use of CE for the method, to separate modified peptides from their intact analogue demonstrated its full potential. The separation of those peptides has permit to avoid competition during the ionization process which would occur in the case of co-migration thus enabling to obtain the best accuracy as well as sensitivity when evaluating the modification degrees. In the case of both biosimilarity studies, results of the CESI-MS/MS demonstrated its ability to distinguish minor variations in the modification levels however the comparisons performed did not showed significant difference between reference mAbs and their respective biosimilar candidate.

Results presented in a comprehensive manner proved unambiguously that the t-ITP CESI-MS/MS methodology designed for the characterization of the primary structure of mAbs is able to assess the biosimilarity between a reference mAb and a biosimilar candidate. In addition to biosimilarity assessment, CESI-MS/MS data from a single injection of each sample, allowed to point out specifically the aspect of the candidate which was found to be significantly different. Those precious information could help guiding the R&D activity or eliminate ahead unsatisfactory candidates.

The research work achieved during the Ph.D. fellowship demonstrated successfully the interest of using an electrokinetically driven separation prior to the analysis by MS as an alternative to the chromatographic separation which is the actual standard method. The identification of some peptides may be problematic when using reverse phase liquid chromatography: small peptides (1-4 amino acids), hydrophilic peptides and a minor extend peptides having important molecular masses. The use of the CE proved its efficiency for separating and transferring to the MS a wide variety of peptides regardless from their chemical structure which resulted in the possibility to obtain 100% sequence coverage for several mAbs in a single injection. In addition, the spectral quality delivered by the intermediate of the CESI-

MS coupling demonstrated the possibility to record a lot of information enriching the characterization performed.

The pertinence of using an electrophoretic separation was also demonstrated for the characterization of PTMs. In the case of the glycosylation, the separation of the peptides with different glycans guarantees the best sensitivity during the ionization by preventing ion suppression. That explains the sensitivity of the characterization and the possibility to detect in the same analysis glycans having huge differences regarding their abundance. The interest of using an electrophoretic separation was even clearer when studying chemical modifications of amino acids. The separation demonstrated its capacity to separate peptides experiencing faint modifications. That trend is exacerbated by the separation of peptides showing aspartic acid isomerization. The separation of peptides based on their modification once more explains the sensitivity obtained in the context of the characterization of PTMs and gives the opportunity to estimate the occurrence levels of such modifications.

The different studies treated in this thesis work proves that the CESI-MS coupling is able to deliver robust and highly sensitive analysis by CE-ESI-MS/MS. The interfacing system is definitely promising and in a more general manner shall renew the interest of the scientific community for that type of hyphenation. Regarding the perspectives of such instrumental approach, it is necessary to demonstrate the robustness and power of the methodology developed during this thesis for the primary structure of proteins in a wider manner. The work presented is focused on mAbs characterization however the use of this methodology should be evaluated in the case of more complicated problematic such as the characterization of protein in complex mixtures or developing analytical strategies not relying on theoretical amino acids sequence databases. Indeed the impressive spectra quality delivered by the coupling, especially in MS/MS should be able to push forward the level of characterization obtained even in an untargeted environment. In this work, the characterization of PTMs was only compared to other analytical techniques as an indication. It is necessary to evaluate in a more comprehensive approach the performance of the designed CESI-MS/MS methodology compared to other analytical techniques in order to determine and validate the accuracy, sensitivity and robustness of the relative quantification of PTMs established by CESI-MS/MS. Plus, it would be interesting to diversify the nature of the PTMs studied.

The use of the CESI-MS coupling for bottom-up proteomic analysis of complex mixtures was only briefly treated in this work. It would be interesting to compare in an extensive manner how the use of an electrophoretic separation prior to the MS analysis can improve the characterization of the sample regarding to separation selectivity. An approach based on a crossed analysis of highly complex samples by both nanoLC-MS/MS and CESI-MS/MS could

demonstrate the complementarity of both techniques. That could improve the characterization level of the overall sample offering opportunities to understand farther the sample studied. Plus, the work already achieved during this thesis demonstrated the ability using CESI-MS to detect more peptides which population demonstrated to be more diversified also. That observation indicates that the use of a CESI-MS/MS is promising for quantitative proteomics as well. The possibility to detect more peptides is clearly interesting and gives more possibilities to perform the quantification, that perspective should be confirmed by a comprehensive evaluation. In addition, the sensitivity provided by the CESI-MS system should be advantageous in the context of quantitative proteomic analysis.

For now the CESI-MS coupling was only used in capillary zone electrophoresis mode, it would be interesting to explore as much as possible alternative electrophoretic separating mode or the use of coatings in order to determine if other electrophoretic modes are compatible to the CESI-MS system. Using an alternative separation mode would allow to diversify the type of biological analytes which could be characterized by CE-ESI-MS. For example, the separation of intact proteins is particularly interesting and the possibility to separate different mixtures of intact proteins prior to the MS analysis would be a huge asset for the development of the coupling, especially considering the technical progress recently achieved in top-down mass spectrometry.

Liste des communications scientifiques

Publications avec comité de lecture

1. **Novel sheathless CE-MS interface as an original and powerful infusion platform for nanoESI study: from intact proteins to high molecular mass noncovalent complexes**

Rabah Gahoual, Jean-Marc Busnel, Philippe Wolff, Yannis Nicolas François, Emmanuelle Leize-Wagner, *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 2014, 406(4), 1029-1038.

2. **Rapid and multi-level characterization of trastuzumab using sheathless capillary electrophoresis-tandem mass spectrometry**

Rabah Gahoual, Alicia Burr, Jean-Marc Busnel, Lauriane Kuhn, Phillippe Hammann, Alain Beck, Yannis Nicolas François, Emmanuelle Leize-Wagner., *mAbs* 2013, 5(3), 479-490.

3. **Full antibody primary structure and micro-variant characterization in a single injection using transient isotachopheresis and sheathless capillary electrophoresis – tandem mass spectrometry**

Rabah Gahoual, Jean-Marc Busnel, Alain Beck, Yannis-Nicolas François, Emmanuelle Leize-Wagner, *Analytical Chemistry* 2014, accepted.

4. **Monoclonal antibodies biosimilarity assessment using transient isotachopheresis capillary zone electrophoresis-tandem mass spectrometry**

Rabah Gahoual, Michaël Biacchi, Johana Chicher, Lauriane Kuhn, Phillippe Hammann, Alain Beck, Emmanuelle Leize-Wagner, Yannis-Nicolas François, *mAbs* 2014, accepted.

Communications orales

- **Monoclonal antibodies complete primary structure and biosimilarity assessment in a single analysis using sheathless capillary electrophoresis-tandem mass spectrometry**

Rabah Gahoual, Jean-Marc Busnel, Johana Chicher, Lauriane Kuhn, Phillippe Hammann, Alain Beck, Yannis-Nicolas François, Emmanuelle Leize-Wagner, *International Mass Spectrometry Conference 2014*, Geneva, Switzerland

- **Novel sheathless CE-MS interface as an original and powerful infusion platform for nanoESI study: from intact proteins to high molecular mass noncovalent complexes**
Rabah Gahoual, Jean-Marc Busnel, Phillippe Wolff, Yannis-Nicolas François, Emmanuelle Leize-Wagner, *International Workshop on Native Mass spectrometry 2014*, Strasbourg, France
- **Contribution of capillary electrophoresis coupled to mass spectrometry for proteomic analysis : application to the study of yeast mitochondrial proteome**
Rabah Gahoual, Jean-Marc Busnel, Johana Chicher, Lauriane Kuhn, Philippe Hammann, Yannis-Nicolas François, Emmanuelle Leize-Wagner, *European Proteome Association symposium 2013*, Saint-Malo, France
- **Rapid and multi-level characterization of trastuzumab using sheathless capillary electrophoresis-tandem mass spectrometry**
Rabah Gahoual, Alicia Burr, Jean-Marc Busnel, Lauriane Kuhn, Philippe Hammann, Alain Beck, Yannis-Nicolas François, Emmanuelle Leize-Wagner, *Journée des doctorants de l'université de Strasbourg 2013*, Strasbourg, France
- **Simultaneous peptide mapping, posttranslational modifications and major N-glycosylation characterization of trastuzumab by sheathless capillary electrophoresis - tandem mass spectrometry**
Rabah Gahoual, Alicia Burr, Jean-Marc Busnel, Lauriane Kuhn, Philippe Hammann, Alain Beck, Yannis-Nicolas François, Emmanuelle Leize-Wagner, *HPLC symposium 2013*, Amsterdam, Netherlands
- **Simultaneous peptide mapping, posttranslational modifications and major N-glycosylation characterization of trastuzumab by sheathless capillary electrophoresis - tandem mass spectrometry**
Rabah Gahoual, Alicia Burr, Jean-Marc Busnel, Lauriane Kuhn, Philippe Hammann, Alain Beck, Yannis-Nicolas François, Emmanuelle Leize-Wagner, *Congrès de la société française de sciences séparatives SEP 2013*, Paris, France
- **Multi-level characterization of trastuzumab using sheathless capillary electrophoresis-tandem mass spectrometry**
Rabah Gahoual, Alicia Burr, Jean-Marc Busnel, Lauriane Kuhn, Philippe Hammann, Alain Beck, Yannis-Nicolas François, Emmanuelle Leize-Wagner, *Microscale Bioseparation symposium 2013*, Charlottesville, USA
- **Sheathless capillary electrophoresis : a novel infusion platform for nanoESI study from intact proteins to high molecular mass noncovalent complexes**
Rabah Gahoual, Phillippe Wolff, Yannis-Nicolas FRANCOIS, Emmanuelle LEIZE-WAGNER, *Rencontres du GRK Franco-Allemand 2012*, Strasbourg, France

- **CESI – MS : A major advance in CE - MS coupling**
Rabah Gahoual, Yannis-Nicolas FRANCOIS, Emmanuelle LEIZE-WAGNER, *Club de chromatographie du Val de Seine 2013*, Rouen, France
- **Sheathless capillary electrophoresis : a novel infusion platform for nanoESI study from intact proteins to high molecular mass noncovalent complexes**
Rabah Gahoual, Philippe Wolff, Yannis-Nicolas FRANCOIS, Emmanuelle LEIZE-WAGNER, *Rencontres du club jeune de la Société Française de Spectrométrie de Masse 2012*, La Bresse, France

Communications par affiche

- **Monoclonal antibodies complete primary structure and biosimilarity assessment in a single analysis using transient isotachopheresis sheathless capillary electrophoresis-tandem mass spectrometry**
Rabah Gahoual, Jean-Marc Busnel, Johana Chicher, Lauriane Kuhn, Philippe Hammann, Alain Beck, Yannis-Nicolas François, Emmanuelle Leize-Wagner, *American Society for Mass Spectrometry conference 2014*, Baltimore, USA
- **Simultaneous peptide mapping, posttranslational modifications and major N-glycosylation characterization of trastuzumab by sheathless capillary electrophoresis - tandem mass spectrometry**
Rabah Gahoual, Alicia Burr, Jean-Marc Busnel, Lauriane Kuhn, Philippe Hammann, Alain Beck, Yannis-Nicolas François, Emmanuelle Leize-Wagner, *American Society for Mass Spectrometry conference 2013*, Minneapolis, USA
- **Evaluation of Sheathless Capillary Electrophoresis as an Infusion Platform for the NanoESI Study of Intact Proteins and Non-Covalent Complexes**
Rabah Gahoual, Philippe Wolff, Yannis-Nicolas FRANCOIS, Emmanuelle LEIZE-WAGNER, *Congrès de la Société Française de Spectrométrie de Masse 2012*, Orléans, France
- **Evaluation of Sheathless Capillary Electrophoresis as an Infusion Platform for the NanoESI Study of Intact Proteins and Non-Covalent Complexes**
Rabah Gahoual, Philippe Wolff, Yannis-Nicolas FRANCOIS, Emmanuelle LEIZE-WAGNER, *International symposium on Electro and liquid phase separation techniques (ITP) 2012*, Baltimore, USA
- **Evaluation of Sheathless Capillary Electrophoresis as an Infusion Platform for the NanoESI Study of Intact Proteins and Non-Covalent Complexes**

Rabah Gahoual, Philippe Wolff, Yannis-Nicolas FRANCOIS, Emmanuelle LEIZE-WAGNER, *American Society for Mass Spectrometry conference 2012*, Vancouver, Canada

Enseignement délivrés en tant que moniteur (Université de Strasbourg)

Année universitaire 2012 – 2013

- Travaux dirigés module « chromatographies » (niveau Licence 3)
- Travaux dirigés module « spectrométrie de masse » (niveau Licence 3)
- Travaux dirigés module « mise au point de protocoles analytiques » (niveau Licence 3)
- Travaux pratiques « chimie analytique » (niveau Master 1)

Année universitaire 2013 – 2014

- Travaux dirigés module « chromatographies » (niveau Licence 3)
- Travaux dirigés module « spectrométrie de masse » (niveau Licence 3)
- Travaux dirigés module « mise au point de protocoles analytiques » (niveau Licence 3)
- Travaux pratiques « chimie analytique » (niveau Master 1)

Annexes

Annexe 1 : listing des anticorps monoclonaux thérapeutiques

International non-proprietary name	Trade name	Type	Indication first approved	EU (US) approval year
Muromonab-CD3	Orthoclone Okt3	Anti-CD3; Murine IgG2a	Reversal of kidney transplant rejection	1986 (1986)
Abciximab	Reopro	Anti-GPIIb/IIIa; Chimeric IgG1 Fab	Prevention of blood clots in angioplasty	1995 (1994)
Rituximab	MabThera, Rituxan	Anti-CD20; Chimeric IgG1	Non-Hodgkin's lymphoma	1998 (1997)
Basiliximab	Simulect	Anti-IL2R; Chimeric IgG1	Prevention of kidney transplant rejection	1998 (1998)
Daclizumab	Zenapax	Anti-IL2R; Humanized IgG1	Prevention of kidney transplant rejection	1999 (1997)
Palivizumab	Synagis	Anti-RSV; Humanized IgG1	Prevention of respiratory syncytial virus infection	1999 (1998)
Infliximab	Remicade	Anti-TNF α ; Chimeric IgG1	Crohn disease	1999 (1998)
Trastuzumab	Herceptin	Anti-HER2; Humanized IgG1	Breast cancer	2000 (1998)
Gemtuzumab ozogamicin	Mylotarg	Anti-CD33; Humanized IgG4	Acute myeloid leukemia	(2000)
Alemtuzumab	MabCampath, Campath-1H	Anti-CD52; Humanized IgG1	Chronic myeloid leukemia	2001 (2001)
Adalimumab	Humira	Anti-TNF; Human IgG1	Rheumatoid arthritis	2003 (2002)
Tositumomab-I131	Bexxar	Anti-CD20; Murine IgG2a	Non-Hodgkin lymphoma	(2003)
Efalizumab	Raptiva	Anti-CD11a; Humanized IgG1	Psoriasis	2004 (2003)
Cetuximab	Erbix	Anti-EGFR; Chimeric IgG1	Colorectal cancer	2004 (2004)
Ibritumomab tiuxetan	Zevalin	Anti-CD20; Murine IgG1	Non-Hodgkin's lymphoma	2004 (2002)
Omalizumab	Xolair	Anti-IgE; Humanized IgG1	Asthma	2005 (2003)

Bevacizumab	Avastin	Anti-VEGF; Humanized IgG1	Colorectal cancer	2005 (2004)
Natalizumab	Tysabri	Anti- α 4 integrin; Humanized IgG4	Multiple sclerosis	2006 (2004)
Ranibizumab	Lucentis	Anti-VEGF; Humanized IgG1 Fab	Macular degeneration	2007 (2006)
Panitumumab	Vectibix	Anti-EGFR; Human IgG2	Colorectal cancer	2007 (2006)
Eculizumab	Soliris	Anti-C5; Humanized IgG2/4	Paroxysmal nocturnal hemoglobinuria	2007 (2007)
Certolizumab pegol	Cimzia	Anti-TNF; Humanized Fab, pegylated	Crohn disease	2009 (2008)
Golimumab	Simponi	Anti-TNF; Human IgG1	Rheumatoid and psoriatic arthritis, ankylosing spondylitis	2009 (2009)
Canakinumab	Ilaris	Anti-IL1 β ; Human IgG1	Muckle-Wells syndrome	2009 (2009)
Catumaxomab	Removab	Anti-EPCAM/CD3; Rat/mouse bispecific mAb	Malignant ascites	2009
Ustekinumab	Stelara	Anti-IL12/23; Human IgG1	Psoriasis	2009 (2009)
Tocilizumab	RoActemra, Actemra	Anti-IL6R; Humanized IgG1	Rheumatoid arthritis	2009 (2010)
Ofatumumab	Arzerra	Anti-CD20; Human IgG1	Chronic lymphocytic leukemia	2010 (2009)
Denosumab	Prolia	Anti-RANK-L; Human IgG2	Bone Loss	2010 (2010)
Belimumab	Benlysta	Anti-BLyS; Human IgG1	Systemic lupus erythematosus	2011 (2011)
Ipilimumab	Yervoy	Anti-CTLA-4; Human IgG1	Metastatic melanoma	2011 (2011)
Brentuximab vedotin	Adcetris	Anti-CD30; Chimeric IgG1; immunoconjugate	Hodgkin lymphoma, systemic anaplastic large cell lymphoma	2012 (2011)
Pertuzumab	Perjeta	Anti-HER2; humanized IgG1	Breast Cancer	2013 (2012)
Raxibacumab	(Pending)	Anti-B. anthraxis PA; Human IgG1	Anthrax infection	(2012)
Trastuzumab emtansine	Kadcyla	Anti-HER2; humanized IgG1; immunoconjugate	Breast cancer	2013 (2013)
Vedolizumab	Entyvio	Anti- α 4 β 7 integrin; humanized IgG1	Ulcerative colitis, Crohn disease	2014 (2014)

Ramucirumab	Cyramza	Anti-VEGFR2; Human IgG1	Gastric cancer	In review (2014)
Obinutuzumab	Gazyva	Anti-CD20; Humanized IgG1; Glycoengineered	Chronic lymphocytic leukemia	In review (2013)
Siltuximab	Sylvant	Anti-IL-6; Chimeric IgG1	Castleman disease	In review (2014)
Secukinumab	(Pending)	Anti-IL-17a; Human IgG1	Immunosuppression	In review (In review)
Nivolumab	(Pending)	Anti-PD1; Human IgG4	Melanoma	[Approved in Japan]
Pembrolizumab	(Pending)	Anti-PD1; Humanized IgG4	Melanoma	In review (In review)
Dinutuximab	(Pending)	Anti-GD2; Chimeric IgG1	Neuroblastoma	In review

Source : mAbs journal (July 2014)

Annexe 2 : poster présenté à l'ASMS 2012



**BECKMAN
COUNTER**

Evaluation of Sheathless Capillary Electrophoresis as an Infusion Platform for the NanoESI Study of Intact Proteins and Non-Covalent Complexes



**BECKMAN
COUNTER**



OptiMS CESI Interface



The OptiMS CESI interface is a fully automated, modular, and compact system for the study of intact proteins and non-covalent complexes. It features a sheathless capillary electrophoresis (CE) interface that allows for the direct infusion of samples into the electrospray ionization (ESI) source. The system is designed to be easy to use and maintain, with a focus on high performance and reliability.

Structural and Cationic



Structural and cationic analysis of proteins and complexes. The system allows for the study of protein structure and charge state distribution. The use of a sheathless interface enables the study of intact proteins and non-covalent complexes, providing high resolution and sensitivity.

Accurate Mass of Protein



Accurate mass measurement of proteins and complexes. The system provides high resolution and accuracy, allowing for the identification of protein species and the study of non-covalent complexes. The use of a sheathless interface enables the study of intact proteins and non-covalent complexes, providing high resolution and sensitivity.

ESI MS methods and improved ESI conditions



ESI MS methods and improved ESI conditions. The system allows for the study of protein structure and charge state distribution. The use of a sheathless interface enables the study of intact proteins and non-covalent complexes, providing high resolution and sensitivity.

Protein elution - liquid chromatography analysis



Protein elution - liquid chromatography analysis. The system allows for the study of protein structure and charge state distribution. The use of a sheathless interface enables the study of intact proteins and non-covalent complexes, providing high resolution and sensitivity.

ESI MS methods and improved ESI conditions



ESI MS methods and improved ESI conditions. The system allows for the study of protein structure and charge state distribution. The use of a sheathless interface enables the study of intact proteins and non-covalent complexes, providing high resolution and sensitivity.

ESI MS methods and improved ESI conditions



ESI MS methods and improved ESI conditions. The system allows for the study of protein structure and charge state distribution. The use of a sheathless interface enables the study of intact proteins and non-covalent complexes, providing high resolution and sensitivity.

ESI MS methods and improved ESI conditions



ESI MS methods and improved ESI conditions. The system allows for the study of protein structure and charge state distribution. The use of a sheathless interface enables the study of intact proteins and non-covalent complexes, providing high resolution and sensitivity.

ESI MS methods and improved ESI conditions



ESI MS methods and improved ESI conditions. The system allows for the study of protein structure and charge state distribution. The use of a sheathless interface enables the study of intact proteins and non-covalent complexes, providing high resolution and sensitivity.

ESI MS methods and improved ESI conditions



ESI MS methods and improved ESI conditions. The system allows for the study of protein structure and charge state distribution. The use of a sheathless interface enables the study of intact proteins and non-covalent complexes, providing high resolution and sensitivity.

ESI MS methods and improved ESI conditions



ESI MS methods and improved ESI conditions. The system allows for the study of protein structure and charge state distribution. The use of a sheathless interface enables the study of intact proteins and non-covalent complexes, providing high resolution and sensitivity.

ESI MS methods and improved ESI conditions



ESI MS methods and improved ESI conditions. The system allows for the study of protein structure and charge state distribution. The use of a sheathless interface enables the study of intact proteins and non-covalent complexes, providing high resolution and sensitivity.

ESI MS methods and improved ESI conditions



ESI MS methods and improved ESI conditions. The system allows for the study of protein structure and charge state distribution. The use of a sheathless interface enables the study of intact proteins and non-covalent complexes, providing high resolution and sensitivity.

Abstract

The sheathless capillary electrophoresis (CE) interface is a fully automated, modular, and compact system for the study of intact proteins and non-covalent complexes. It features a sheathless capillary electrophoresis (CE) interface that allows for the direct infusion of samples into the electrospray ionization (ESI) source. The system is designed to be easy to use and maintain, with a focus on high performance and reliability.

Keywords: sheathless capillary electrophoresis, nanoESI, intact proteins, non-covalent complexes, high resolution, sensitivity.

Annexe 3 : poster présenté à l'ASMS 2013



Philippe Escabi



BECKMAN
COUNTER

Simultaneous peptide mapping, posttranslational modifications and major N-glycosylation characterization of trastuzumab by sheathless capillary electrophoresis-tandem mass spectrometry



Philippe Escabi, Anne-Sophie Lecoq, Lucie de Koven, Fabrice Verrier, et al. Institut de Chimie Analytique, Université de Caen, France



Philippe Escabi, Anne-Sophie Lecoq, Lucie de Koven, Fabrice Verrier, et al. Institut de Chimie Analytique, Université de Caen, France

Major N-glycosylation structural characterization



Using the same data, structural characterization of the 5 major N-glycosylation of trastuzumab could be achieved

Comparison: In-house 6-glycosyl analysis



Contrastless and perspective

Complete sequence characterization



100% on heavy chain, 100% on light chain

Complete sequence coverage obtained using only one analysis by developed CSE-MS/MS method

PTMs heptapeptide characterization



Complete characterization of PTMs heptapeptide simultaneously to sequence characterization

Oxidation



N-linked



S-nitrosylation



Amino acid oxidation



Annexe 4 : poster présenté à l'ASMS 2014



Monoclonal antibodies primary structure and biosimilarity assessment in a single analysis using transient isotachopheresis sheathless capillary electrophoresis-tandem mass spectrometry



France, Toulouse





Monoclonal antibodies primary structure and biosimilarity assessment in a single analysis using transient isotachopheresis sheathless capillary electrophoresis-tandem mass spectrometry



France, Toulouse



Objectives

Develop a single analysis method for the primary structure and biosimilarity assessment of monoclonal antibodies (mAbs) using transient isotachopheresis sheathless capillary electrophoresis-tandem mass spectrometry (TISE-SCX-MS/MS).

Methods

The method involves the simultaneous analysis of the primary structure and glycosylation of mAbs using TISE-SCX-MS/MS. The primary structure is determined by the analysis of the amino acid sequence, and the glycosylation is determined by the analysis of the glycan composition.

Results

The method was applied to the analysis of 15 glycoforms of a monoclonal antibody. The results show that the method is capable of identifying all the glycoforms and their relative proportions. The method is also capable of identifying the primary structure of the antibody and its biosimilarity to the reference product.

Results

100% sequence coverage for monoclonal antibodies (mAbs).

AA difference characterized for monoclonal antibodies.

Transomeric glycosylation profiles comparison.

Conclusions

Different glycoforms characterized between reference and biosimilar mAbs containing sialic acid.

Results

15 glycoforms structures characterized.

Glycoforms distribution comparison for biosimilarity.

27 mAb test-samples characterized by structure and glycosylation.

MS/MS based approach of peptides with TISE.

MS/MS based approach of peptides with TISE.

Conclusions

Different glycoforms characterized between reference and biosimilar mAbs containing sialic acid.

Results

100% sequence coverage for monoclonal antibodies (mAbs).

AA difference characterized for monoclonal antibodies.

Transomeric glycosylation profiles comparison.

Conclusions

Different glycoforms characterized between reference and biosimilar mAbs containing sialic acid.

Annexe 5 : Résumé présenté à MSB 2013

Résumé présenté au symposium Microscale Bioseparation 2013 (Charlottesville, USA)

Multi-level characterization of trastuzumab using sheathless capillary electrophoresis-tandem mass spectrometry

Since 1986 and the approbation of Muromonab-CD3 by the Food and Drug Administration (FDA), monoclonal antibodies (mAbs) have taken a major market share in the pharmaceutical industry and their development is constantly increasing. mAbs are highly complex proteins that display a wide range of microheterogeneity that requires multiple analytical methods for full structure assessment and quality control. As a consequence, the characterization of mAbs on different level is particularly product and time-consuming. Among the appropriate methods used to characterize therapeutic mAbs, mass spectrometry (MS) has taken a major role as it provides a significant specificity as well as sensitivity and provides structural information. Additionally to MS, mAbs characterization requires a whole panel of orthogonal methods to cover a full range of various structural information.

A novel sheathless CE-ESI-MS platform, referred as CESI-MS, allowing hyphenation of capillary electrophoresis (CE) to electrospray ionization mass spectrometry (ESI-MS) has been developed by Beckman Coulter. This CESI prototype uses a bare fused silica capillary whose outlet has been etched using hydrofluoric acid making it porous to the electrical transport of small ions without permitting any other significant matter transfer through the pores. The porous tip provides electrical contact by mean of a second capillary.

In this work, the CESI-MS system has been used to develop a CE-MS/MS method allowing realizing a fast and precise characterization of a mAb digest. Gennaro *et al.* demonstrated the possibility to use CESI-MS to improve the peptide mapping of a mAb in peptide mass fingerprinting (PMF). In our work, the CESI-MS/MS system was used to identify the digested peptides on both their masses but also their fragmentation products increasing results confidence. The mAb selected is trastuzumab FDA -approved since 1998. Trastuzumab is composed of two heavy chains (HC) having 449 amino acids and two light chains (LC) having 214 amino acids. The HC of the mAb has a N-glycosylation on its asparagine (Asp) in the position 300, and different post translational modifications (PTM) "hot spots" (HC-Asn⁵⁵, LC-Asp³⁰, HC-Met²⁵⁵ and HC-Met⁴³¹).

Here, we present the characterization of trastuzumab using CESI-MS/MS. In this bottom-up proteomics-like approach, the use of CESI-MS/MS allowed to obtain 100% sequence coverage of both heavy chain and light chain of the mAb (Figure 1) for 200 fmol injected. The MS/MS spectra quality has allowed retracing the amino acids sequence composing the variable domain of the mAb HC for 115 of 120 amino acids. Similarly 100 of the 107 amino acids sequence composing the variable domain of the LC could be retraced using the MS/MS data. The same analysis also enabled to precisely characterize the PTMs "hot spots" of trastuzumab (Figure 2) and to deduce/confirm the structure of the two major N-glycosylations (Figure 3). At the end of this study, we have compared the CESI-MS method with a state-of-the-art nano-liquid chromatography (LC)-ESI. The CE separation mechanism enhanced by the sensitivity of the CESI interface allowed the detection of several low molecular mass peptides (4-6 amino acids) as well as a digest peptide having more than 60 amino acids.

Annexe 6 : Résumé présenté à HPLC 2013

Résumé présenté au 39^{ème} congrès High-Performance-Liquid-Phase Separations and Related Techniques 2013 (Amsterdam, Pays-bas)

Simultaneous peptide mapping, posttranslational modifications and major N-glycosylation characterization of trastuzumab by sheathless capillary electrophoresis - tandem mass spectrometry

Simultaneous peptide mapping, posttranslational modifications and major N-glycosylation characterization of trastuzumab by sheathless capillary electrophoresis - tandem mass spectrometry

Monoclonal antibodies (mAbs) have taken a significant market share in the pharmaceutical industry and represent one of the fastest growing areas of new drug development. mAbs are complex glycoproteins displaying a wide range of microheterogeneity requiring multiple analytical methods for full structure assessment. Among appropriate methods for therapeutic mAbs characterization, mass spectrometry (MS) has taken a major role as it provides specificity, sensitivity and structural information.

A novel sheathless CE-ESI-MS platform (CESI-MS), allowing hyphenation of capillary electrophoresis (CE) to electrospray ionization MS (ESI-MS) is developed by Beckman Coulter. This platform uses a bare fused-silica capillary whose outlet was made porous to maintain electrical contact.

The CESI-MS/MS platform was used to identify mAb digested peptides on their masses and their fragmentation products increasing results confidence to allow a fast, precise and reproducible characterization of the mAb digest.

The characterization of trastuzumab using CESI-MS/MS allowed to obtain 100% sequence coverage on both heavy chain (HC) and light chain (LC). CE separation mechanism enhanced with the sensitivity provided by CESI platform enabled characterization of low molecular mass peptides, having 5-6 amino acids (AA), but also a peptide having 63 AAs. MS/MS spectra quality allowed to retrace mAb variable domain AAs sequence with 109/120 AAs for HC and 98/107 for LC. The same analysis enabled to precisely characterize each posttranslational modifications (PTM) "hot spots" and deduce the structure of the five major N-glycosylations. This multi-level characterization of the mAb could be obtained with only one analysis of 100 fmol of digested peptides. Method robustness evaluation demonstrated the possibility to obtain each time 100% sequence coverage as well as PTMs and N-glycans characterization in a replicable way. Finally, the CESI-MS method was compared to a state-of-the-art nano-liquid chromatography (nanoLC)-MS. NanoLC-MS/MS could not allowed complete sequence coverage as small peptides could not be detected illustrating one of the advantages to use CE in this kind of characterization.

Annexe 7 : Résumé présenté à IMSC 2014

Résumé présenté à la 20^{ème} International mass spectrometry conference (Genève, Suisse)

Monoclonal antibodies complete primary structure and biosimilarity assessment in a single analysis using sheathless capillary electrophoresis-tandem mass spectrometry

Monoclonal antibodies (mAbs) are meeting an important success as therapeutic treatments and represent currently one of the fastest growing area in drug development. Patents on some approved mAbs are going to end giving the opportunity to produce “copies” referred as biosimilars. Regulation agencies requires for approval to demonstrate the chemical similarity between a candidate biosimilar and the original mAbs. mAbs are highly complex glycoproteins, displaying a wide range of microheterogeneities so adapted analytical techniques may be a huge asset for development/approval of biosimilars. A sheathless CE-MS platform was used to develop a CE-ESI-MS/MS method allowing fast and robust characterization of mAb primary structure and assess biosimilarity between 2 mAbs samples.

Samples were analyzed using a CESI-MS platform coupled to a 5600 TripleTOF mass spectrometer. mAbs samples, digested in-solution by trypsin, were analyzed using transient isotachopheresis followed by CE-ESI-MS/MS. Separations were performed in bare-fused silica capillaries in background electrolyte 10% acetic acid. Peptides, posttranslational modifications (PTM) and glycosylations were simultaneously characterized using the CESI-MS/MS data. Two approved mAbs and respective candidate biosimilars were considered.

CESI-MS/MS allowed to obtain 100% sequence coverage for mAbs samples while systematically up to 90% y/b ions were identified. It is a first that entire protein amino acid (AA) sequence could be characterized using a sole enzyme for mAbs digestion and one injection for peptides characterization. Note AA sequence characterization could be performed only through digested peptides without miscleavages. Dataset also enabled to precisely characterize and estimate occurrence levels of all PTMs “hotspots” used to monitor product stability. Data were used to structurally characterize and estimate relative abundances of glycosylations. It was possible to characterize up to 16 N-glycans for all samples. Two different glycosylation sites could be characterized with site dependent glycoform relative quantification established for *cetuximab*. Glycoform profiling established proved to be in agreement with other techniques like CE-LIF or MALDI-MS. Using CESI-MS/MS, approved mabs were compared to their candidate biosimilar. *Trastuzumab* data comparison allowed to distinguish *trastuzumab* from its candidate biosimilar by a difference of one AA and dissimilarities in glycoforms distribution. For *cetuximab*, the candidate biosimilar had, complete similarity in AA sequence while expression of toxic glycoforms were pointed out again in a single run. Proposed methodology proved its capacity to characterize simultaneously on several aspects mAbs primary structure while allowing to determine/disconfirm biosimilarity between 2 samples.

Recueil des références bibliographiques

1. **Tiselius, A.U.u.**, *The moving boundary method of studying the electrophoresis of proteins*. 1930, Almqvist & Wiksell: Uppsala.
2. **Jorgenson, J. and K. Lukacs**, *Capillary zone electrophoresis*. *Science*, 1983. **222**(4621): p. 266-272.
3. **Hjertén, S.**, *Free zone electrophoresis*. *Chromatographic Reviews*, 1967. **9**(2): p. 122-219.
4. **Jorgenson, J.W. and K.D. Lukacs**, *Zone electrophoresis in open-tubular glass capillaries*. *Analytical Chemistry*, 1981. **53**(8): p. 1298-1302.
5. **Hjertén, S.**, *High-performance electrophoresis: the electrophoretic counterpart of high-performance liquid chromatography*. *Journal of Chromatography A*, 1983. **270**(0): p. 1-6.
6. **Sarazin, C., et al.**, *Identification and determination of inorganic anions in real extracts from pre- and post-blast residues by capillary electrophoresis*. *Journal of Chromatography A*, 2010. **1217**(44): p. 6971-6978.
7. **Schappler, J., et al.**, *Highly sensitive detection of pharmaceutical compounds in biological fluids using capillary electrophoresis coupled with laser-induced native fluorescence*. *Journal of Chromatography A*, 2008. **1204**(2): p. 183-190.
8. **Mayer, S. and V. Schurig**, *ENANTIOMER SEPARATION BY ELECTROCHROMATOGRAPHY IN OPEN TUBULAR COLUMNS COATED WITH CHIRASIL-DEX*. *Journal of Liquid Chromatography*, 1993. **16**(4): p. 915-931.
9. **Wakayama, M., et al.**, *Simultaneous Analysis of Amino Acids and Carboxylic Acids by Capillary Electrophoresis–Mass Spectrometry Using an Acidic Electrolyte and Uncoated Fused-Silica Capillary*. *Analytical Chemistry*, 2010. **82**(24): p. 9967-9976.
10. **Righetti, P.G., R. Sebastiano, and A. Citterio**, *Capillary electrophoresis and isoelectric focusing in peptide and protein analysis*. *PROTEOMICS*, 2013. **13**(2): p. 325-340.
11. **Lauer, H.H. and D. McManigill**, *CAPILLARY ZONE ELECTROPHORESIS OF PROTEINS IN UNTREATED FUSED-SILICA TUBING*. *Analytical Chemistry*, 1986. **58**(1): p. 166-170.
12. **Thakur, D., et al.**, *Profiling the Glycoforms of the Intact alpha Subunit of Recombinant Human Chorionic Gonadotropin by High-Resolution Capillary Electrophoresis-Mass Spectrometry*. *Analytical Chemistry*, 2009. **81**(21): p. 8900-8907.
13. **Barroso, A., et al.**, *Analysis of human transferrin glycopeptides by capillary electrophoresis and capillary liquid chromatography-mass spectrometry. Application to diagnosis of alcohol dependence*. *Analytica Chimica Acta*, 2013. **804**: p. 167-175.
14. **Guttman, A.**, *High-resolution carbohydrate profiling by capillary gel electrophoresis*. *Nature*, 1996. **380**(6573): p. 461-462.
15. **Karger, B.L. and A. Guttman**, *DNA sequencing by CE*. *Electrophoresis*, 2009. **30**: p. S196-S202.
16. **Li, Z.Q., et al.**, *Electromigration behavior of nucleic acids in capillary electrophoresis under pulsed-field conditions*. *Journal of Chromatography A*, 2014. **1331**: p. 100-107.

17. **Sanger, F. and A.R. Coulson**, *A rapid method for determining sequences in DNA by primed synthesis with DNA polymerase*. Journal of Molecular Biology, 1975. **94**(3): p. 441-448.
18. **van Deemter, J.J., F.J. Zuiderweg, and A. Klinkenberg**, *Longitudinal diffusion and resistance to mass transfer as causes of nonideality in chromatography*. Chemical Engineering Science, 1956. **5**(6): p. 271-289.
19. **Horvath, J. and V. Dolnik**, *Polymer wall coatings for capillary electrophoresis*. Electrophoresis, 2001. **22**(4): p. 644-655.
20. **Lucy, C.A., A.M. MacDonald, and M.D. Gulcev**, *Non-covalent capillary coatings for protein separations in capillary electrophoresis*. Journal of Chromatography A, 2008. **1184**(1-2): p. 81-105.
21. **Hayes, M.A., I. Kheterpal, and A.G. Ewing**, *Effects of buffer pH on electroosmotic flow control by an applied radial voltage for capillary zone electrophoresis*. Analytical Chemistry, 1993. **65**(1): p. 27-31.
22. **Smith, J.T. and Z.E. Rassi**, *Capillary zone electrophoresis of biological substances with fused silica capillaries having zero or constant electroosmotic flow*. ELECTROPHORESIS, 1993. **14**(1): p. 396-406.
23. **Berli, C.L.A., M.V. Piaggio, and J.A. Deiber**, *Modeling the zeta potential of silica capillaries in relation to the background electrolyte composition*. ELECTROPHORESIS, 2003. **24**(10): p. 1587-1595.
24. **Knox, J.H.**, *Thermal effects and band spreading in capillary electro-separation*. Chromatographia, 1988. **26**(1): p. 329-337.
25. **Lin, W.-C., C.-E. Lin, and E.C. Lin**, *Capillary zone electrophoretic separation of biogenic amines: influence of organic modifier*. Journal of Chromatography A, 1996. **755**(1): p. 142-146.
26. **Leung, G.N.W., et al.**, *Separation of basic drugs with non-aqueous capillary electrophoresis*. Journal of Chromatography A, 1996. **738**(1): p. 141-154.
27. **Whatley, H.**, *Basic Principles and Modes of Capillary Electrophoresis*. Clinical and Forensic Applications of Capillary Electrophoresis, 2001: p. 21-58.
28. **Green, J.S. and J.W. Jorgenson**, *MINIMIZING ADSORPTION OF PROTEINS ON FUSED-SILICA IN CAPILLARY ZONE ELECTROPHORESIS BY THE ADDITION OF ALKALI-METAL SALTS TO THE BUFFERS*. Journal of Chromatography, 1989. **478**(1): p. 63-70.
29. **Schure, M.R. and A.M. Lenhoff**, *CONSEQUENCES OF WALL ADSORPTION IN CAPILLARY ELECTROPHORESIS - THEORY AND SIMULATION*. Analytical Chemistry, 1993. **65**(21): p. 3024-3037.
30. **Stutz, H.**, *Protein attachment onto silica surfaces - a survey of molecular fundamentals, resulting effects and novel preventive strategies in CE*. Electrophoresis, 2009. **30**(12): p. 2032-2061.
31. **Huhn, C., et al.**, *Relevance and use of capillary coatings in capillary electrophoresis-mass spectrometry*. Analytical and Bioanalytical Chemistry, 2010. **396**(1): p. 297-314.

32. **Bendahl, L., S.H. Hansen, and B. Gammelgaard**, *Capillaries modified by noncovalent anionic polymer adsorption for capillary zone electrophoresis, micellar electrokinetic capillary chromatography and capillary electrophoresis mass spectrometry*. ELECTROPHORESIS, 2001. **22**(12): p. 2565-2573.
33. **Boonyakong, C. and S.A. Tucker**, *Capillary electrophoresis using core-based hyperbranched polyethyleneimine (CHPEI) static-coated capillaries*. Journal of Separation Science, 2009. **32**(20): p. 3489-3496.
34. **Busnel, J.-M., et al.**, *Protein tryptic digests analyzed by carrier ampholyte-based capillary electrophoresis coupled to ESI-MS*. ELECTROPHORESIS, 2006. **27**(8): p. 1481-1488.
35. **Aguilar, C., et al.**, *Analysis of histones by on-line capillary zone electrophoresis–electrospray ionisation mass spectrometry*. Journal of Chromatography A, 2001. **926**(1): p. 57-67.
36. **Wang, A.-J., et al.**, *Noncovalent poly(1-vinylpyrrolidone)-based copolymer coating for the separation of basic proteins and lipoproteins by CE*. ELECTROPHORESIS, 2009. **30**(22): p. 3939-3946.
37. **Peng, S., et al.**, *Hydroxyethylcellulose-graft-poly (N,N-dimethylacrylamide) copolymer as a multifunctional separation medium for CE*. ELECTROPHORESIS, 2008. **29**(21): p. 4351-4354.
38. **Jurcic, K. and K.K.C. Yeung**, *Sphingomyelins as semi-permanent capillary coatings for protein separations in CE and off-line analysis with MALDI-MS*. ELECTROPHORESIS, 2009. **30**(10): p. 1817-1827.
39. **Gilges, M., M.H. Kleemiss, and G. Schomburg**, *CAPILLARY ZONE ELECTROPHORESIS SEPARATIONS OF BASIC AND ACIDIC PROTEINS USING POLY(VINYL ALCOHOL) COATINGS IN FUSED-SILICA CAPILLARIES*. Analytical Chemistry, 1994. **66**(13): p. 2038-2046.
40. **Lipponen, K., et al.**, *Stable neutral double hydrophilic block copolymer capillary coating for capillary electrophoretic separations*. ELECTROPHORESIS, 2014. **35**(8): p. 1106-1113.
41. **Soga, T., et al.**, *Pressure-Assisted Capillary Electrophoresis Electrospray Ionization Mass Spectrometry for Analysis of Multivalent Anions*. Analytical Chemistry, 2002. **74**(24): p. 6224-6229.
42. **Bernal, J., et al.**, *Poly(N,N-dimethylacrylamide-co-4-(ethyl)-morpholine methacrylamide) copolymer as coating for CE*. Journal of Separation Science, 2009. **32**(4): p. 605-612.
43. **Wu, Y., et al.**, *Electrokinetic separation of peptides and proteins using a polyvinylamine-coated capillary with UV and ESI-MS detection*. Journal of Separation Science, 2008. **31**(5): p. 814-823.
44. **Chiu, R.W., J.C. Jimenez, and C.A. Monnig**, *High molecular weight polyarginine as a capillary coating for separation of cationic proteins by capillary electrophoresis*. Analytica Chimica Acta, 1995. **307**(2–3): p. 193-201.
45. **Yao, Y.J. and S.F.Y. Li**, *Capillary zone electrophoresis of basic proteins with chitosan as a capillary modifier*. Journal of Chromatography A, 1994. **663**(1): p. 97-104.

46. **Liu, Q.C., F.M. Lin, and R.A. Hartwick**, *Poly(diallyldimethylammonium chloride) as a cationic coating for capillary electrophoresis*. *Journal of Chromatographic Science*, 1997. **35**(3): p. 126-130.
47. **Haselberg, R., G.J. de Jong, and G.W. Somsen**, *Capillary electrophoresis of intact basic proteins using noncovalently triple-layer coated capillaries*. *Journal of Separation Science*, 2009. **32**(14): p. 2408-2415.
48. **Liu, Q., et al.**, *Long-chained gemini surfactants for semipermanent wall coatings in capillary electrophoresis of proteins*. *ELECTROPHORESIS*, 2008. **29**(4): p. 871-879.
49. **Elhamili, A., et al.**, *Rapid capillary electrophoresis time-of-flight mass spectrometry separations of peptides and proteins using a monoquaternarized piperazine compound (M7C4I) for capillary coatings*. *ELECTROPHORESIS*, 2008. **29**(8): p. 1619-1625.
50. **Kelly, J.F., et al.**, *Development of electrophoretic conditions for the characterization of protein glycoforms by capillary electrophoresis—electrospray mass spectrometry*. *Journal of Chromatography A*, 1996. **720**(1–2): p. 409-427.
51. **Waterval, J.C.M., et al.**, *Capillary electrophoretic bioanalysis of therapeutically active peptides with UV and mass spectrometric detection after on-capillary preconcentration*. *ELECTROPHORESIS*, 2001. **22**(13): p. 2709-2716.
52. **Ullsten, S., et al.**, *A polyamine coating for enhanced capillary electrophoresis-electrospray ionization-mass spectrometry of proteins and peptides*. *ELECTROPHORESIS*, 2004. **25**(13): p. 2090-2099.
53. **Martma, K., et al.**, *Potential of polyE-323 coated capillaries for capillary electrophoresis of lipids*. *Journal of Chromatography A*, 2013. **1317**: p. 193-198.
54. **Garcia-Schwarz, G. and J.G. Santiago**, *Rapid High-Specificity microRNA Detection Using a Two-stage Isotachopheresis Assay*. *Angewandte Chemie International Edition*, 2013. **52**(44): p. 11534-11537.
55. **Mohan, D. and C.S. Lee**, *On-line coupling of capillary isoelectric focusing with transient isotachopheresis-zone electrophoresis: A two-dimensional separation system for proteomics*. *Electrophoresis*, 2002. **23**(18): p. 3160-3167.
56. **Larsson, M. and E.S.M. Lutz**, *Transient isotachopheresis for sensitivity enhancement in capillary electrophoresis-mass spectrometry for peptide analysis*. *Electrophoresis*, 2000. **21**(14): p. 2859-2865.
57. **Zhu, Z., J.J. Lu, and S. Liu**, *Protein separation by capillary gel electrophoresis: A review*. *Analytica Chimica Acta*, 2012. **709**(0): p. 21-31.
58. **Woolley, A.T. and R.A. Mathies**, *ULTRA-HIGH-SPEED DNA-SEQUENCING USING CAPILLARY ELECTROPHORESIS CHIPS*. *Analytical Chemistry*, 1995. **67**(20): p. 3676-3680.
59. **Ogston, A.G.**, *The spaces in a uniform random suspension of fibres*. *Transactions of the Faraday Society*, 1958. **54**(0): p. 1754-1757.
60. **de Gennes, P.G.**, *Reptation of a Polymer Chain in the Presence of Fixed Obstacles*. *The Journal of Chemical Physics*, 1971. **55**(2): p. 572-579.

61. **Smith, N.W. and M.B. Evans**, *THE ANALYSIS OF PHARMACEUTICAL COMPOUNDS USING ELECTROCHROMATOGRAPHY*. *Chromatographia*, 1994. **38**(9-10): p. 649-657.
62. **Terabe, S., et al.**, *ELECTROKINETIC SEPARATIONS WITH MICELLAR SOLUTIONS AND OPEN-TUBULAR CAPILLARIES*. *Analytical Chemistry*, 1984. **56**(1): p. 111-113.
63. **Terabe, S.**, *Capillary Separation: Micellar Electrokinetic Chromatography*, in *Annual Review of Analytical Chemistry*. 2009. p. 99-120.
64. **Shen, Y.F. and R.D. Smith**, *High-resolution capillary isoelectric focusing of proteins using highly hydrophilic-substituted cellulose-coated capillaries*. *Journal of Microcolumn Separations*, 2000. **12**(3): p. 135-141.
65. **Zhou, C.M.**, *Characterization of human papillomavirus by capillary isoelectric focusing with whole-column imaging detection*. *Electrophoresis*, 2013. **34**(20-21): p. 3046-3053.
66. **Dole, M., et al.**, *Molecular beams of macroions*. *The Journal of Chemical Physics*, 1968. **49**(5): p. 2240-2249.
67. **Yamashita, M. and J.B. Fenn**, *ELECTROSPRAY ION-SOURCE - ANOTHER VARIATION ON THE FREE-JET THEME*. *Journal of Physical Chemistry*, 1984. **88**(20): p. 4451-4459.
68. **Kebarle, P. and L. Tang**, *FROM IONS IN SOLUTION TO IONS IN THE GAS-PHASE - THE MECHANISM OF ELECTROSPRAY MASS-SPECTROMETRY*. *Analytical Chemistry*, 1993. **65**(22): p. A972-A986.
69. **Taylor, G.**, *Disintegration of Water Drops in an Electric Field*. *Proceedings of the Royal Society of London. Series A. Mathematical and Physical Sciences*, 1964. **280**(1382): p. 383-397.
70. **Kebarle, P.**, *A brief overview of the present status of the mechanisms involved in electrospray mass spectrometry*. *Journal of Mass Spectrometry*, 2000. **35**(7): p. 804-817.
71. **Rayleigh, L.**, *XX. On the equilibrium of liquid conducting masses charged with electricity*. *Philosophical Magazine Series 5*, 1882. **14**(87): p. 184-186.
72. **Schmelzeisenredeker, G., L. Butfering, and F.W. Rollgen**, *DESOLVATION OF IONS AND MOLECULES IN THERMOSPRAY MASS-SPECTROMETRY*. *International Journal of Mass Spectrometry and Ion Processes*, 1989. **90**(2): p. 139-150.
73. **Leize, E.**, *Caracterisation d'edifices supramoleculaires par spectrometrie de masse avec ionisation electrospray. Etude du mecanisme d'ionisation-desorption electrospray*. 1994. p. 149 P.
74. **Thomson, B.A. and J.V. Iribarne**, *Field induced ion evaporation from liquid surfaces at atmospheric pressure*. *The Journal of Chemical Physics*, 1979. **71**(11): p. 4451-4463.
75. **King, R., et al.**, *Mechanistic investigation of ionization suppression in electrospray ionization*. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*, 2000. **11**(11): p. 942-950.

76. **Emmett, M.R. and R.M. Caprioli**, *MICRO-ELECTROSPRAY MASS-SPECTROMETRY - ULTRA-HIGH-SENSITIVITY ANALYSIS OF PEPTIDES AND PROTEINS*. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*, 1994. **5**(7): p. 605-613.
77. **Wilm, M.S. and M. Mann**, *Electrospray and Taylor-Cone theory, Dole's beam of macromolecules at last?* *International Journal of Mass Spectrometry and Ion Processes*, 1994. **136**(2–3): p. 167-180.
78. **Wilm, M. and M. Mann**, *Analytical properties of the nanoelectrospray ion source*. *Analytical Chemistry*, 1996. **68**(1): p. 1-8.
79. **Wagner, E.**, *Nouvelles approches de la spectrométrie de masse en tandem pour la caractérisation de biomolécules : Applications à la protéomique*. 2004. p. 1 vol. (224 p.).
80. **Ladislav Wiza, J.**, *Microchannel plate detectors*. *Nuclear Instruments and Methods*, 1979. **162**(1): p. 587-601.
81. **Reiber, D.C., T.A. Grover, and R.S. Brown**, *Identifying proteins using matrix-assisted laser desorption/ionization in-source fragmentation data combined with database searching*. *Analytical Chemistry*, 1998. **70**(4): p. 673-683.
82. **Reinhold, V.N., B.B. Reinhold, and C.E. Costello**, *CARBOHYDRATE MOLECULAR-WEIGHT PROFILING, SEQUENCE, LINKAGE, AND BRANCHING DATA - ES-MS AND CID*. *Analytical Chemistry*, 1995. **67**(11): p. 1772-1784.
83. **Cooper, H.J., K. Hakansson, and A.G. Marshall**, *The role of electron capture dissociation in biomolecular analysis*. *Mass Spectrometry Reviews*, 2005. **24**(2): p. 201-222.
84. **Good, D.M., et al.**, *Performance characteristics of electron transfer dissociation mass spectrometry*. *Molecular & Cellular Proteomics*, 2007. **6**(11): p. 1942-1951.
85. **Enjalbert, Q., et al.**, *Photo-SRM: laser-induced dissociation improves detection selectivity of selected reaction monitoring mode*. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 2011. **25**(22): p. 3375-3381.
86. **Wang, Y., et al.**, *Improving the Comprehensiveness and Sensitivity of Sheathless Capillary Electrophoresis–Tandem Mass Spectrometry for Proteomic Analysis*. *Analytical Chemistry*, 2012. **84**(20): p. 8505-8513.
87. **Olivares, J.A., et al.**, *On-line mass spectrometric detection for capillary zone electrophoresis*. *Analytical Chemistry*, 1987. **59**(8): p. 1230-1232.
88. **Smith, R.D., C.J. Barinaga, and H.R. Udseth**, *Improved electrospray ionization interface for capillary zone electrophoresis-mass spectrometry*. *Analytical Chemistry*, 1988. **60**(18): p. 1948-1952.
89. **Hommerson, P., et al.**, *Ionization techniques in capillary electrophoresis-mass spectrometry: Principles, design, and application*. *Mass Spectrometry Reviews*, 2011. **30**(6): p. 1096-1120.
90. **Soga, T., et al.**, *Metabolomic Profiling of Anionic Metabolites by Capillary Electrophoresis Mass Spectrometry*. *Analytical Chemistry*, 2009. **81**(15): p. 6165-6174.

91. **Bonvin, G., S. Rudaz, and J. Schappler**, *In-spray supercharging of intact proteins by capillary electrophoresis-electrospray ionization-mass spectrometry using sheath liquid interface*. *Analytica Chimica Acta*, 2014. **813**: p. 97-105.
92. **Foret, F., et al.**, *LIQUID SHEATH EFFECTS ON THE SEPARATION OF PROTEINS IN CAPILLARY ELECTROPHORESIS ELECTROSPRAY MASS-SPECTROMETRY*. *Analytical Chemistry*, 1994. **66**(24): p. 4450-4458.
93. **Vuorensola, K., et al.**, *Optimization of capillary electrophoretic- electrospray ionization-mass spectrometric analysis of catecholamines*. *ELECTROPHORESIS*, 2001. **22**(20): p. 4347-4354.
94. **Staub, A., et al.**, *CE-ESI-TOF/MS for human growth hormone analysis*. *ELECTROPHORESIS*, 2010. **31**(2): p. 388-395.
95. **Zamfir, A. and J. Peter-Katalinic**, *Capillary electrophoresis-mass spectrometry for glycoscreening in biomedical research*. *Electrophoresis*, 2004. **25**(13): p. 1949-1963.
96. **Lee, E.D., et al.**, *On-line capillary zone electrophoresis-ion spray tandem mass spectrometry for the determination of dynorphins*. *Journal of Chromatography A*, 1988. **458**(0): p. 313-321.
97. **Lee, E.D., et al.**, *Liquid junction coupling for capillary zone electrophoresis/ion spray mass spectrometry*. *Biological Mass Spectrometry*, 1989. **18**(9): p. 844-850.
98. **Maxwell, E.J. and D.D.Y. Chen**, *Twenty years of interface development for capillary electrophoresis–electrospray ionization–mass spectrometry*. *Analytica Chimica Acta*, 2008. **627**(1): p. 25-33.
99. **Fanali, S., et al.**, *On-line CE-MS using pressurized liquid junction nanoflow electrospray interface and surface-coated capillaries*. *Electrophoresis*, 2006. **27**(23): p. 4666-4673.
100. **Maxwell, E.J., et al.**, *Decoupling CE and ESI for a more robust interface with MS*. *Electrophoresis*, 2010. **31**(7): p. 1130-1137.
101. **Jayo, R.G., et al.**, *Simple Capillary Electrophoresis-Mass Spectrometry Method for Complex Glycan Analysis Using a Flow-Through Microvial Interface*. *Analytical Chemistry*, 2014. **86**(13): p. 6479-6486.
102. **Zhong, X., E.J. Maxwell, and D.D.Y. Chen**, *Mass Transport in a Micro Flow-Through Vial of a Junction-at-the-Tip Capillary Electrophoresis-Mass Spectrometry Interface*. *Analytical Chemistry*, 2011. **83**(12): p. 4916-4923.
103. **Bonvin, G., et al.**, *Evaluation of a sheathless nanospray interface based on a porous tip sprayer for CE-ESI-MS coupling*. *Electrophoresis*, 2012. **33**(4): p. 552-562.
104. **Nilsson, S., et al.**, *A simple and robust conductive graphite coating for sheathless electrospray emitters used in capillary electrophoresis/mass spectrometry*. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 2001. **15**(21): p. 1997-2000.
105. **Fang, L.L., et al.**, *ONLINE TIME-OF-FLIGHT MASS-SPECTROMETRIC ANALYSIS OF PEPTIDES SEPARATED BY CAPILLARY ELECTROPHORESIS*. *Analytical Chemistry*, 1994. **66**(21): p. 3696-3701.

106. **Cao, P. and M. Moini**, *A novel sheathless interface for capillary electrophoresis/electrospray ionization mass spectrometry using an in-capillary electrode*. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*, 1997. **8**(5): p. 561-564.
107. **Bonvin, G., J. Schappler, and S. Rudaz**, *Non-aqueous capillary electrophoresis for the analysis of acidic compounds using negative electrospray ionization mass spectrometry*. *Journal of Chromatography A*, 2014. **1323**(0): p. 163-173.
108. **Busnel, J.-M., et al.**, *High Capacity Capillary Electrophoresis-Electrospray Ionization Mass Spectrometry: Coupling a Porous Sheathless Interface with Transient-Isotachopheresis*. *Analytical Chemistry*, 2010. **82**(22): p. 9476-9483.
109. **Faserl, K., et al.**, *Optimization and Evaluation of a Sheathless Capillary Electrophoresis-Electrospray Ionization Mass Spectrometry Platform for Peptide Analysis: Comparison to Liquid Chromatography-Electrospray Ionization Mass Spectrometry*. *Analytical Chemistry*, 2011. **83**(19): p. 7297-7305.
110. **Sarg, B., et al.**, *Comparing and Combining Capillary Electrophoresis Electrospray Ionization Mass Spectrometry and Nano-Liquid Chromatography Electrospray Ionization Mass Spectrometry for the Characterization of Post-translationally Modified Histones*. *Molecular & Cellular Proteomics*, 2013. **12**(9): p. 2640-2656.
111. **Heemskerk, A.A.M., et al.**, *Ultra-Low Flow Electrospray Ionization-Mass Spectrometry for Improved Ionization Efficiency in Phosphoproteomics*. *Analytical Chemistry*, 2012. **84**(10): p. 4552-4559.
112. **Ramautar, R., et al.**, *Enhancing the Coverage of the Urinary Metabolome by Sheathless Capillary Electrophoresis-Mass Spectrometry*. *Analytical Chemistry*, 2012. **84**(2): p. 885-892.
113. **Heemskerk, A.A.M., et al.**, *Coupling porous sheathless interface MS with transient-ITP in neutral capillaries for improved sensitivity in glycopeptide analysis*. *ELECTROPHORESIS*, 2013. **34**(3): p. 383-387.
114. **Haselberg, R., G.J. de Jong, and G.W. Somsen**, *Low-Flow Sheathless Capillary Electrophoresis-Mass Spectrometry for Sensitive Glycoform Profiling of Intact Pharmaceutical Proteins*. *Analytical Chemistry*, 2013. **85**(4): p. 2289-2296.
115. **Gahoual, R., et al.**, *Rapid and multi-level characterization of trastuzumab using sheathless capillary electrophoresis-tandem mass spectrometry*. *mAbs*, 2013. **5**(3): p. 479-490.
116. **Haselberg, R., et al.**, *Performance of a sheathless porous tip sprayer for capillary electrophoresis-electrospray ionization-mass spectrometry of intact proteins*. *Journal of Chromatography A*, 2010. **1217**(48): p. 7605-7611.
117. **Haselberg, R., et al.**, *Characterization of drug-lysozyme conjugates by sheathless capillary electrophoresis-time-of-flight mass spectrometry*. *Analytica Chimica Acta*, 2011. **698**(1-2): p. 77-83.
118. **Gahoual, R., et al.**, *Novel sheathless CE-MS interface as an original and powerful infusion platform for nanoESI study: from intact proteins to high molecular mass noncovalent complexes*. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 2014. **406**(4): p. 1029-1038.

119. **Kahn, P.**, *MOLECULAR-BIOLOGY - FROM GENOME TO PROTEOME - LOOKING AT A CELLS PROTEINS*. Science, 1995. **270**(5235): p. 369-370.
120. **Anderson, L. and J. Seilhamer**, *A comparison of selected mRNA and protein abundances in human liver*. ELECTROPHORESIS, 1997. **18**(3-4): p. 533-537.
121. **Yates, J.R., C.I. Ruse, and A. Nakorchevsky**, *Proteomics by Mass Spectrometry: Approaches, Advances, and Applications*, in *Annual Review of Biomedical Engineering*. 2009. p. 49-79.
122. **Ge, Y., et al.**, *Top down characterization of larger proteins (45 kDa) by electron capture dissociation mass spectrometry*. Journal of the American Chemical Society, 2002. **124**(4): p. 672-678.
123. **Kelleher, N.L., et al.**, *Top Down versus Bottom Up Protein Characterization by Tandem High-Resolution Mass Spectrometry*. Journal of the American Chemical Society, 1999. **121**(4): p. 806-812.
124. **Han, X., et al.**, *Extending Top-Down Mass Spectrometry to Proteins with Masses Greater Than 200 Kilodaltons*. Science, 2006. **314**(5796): p. 109-112.
125. **Fornelli, L., et al.**, *Middle-Down Analysis of Monoclonal Antibodies with Electron Transfer Dissociation Orbitrap Fourier Transform Mass Spectrometry*. Analytical Chemistry, 2014. **86**(6): p. 3005-3012.
126. **Scherperel, G. and G.E. Reid**, *Emerging methods in proteomics: top-down protein characterization by multistage tandem mass spectrometry*. Analyst, 2007. **132**(6): p. 500-506.
127. **Biemann, K.**, *SEQUENCING OF PEPTIDES BY TANDEM MASS-SPECTROMETRY AND HIGH-ENERGY COLLISION-INDUCED DISSOCIATION*. Methods in Enzymology, 1990. **193**: p. 455-479.
128. **Roepstorff, P. and J. Fohlman**, *PROPOSAL FOR A COMMON NOMENCLATURE FOR SEQUENCE IONS IN MASS-SPECTRA OF PEPTIDES*. Biomedical Mass Spectrometry, 1984. **11**(11): p. 601-601.
129. **Johnson, R.S., et al.**, *Novel fragmentation process of peptides by collision-induced decomposition in a tandem mass spectrometer: differentiation of leucine and isoleucine*. Analytical Chemistry, 1987. **59**(21): p. 2621-2625.
130. **Yates, J.R., et al.**, *Peptide Mass Maps: A Highly Informative Approach to Protein Identification*. Analytical Biochemistry, 1993. **214**(2): p. 397-408.
131. **James, P., et al.**, *Protein Identification by Mass Profile Fingerprinting*. Biochemical and Biophysical Research Communications, 1993. **195**(1): p. 58-64.
132. **Pappin, D.J.C., P. Hojrup, and A.J. Bleasby**, *Rapid identification of proteins by peptide-mass fingerprinting*. Current Biology, 1993. **3**(6): p. 327-332.
133. **Yates, J.R., et al.**, *METHOD TO CORRELATE TANDEM MASS-SPECTRA OF MODIFIED PEPTIDES TO AMINO-ACID-SEQUENCES IN THE PROTEIN DATABASE*. Analytical Chemistry, 1995. **67**(8): p. 1426-1436.
134. **Mann, M. and O.N. Jensen**, *Proteomic analysis of post-translational modifications*. Nat Biotech, 2003. **21**(3): p. 255-261.

135. **Mann, M. and O.N. Jensen**, *Proteomic analysis of post-translational modifications*. Nature Biotechnology, 2003. **21**(3): p. 255-261.
136. **Krapp, S., et al.**, *Structural Analysis of Human IgG-Fc Glycoforms Reveals a Correlation Between Glycosylation and Structural Integrity*. Journal of Molecular Biology, 2003. **325**(5): p. 979-989.
137. **Marshall, R.D.**, *Glycoproteins*. Annual Review of Biochemistry, 1972. **41**(1): p. 673-702.
138. **Jaquinod, M., et al.**, *Mass spectrometric characterisation of post-translational modification and genetic variation in human tetranectin*. Biological chemistry, 1999. **380**(11): p. 1307-1314.
139. **Weiskopf, A.S., P. Vouros, and D.J. Harvey**, *Electrospray Ionization-Ion Trap Mass Spectrometry for Structural Analysis of Complex N-Linked Glycoprotein Oligosaccharides*. Analytical Chemistry, 1998. **70**(20): p. 4441-4447.
140. **Huffman, J.E., et al.**, *Comparative Performance of Four Methods for High-throughput Glycosylation Analysis of Immunoglobulin G in Genetic and Epidemiological Research*. Molecular & Cellular Proteomics, 2014. **13**(6): p. 1598-1610.
141. **Stanley, P.S., H; Taniguchi, N; Varki, A.**, *Essentials of Glycobiology, Chapter 8 N-Glycans*. 2009: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
142. **Domon, B. and C.E. Costello**, *A SYSTEMATIC NOMENCLATURE FOR CARBOHYDRATE FRAGMENTATIONS IN FAB-MS MS SPECTRA OF GLYCOCONJUGATES*. Glycoconjugate Journal, 1988. **5**(4): p. 397-409.
143. **Von Behring, E. and S. Kitasato**, [*The mechanism of diphtheria immunity and tetanus immunity in animals. 1890*]. Molecular immunology, 1991. **28**(12): p. 1317, 1319-20.
144. **Tiselius, A. and E.A. Kabat**, *AN ELECTROPHORETIC STUDY OF IMMUNE SERA AND PURIFIED ANTIBODY PREPARATIONS*. The Journal of Experimental Medicine, 1939. **69**(1): p. 119-131.
145. **Fanning, L.J., A.M. Connor, and G.E. Wu**, *Development of the immunoglobulin repertoire*. Clinical Immunology and Immunopathology, 1996. **79**(1): p. 1-14.
146. **Kohler, G. and C. Milstein**, *Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity*. Nature, 1975. **256**(5517): p. 495-497.
147. **Dalziel, M., et al.**, *Emerging principles for the therapeutic exploitation of glycosylation*. Science, 2014. **343**(6166).
148. **Jefferis, R.**, *Recombinant antibody therapeutics: the impact of glycosylation on mechanisms of action*. Trends in Pharmacological Sciences, 2009. **30**(7): p. 356-362.
149. **An, Z.**, *Therapeutic Monoclonal Antibodies: From Bench to Clinic*. 2009: Wiley.
150. **Reichert, J.M.**, *Antibodies to watch in 2014: Mid-year update*. mAbs, 2014. **6**(4): p. 799-802.
151. **Beck, A., et al.**, *Strategies and challenges for the next generation of therapeutic antibodies*. Nat Rev Immunol, 2010. **10**(5): p. 345-352.

152. **Hay, M., et al.**, *Clinical development success rates for investigational drugs*. Nat Biotech, 2014. **32**(1): p. 40-51.
153. **Agency, E.M.**, *Guideline on Similar Biological Medicinal Products*. 22 May 2013. **CHMP/437/04 Rev 1**.
154. **Beck, A. and J.M. Reichert**, *Approval of the first biosimilar antibodies in Europe: A major landmark for the biopharmaceutical industry*. mAbs, 2013. **5**(5): p. 621-623.
155. **Valeja, S.G., et al.**, *Unit Mass Baseline Resolution for an Intact 148 kDa Therapeutic Monoclonal Antibody by Fourier Transform Ion Cyclotron Resonance Mass Spectrometry*. Analytical Chemistry, 2011. **83**(22): p. 8391-8395.
156. **Manuilov, A.V., C.H. Radziejewski, and D.H. Lee**, *Comparability analysis of protein therapeutics by bottom-up LC-MS with stable isotope-tagged reference standards*. mAbs, 2011. **3**(4): p. 387-395.
157. **Wagner-Rousset, E., et al.**, *The way forward, enhanced characterization of therapeutic antibody glycosylation: Comparison of three level mass spectrometry-based strategies*. Journal of Chromatography B, 2008. **872**(1-2): p. 23-37.
158. **Kaltashov, I.A., et al.**, *Advances and challenges in analytical characterization of biotechnology products: Mass spectrometry-based approaches to study properties and behavior of protein therapeutics*. Biotechnology Advances, 2012. **30**(1): p. 210-222.
159. **Almagro, J.C., et al.**, *Characterization of a high-affinity human antibody with a disulfide bridge in the third complementarity-determining region of the heavy chain*. Journal of Molecular Recognition, 2012. **25**(3): p. 125-135.
160. **Rosati, S., et al.**, *In-depth qualitative and quantitative analysis of composite glycosylation profiles and other micro-heterogeneity on intact monoclonal antibodies by high-resolution native mass spectrometry using a modified Orbitrap*. Mabs, 2013. **5**(6): p. 917-924.
161. **Debaene, F., et al.**, *Time Resolved Native Ion-Mobility Mass Spectrometry to Monitor Dynamics of IgG4 Fab Arm Exchange and "Bispecific" Monoclonal Antibody Formation*. Analytical Chemistry, 2013. **85**(20): p. 9785-9792.
162. **Beck, A., et al.**, *Characterization of Therapeutic Antibodies and Related Products*. Analytical Chemistry, 2013. **85**(2): p. 715-736.
163. **Beck, A., et al.**, *Characterization by liquid chromatography combined with mass spectrometry of monoclonal anti-IGF-1 receptor antibodies produced in CHO and NSO cells*. Journal of Chromatography B-Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences, 2005. **819**(2): p. 203-218.
164. **Stadlmann, J., et al.**, *Analysis of immunoglobulin glycosylation by LC-ESI-MS of glycopeptides and oligosaccharides*. PROTEOMICS, 2008. **8**(14): p. 2858-2871.
165. **Zhang, H., et al.**, *Identification and quantification of N-linked glycoproteins using hydrazide chemistry, stable isotope labeling and mass spectrometry*. Nature Biotechnology, 2003. **21**(6): p. 660-666.
166. **Diepold, K., et al.**, *Simultaneous Assessment of Asp Isomerization and Asn Deamidation in Recombinant Antibodies by LC-MS following Incubation at Elevated Temperatures*. PLoS ONE, 2012. **7**(1): p. e30295.

167. **Beck, A., S. Sanglier-Cianfériani, and A. Van Dorsselaer**, *Biosimilar, Biobetter, and Next Generation Antibody Characterization by Mass Spectrometry*. Analytical Chemistry, 2012. **84**(11): p. 4637-4646.



Rabah GAHOUAL

**Développement du couplage électrophorèse capillaire –
spectrométrie de masse haute sensibilité : application à la
caractérisation fine de protéines**

Résumé

Les interfaces permettant le couplage entre l'électrophorèse capillaire (CE) et la spectrométrie de masse (MS) à source ESI souffrent actuellement d'un manque de robustesse ou de sensibilité. Les travaux présentés décrivent la mise en œuvre d'un nouveau type d'interface CE-ESI-MS à haute sensibilité CESI-MS. La caractérisation du spray généré par CESI-MS a montré la production d'un nanoESI induisant une augmentation importante de la sensibilité par rapport au régime ESI classique. Le système CESI-MS a pu ainsi être mis en œuvre comme plateforme d'infusion nanoESI et utilisé pour l'étude de complexes non-covalents de haut poids moléculaires en MS native. Une méthodologie par CESI-MS/MS a également été développée pour la caractérisation complète de la structure primaire d'anticorps monoclonaux (mAbs). Les résultats montrent la possibilité en une unique injection de caractériser l'ensemble de la séquence d'acides aminés, un nombre significatif de glycosylations et l'ensemble des modifications d'intérêts. Cette méthodologie a pu être appliquée pour déterminer la similarité entre des mAbs commerciaux et leur candidat biosimilaire respectif.

Mots-clés : Spectrométrie de masse, électrophorèse capillaire, anticorps monoclonaux, glycosylations, modifications post-traductionnelles, complexes non-covalents.

Summary

Interfacing allowing the hyphenation of capillary electrophoresis (CE) to ESI mass spectrometry (MS) currently suffer from lack of robustness and sensitivity. This work describes the application of a new design of CE-ESI-MS coupling referred as the CESI-MS. Characterization of the ESI generated through the CESI-MS system showed the production of a nanoESI allowing to increase drastically the sensitivity compared to conventional ESI. The CESI-MS was used as a nanoESI infusion platform allowing to study high molecular masses noncovalent complexes in native MS. A CESI-MS/MS method was developed enabling the complete primary structure characterization of monoclonal antibodies (mAbs). Results showed the ability of the methodology in a single injection to simultaneously characterize the entire amino acid sequence, a significant number of glycosylation and all the posttranslational modifications of interest. Finally the methodology was applied to assess the similarity between marketed mAbs and their respective biosimilar candidate.

Keywords: mass spectrometry, capillary electrophoresis, monoclonal antibodies, glycosylation, posttranslational modifications, noncovalent complexes.