La dilution isotopique en spectrométrie de masse MALDI-ToF pour la mesure d'interactions entre récepteurs couplés aux protéines G et ligands peptidiques

Maxime Rossato

▶ **To cite this version:**

Maxime Rossato. La dilution isotopique en spectrométrie de masse MALDI-ToF pour la mesure d'interactions entre récepteurs couplés aux protéines G et ligands peptidiques. Chimie organique. Université Montpellier, 2016. Français. NNT : 2016MONTS007 . tel-01545185

HAL Id: tel-01545185
https://theses.hal.science/tel-01545185

Submitted on 22 Jun 2017

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.

Collège Doctoral
Languedoc-Roussillon

THÈSE

Pour obtenir le grade de

Docteur

Délivré par **Université de Montpellier**

Préparée au sein de l'école doctorale ED 459 – Sciences Chimiques Balard
Et de l'unité de recherche CNRS-UM-ENSCM, UMR 5247

Spécialité : **Ingénierie moléculaire**

Présentée par **Maxime ROSSATO**

La dilution isotopique en spectrométrie de masse MALDI-ToF pour la mesure d'interactions entre récepteurs couplés aux protéines G et ligands peptidiques

Soutenue le 4 Novembre 2016 devant le jury composé de

Mme Emmanuelle SACHON Maître de conférences, Université Pierre et Marie Curie	Rapporteur
M Benoît MAUNIT Professeur, Université d'Orléans	Rapporteur
M Daniel LAFITTE Docteur, Université d'Aix-Marseille	Examinateur
M Oleg MELNYK Directeur de recherche, Université de Lille	Examinateur
M Gilles SUBRA Professeur, Université de Montpellier	Examinateur
M Jean MARTINEZ Professeur, Université de Montpellier	Examinateur
Mme Christine ENJALBAL Professeur, Université de Montpellier	Directeur de thèse
Mme Sonia CANTEL Maître de conférences, Université de Montpellier	Co-encadrant de thèse

IBMM Institut des Biomolécules Max Mousseron

ACADEMIE DE MONTPELLIER

Université Montpellier

Sciences et techniques du Languedoc

THESE

Pour l'obtention du grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE MONTPELLIER

Spécialité : Ingénierie moléculaire

Ecole doctorale Sciences chimiques

Section CNU 32

La dilution isotopique en spectrométrie de masse MALDI-ToF pour la mesure d'interactions entre récepteurs couplés aux protéines G et ligands peptidiques

Présentée et soutenue par

Maxime ROSSATO

Le 4 Novembre 2016 devant le jury composé de :

Mme Emmanuelle SACHON	Maître de conférences, Université Pierre et Marie Curie	Rapporteur
M Benoît MAUNIT	Professeur, Université d'Orléans	Rapporteur
M Daniel LAFITTE	Docteur, Université d'Aix-Marseille	Examinateur
M Oleg MELNYK	Directeur de recherche, Université de Lille	Examinateur
M Gilles SUBRA	Professeur, Université de Montpellier	Examinateur
M Jean MARTINEZ	Professeur, Université de Montpellier	Examinateur
Mme Christine ENJALBAL	Professeur, Université de Montpellier	Directeur de thèse
Mme Sonia CANTEL	Maître de conférences, Université de Montpellier	Co-encadrant de thèse

A Suelen

A mon arrière-grand-mère

A ma famille

A mes amis

Remerciements

Avant de démarrer la présentation des travaux de ces 3 années de thèse, je souhaiterais exprimer toute ma reconnaissance envers celles et ceux qui m'ont accompagnés tout au long de ces 3 années et qui ont su en faire une expérience enrichissante autant du point de vue scientifique que personnel, que je n'oublierai jamais.

Je souhaite remercier chaleureusement Monsieur le Professeur Benoît MAUNIT et Madame le Docteur Emmanuelle SACHON pour avoir accepté de juger l'ensemble de ces travaux. Je n'oublie pas de remercier Monsieur le Docteur Daniel LAFITTE, Monsieur le Docteur Oleg MELNYK et Monsieur le Professeur Gilles SUBRA pour avoir accepté de siéger au sein de ce jury en tant qu'examinateurs. Je souhaite associer à ces remerciements Monsieur le Professeur Jean MARTINEZ qui m'a accueilli dans son laboratoire et qui me fait l'honneur de sa présence dans ce jury.

Je souhaite exprimer mes profonds remerciements à Monsieur le Professeur Gilles SUBRA et à Monsieur le Docteur Pascal VERDIE pour m'avoir formé à la théorie et à la pratique de la synthèse peptidique sur support solide. Je n'oublie pas de remercier Monsieur Pierre SANCHEZ pour son travail d'analyse et son rôle crucial pour l'analyse des molécules et la formation qu'il m'a prodiguée en LC-MS sur triple quadripôle. Mes remerciements vont également à Monsieur le Docteur Jean-Alain FERHENTZ et à Monsieur le Docteur Guillaume LACONDE pour la formation complémentaire en « Fast SPPS », aussi rapide que le nom l'indique.

Je souhaite également remercier très chaleureusement Monsieur le Docteur Jacky MARIE qui m'a beaucoup aidé en période de rédaction (surtout pour les publis), Monsieur le Docteur Didier GAGNE, Madame Céline M'KADMI et Monsieur le Docteur Jean-Louis BANERES pour leur formation en pharmacologie cellulaire et leur sympathie, sans oublier, Pauline, Mélodie et Marjorie pour leur accueil très amical « chez les bio ». Je n'oublie pas les collègues de Pau Monsieur le Professeur Brice BOUYSSIERE (sans qui je n'aurai pu assister à ce magnifique congrès de l'IMSC 2016 à Toronto au Canada), Carine ARNAUDGUILHEM, Sandra MOUNICOU et Agnès HAGEGE pour leur sympathie et leur soutien.

Mes remerciements vont également au personnel du LMP et tout d'abord à Monsieur Gilles VALETTE qui s'est parfois demandé s'il était toujours en charge du MALDI tellement je lui demandais de pouvoir utiliser l'appareil pour toutes mes manips et qui a su être de très bon conseil dans les moments difficiles. Je remercie également Monsieur Guillaume CAZALS qui a toujours fait preuve de sympathie et de patience à mon égard. Je n'oublie pas également Monsieur Aurélien LEBRUN, Madame Karine PARA, Madame Magalie LEFEBRE à qui j'ai trop souvent « piqué » la balance pour mes pesées de peptide et Madame Patricia HAVELANGE pour sa bonne humeur permanente.

Je souhaiterais remercier mes collègues doctorants Erwann, Mathéo, Thibault, Clément B et grand Clément S, Cécile, Mathieu, Jérémy ainsi que les post-doctorants Roberto, Lubomir (qui m'a surnommé «

MALDI man » après 1 an et demi de manips). Je remercie également Victor DELORME et bien sûr Julie DEROCLE grâce à qui l'ambiance dans le bureau était toujours agréable. Je n'oublie pas tous les permanents que j'ai pu côtoyer à la faculté pharma ou à la faculté des sciences ainsi que tous les doctorants et stagiaires que je n'ai pu citer et qui m'ont tous apporté quelque chose.

Je souhaiterais particulièrement remercier les membres proches de mon équipe Monsieur le Docteur Sébastien DUTERTRE qui a bien fait peur à tout le monde en ramenant ses bestioles venimeuses dans son bureau et pour qui le venin, c'est bien ! Je remercie également chaleureusement Emmanuelle CORDEAU postée à 1 m plus ou moins un mur de mon bureau et avec qui j'ai partagé une paillasse pendant 3 ans (heureusement qu'on n'était pas tout le temps en même temps dessous).

Je souhaiterais aussi remercier profondément Madame le Docteur Sonia CANTEL pour son encadrement, ses conseils en MALDI, ses encouragements et le soutien sans failles tout au long de ces 3 années. Je pense également au soutien indéfectible dans les moments difficiles et le temps accordé à résoudre mes problèmes. Pour cela, je lui témoigne mon plus profond respect.

Je souhaiterais également présenter mes plus sincères remerciements à Madame le Professeur Christine ENJALBAL pour l'accueil au sein de l'équipe, la formation au dépôt MALDI (extrêmement utile étant donné la quantité de dépôts que j'ai dans les mains maintenant) et à la fragmentation peptidique. Je pense également à toute l'aide apportée grâce à ses connaissances en spectrométrie de masse et à son expérience. Je lui témoigne toute ma reconnaissance pour toutes les connaissances et astuces transmises, le temps qu'elle m'a toujours accordé même dans mes moments difficiles malgré la charge de travail, et pour son humanisme.

Enfin je souhaiterais remercier ma famille sans qui je ne serai pas arrivé là où je suis. Je pense à mes parents, mon frère et ma sœur que je n'ai pas vu souvent étant donné la distance (Annecy, Paris et Caen, ce n'est pas à côté). Je n'oublie pas ma grand-mère, sans qui l'installation à Montpellier n'aurait pu se faire dans les bonnes conditions dans lesquelles elle s'est faite, sans oublier mon parrain pour l'appartement. Je pense également à mon arrière-grand-mère qui m'a vu démarrer ma thèse. J'adresse enfin toute mes plus profonds remerciements envers Suelen qui partage ma vie et qui a toujours été à mes côtés dans les moments heureux et difficiles, qui a su comprendre la difficulté de mon travail et qui n'a jamais cessé de croire en moi.

Productions scientifiques

Publication :

Quantitative MALDI-MS Binding Assays: An Alternative to Radiolabeling, M.Rossato, G.Miralles, C.M'kadmi, M.Maingot, M.Amblard, B.Mouillac, D.Gagne, J.Martinez, G.Subra, C.Enjalbal and S.Cantel, *Chem. Med. Chem.*, **2016**, *11*, DOI : 10.1002/cmdc.201600447.

Communications orales :

1. Measuring molecular interactions in pharmacological assays by mass spectrometry, M. ROSSATO, S. CANTEL, C.ENJALBAL, P. VERDIE, G. SUBRA, D. GAGNE, J. MARTINEZ, Journées de restitution des projets 2012-2015 du LabEx CheMISyst, Montpellier, 2 – 4 novembre 2015, France.
2. Quantification of modified peptides by MALDI-ToF mass spectrometry, M. ROSSATO, G. MIRALLES, S. CANTEL, M.AMBLARD, C. M'KADMI, D. GAGNE, J. MARIE, B. MOUILLAC, J. MARTINEZ, C. ENJALBAL, G. SUBRA, GFPP 2015, Port-bail, 17-22 Mai 2015, France.
3. Quantification de peptides modifiés par spectrométrie de masse MALDI-ToF , M. ROSSATO, S. CANTEL, C. ENJALBAL, P. VERDIE, G. SUBRA, D. GAGNE, J. MARTINEZ, XX^{è} RCJSM, La bégude de Mazenc, 23-27 Mars 2015, France.
4. Présentée par un membre de l'équipe : Sensitive MALDI MS quantification of modified peptides for receptor-ligand targeted binding assays, S. CANTEL, M.ROSSATO, C. ENJALBAL, P. VERDIE, G. SUBRA, D. GAGNE, J. MARTINEZ, Balard Chemistry Conference – Self Assembly of Biomolecules – La Grande Motte, 12-15 Octobre 2014, France.
5. Optimisation de la détection de peptides modifiés par spectrométrie de masse MALDI-ToF , M. ROSSATO, S. CANTEL , C. ENJALBAL C, P. VERDIE, G. SUBRA, D. GAGNE, J. MARTINEZ, SMAP 2014, Lyon, 30 Juin – 2 Juillet 2014, France.

Communication par poster :

1. MALDI mass spectrometry and CHCA labelling as a powerful tool for peptide quantitation in biology, M. ROSSATO, J. MARTINEZ, M.AMBLARD, G.SUBRA, S.CANTEL, C.ENJALBAL, IMSC 2016, Toronto, 20-26 Août 2016.
2. Evaluation par MALDI-ToF de l'adsorption de peptides sur les parois de contenants et estimation de la perte encourue pour des échantillons dilués, M. ROSSATO, V. DELORME, S. CANTEL, C. ENJALBAL, SMAP 2015, Ajaccio, 15-18 Septembre 2015.
3. Measuring molecular interactions in pharmacological assays by mass spectrometry, M. ROSSATO, S. CANTEL, C. ENJALBAL, P. VERDIE, G. SUBRA, D. GAGNE, J. MARTINEZ, Balard Chemistry Conference – Self-Assembly of Biomolecules, La Grande-Motte, 12-15 Octobre 2014, France.

Préambule

Ce mémoire de thèse a été conçu comme le reflet d'un projet multidisciplinaire et multi équipes entre différentes composantes de la chimie et de la pharmacologie ; il a également comme objectif de montrer les possibilités offertes par des collaborations interdisciplinaires et la mise en commun des savoirs. Il a également été conçu comme l'aboutissement d'une formation qui a été initiée en chimie organique, poursuivie par ce projet de thèse axée principalement sur la spectrométrie de masse MALDI et complétée par un apprentissage de la pharmacologie. Tous ces aspects et toutes ces sensibilités ont été instillés dans ce mémoire.

Ce mémoire est conçu en trois axes pour donner une vision globale de ce projet de thèse. Le premier axe concerne le contexte bibliographique et une discussion pour chacun des 4 domaines scientifiques abordé par ce projet de thèse :

- L'aspect pharmacologique : il ouvrira la discussion en abordant le sujet d'étude, le récepteur couplé aux protéines G et les modèles d'étude des travaux de recherche, avant de passer à la théorie de la liaison d'un ligand à son récepteur en abordant les différentes expérimentations existantes pour définir et déterminer l'affinité du premier envers le second. Enfin la discussion s'orientera vers les différentes approches actuellement en vigueur pour la mesure d'affinité et le criblage des récepteurs.
- La dilution isotopique : Aspect central de cette thèse, le chapitre dédié à cette thématique apportera une vision historique de l'arrivée de la dilution isotopique en spectrométrie de masse avant de proposer une introduction à la quantification par dilution isotopique au travers de principes. Par la suite, la discussion s'orientera sur les techniques de marquage chimique au service de la quantification par dilution isotopique ; viendront ensuite les techniques à base de marquage métabolique et enfin les approches dites « label-free ».
- La spectrométrie de masse MALDI : Plate-forme d'étude privilégiée de ces travaux de recherche, cette branche de la spectrométrie de masse fera l'objet d'une discussion autour d'aspect fondamentaux qui font l'essence de cette technique. Il sera alors question du développement de la technique MALDI avec un aspect historique, poursuivi par une discussion autour des deux modèles principaux décrivant le processus d'ionisation MALDI. Enfin, la quantification en spectrométrie de masse MALDI sera abordée autour de deux idées que sont l'application de la dilution isotopique à cette technique et deux approches thermodynamiques.
- La synthèse peptidique : Aspect très important car complémentaire des autres aspects de ce projet de thèse, la synthèse peptidique sera discutée sous un aspect historique, en exposant ses principes avant d'aborder la problématique de la protection des fonctions

chimiques et un aspect primordial, à savoir les agents de couplage. Enfin, les peptides synthétisés dans le cadre de ces travaux seront présentés.

Le deuxième axe concerne les travaux de recherche entrepris au cours de ces 3 dernières années ; il sera divisé en 3 parties et sera le reflet de ce projet interdisciplinaire, en ce sens que chacun des deux chapitres consacrés à la discussion des résultats comportera un aspect synthèse, un aspect analytique et un aspect pharmacologique :

- Présentation du projet de thèse : Ce chapitre a pour objectif de présenter le sujet des travaux et de les positionner dans le contexte actuel. Il mettra également en perspective les aspects scientifiques qui ont abouti à ce projet.
- Premier système d'étude, le couple ligand/récepteur AVP/V_{1A} : Ce chapitre est dédié d'une part à l'étude du récepteur V_{1A}, d'autre part à la mise au point de tout le procédé analytique dans sa globalité. Il sera question de la synthèse des matières premières que sont les peptides modifiés envers la spectrométrie de masse MALDI qui sera au centre de ce chapitre via les développements méthodologiques et analytiques entrepris ainsi que via des expériences d'imagerie. Enfin, la méthodologie sera appliquée à l'objectif de ces travaux que représente la mesure de l'interaction entre un ligand et un récepteur couplé aux protéines G.
- Second système d'étude, le couple ligand/récepteur CCKB/CCKB-R : Ce chapitre sera dédié aux synthèses entreprises dans le cadre de l'étude de ce récepteur, dans un second temps à l'application de la méthodologie mise au point en spectrométrie de masse et, dans un troisième temps à la mesure d'interaction ligand/récepteur. Enfin une discussion sera proposée à propos de l'élucidation structurale de petites molécules à partir d'études en spectrométrie de masse en tandem.

La troisième partie, quant à elle, sera entièrement dédiée aux conclusions de ces travaux de recherche et aux perspectives amorcées pour de futurs développements ambitieux.

Sommaire

REMERCIEMENTS ..... **IV**

PRODUCTIONS SCIENTIFIQUES ..... **VI**

PREAMBULE ..... **VII**

SOMMAIRE ..... **IX**

LISTE DES SIGLES ET ABREVIATIONS ..... **XI**

PARTIE A – CONTEXTE BIBLIOGRAPHIQUE **13**

CHAPITRE 1 : LA PHARMACOLOGIE : PRESENTATION DES RCPG, THEORIE DE LA LIAISON D'UN LIGAND A SON RECEPTEUR ET APPROCHES ACTUELLES POUR LE CRIBLAGE DE RECEPTEURS **14**

I. LES RCPG 15
II. THEORIE DE LA LIAISON D'UN LIGAND A SON RECEPTEUR 40
III. APPROCHES ACTUELLES EMPLOYEES POUR LE CRIBLAGE DES RCPG 46
CONCLUSION 60

CHAPITRE 2 : LA QUANTIFICATION PAR DILUTION ISOTOPIQUE DE PEPTIDES **62**

I. HISTORIQUE ET FONDEMENTS DE LA METHODE SID 62
II. INTRODUCTION A LA QUANTIFICATION DE PEPTIDES PAR DILUTION ISOTOPIQUE EN SPECTROMETRIE DE MASSE 77
III. LES TECHNIQUES DE MARQUAGE CHIMIQUE POUR LA QUANTIFICATION DE PEPTIDES PAR SID 85
IV. LES TECHNIQUES A BASE DE MARQUAGE METABOLIQUE POUR LA QUANTIFICATION DE PEPTIDES PAR SID 114
V. LA QUANTIFICATION DE PEPTIDES PAR LES APPROCHES LABEL-FREE 122
CONCLUSION 135

CHAPITRE 3 : LA SPECTROMETRIE DE MASSE MALDI - APPROCHE HISTORIQUE, FONDAMENTALE ET APPLIQUEE **137**

I. DEVELOPPEMENT DE LA TECHNIQUE MALDI 137
II. LES MODELES POUR DECRIRE L'IONISATION MALDI 158
III. LA QUANTIFICATION EN SPECTROMETRIE DE MASSE MALDI-TOF 182
CONCLUSION 190

CHAPITRE 4 : LA SYNTHESE PEPTIDIQUE EN QUATRE POINTS : PRINCIPE, STRATEGIES, AGENTS DE COUPLAGES ET CHOIX POUR LES PEPTIDES SYNTHETISES **193**

APPROCHE HISTORIQUE DE LA SYNTHESE PEPTIDIQUE 193
I. PRINCIPES FONDAMENTAUX DE LA SYNTHESE PEPTIDE 194
II. LA PROTECTION DES ACIDES AMINES AU SERVICE DES STRATEGIES DE SYNTHESE EN PHASE LIQUIDE ET SOLIDE 196
III. AGENTS DE COUPLAGES HISTORIQUES ET RECENTES AVANCEES 203
IV. PRESENTATION DES PEPTIDES SYNTHETISES DANS LE CADRE DE CES TRAVAUX DE THESE 212
CONCLUSION 213

PARTIE B – TRAVAUX DE THESE **215**

CHAPITRE 1 : PRESENTATION DU PROJET DE RECHERCHE **216**

I. LE CONTEXTE DANS LEQUEL S'INSCRIVENT CES TRAVAUX DE THESE 216
II. LE CHEMINEMENT SCIENTIFIQUE A L'ORIGINE DE CE PROJET DE RECHERCHE 216

CHAPITRE 2 : LE PROJET AVP/V_{1A} **219**

I. INTRODUCTION 219
II. LES DIFFERENTS MODES DE SYNTHESE 219
III. CONTROLE QUALITE DES PEPTIDES 224
IV. ETUDE PAR SPECTROMETRIE DE MASSE MALDI DE LA STABILITE DU PEPTIDE MR 6 241

V. Developpements methodologiques en spectrometrie de masse MALDI : Etude de la detection des peptides et du depot avec MR 6-D_0 247
VI. Etudes autour du processus de manipulation de l'echantillon 269
VII. Etude statistique de la quantification directe et etalonnage externe 277
VIII. Quantification classique par dilution isotopique avec droite d'etalonnage 290
IX. Etudes d'imagerie sur MR 6 294
X. Etude de detection du peptide MR 6-D_0 en ESI sur QqQ et Q-ToF 305
XI. Le modele ligand/recepteur AVP/V_{1A} 309
Conclusion 340

CHAPITRE 3 : LE PROJET CCKB-R 341

I. Introduction 341
II. La synthese manuelle de peptides sur support solide 341
III. La synthese d'acides amines modifies 342
IV. Controle qualite des peptides 350
V. LC-MS : massifs isotopiques 352
VI. Controle par MS^2 : caracterisation des sequences peptidiques 353
VII. Etudes en spectrometrie de masse des peptides du projet CCKB-R 356
VIII. Application a CCKB-R Modele CCKB/CCKB-R : 363
IX. Etudes sur la fragmentation d'acides amines modifies pour CCKB-R 372
Conclusion 379

PARTIE C – CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES 380

I. Le MALDI-SID-MS, une nouvelle approche de quantification appliquee aux peptides 382
II. Le developpement de marqueurs a charge preformee 382
III. Le premier peptide synthetise et les tests preliminaires de fragmentation 387

PARTIE D – PARTIE EXPERIMENTALE 389

I. Appareillages et methodes analytiques 390
II. Syntheses et caracterisations 409
III. Modes operatoires detailles des experiences de pharmacologie 432

LISTES DES FIGURES, ILLUSTRATIONS, EQUATIONS, SCHEMAS REACTIONNELS ET TABLEAUX 439

TABLE DES MATIERES DETAILLEE 463

PARTIE E – *ANNEXES* 471

I. Tableau de developpement des matrices MALDI 473
II. Pour aller plus loin 478

Liste des sigles et abréviations

AVP : « Arginine vasopressine »

B_{max} : Grandeur traduisant la capacité maximale de liaison d'une cellule ou d'une préparation membranaire pour un ligand. Cela correspond à la quantité maximale du récepteur d'intérêt (en fmol) par masse de protéine membranaire (en mg).

BSA : « Bovin Serum Albumin »

CCKB-R : « Cholecystokinine B receptor »

CID : « Collision induced dissociation »

CV : Coefficient de Variation

DIC : Diisopropylcarbodiimide

DIEA : Diisopropyléthylamine

DiOia : Dionxindolyl-L-alanine

DMAP : 4-diméthylaminopyridine

DMF : Diméthylformamide

EDTA : acide éthylènediaminetétracétique

Et_2O : Diéthyléther

FAB : « Fast atom bombardment »

Fmoc : 9-fluorènylméthyloxycarbonyle

RCPG : Récepteur couplé aux protéines G

HATU : Hexafluorophosphate de O-(4-Azabenzotriazol)-*N*,*N*,*N'*,*N'*-tetramethyluronium

HBTU : Hexafluorophosphate de O-(Benzotriazol-1-yl)-*N*,*N*,*N'*,*N'*-tetramethyluronium

HCC- : « 4-hydroxy-α-cyanocinnamyl »

HCCA : « 4-hydroxy-α-cyanocinnamic acid »

HCCE : « 4-hydroxy-α-cyanocinnamic ethyl ester »

HOBt : Hydroxybenzotriazole

HO-LVA : « Hydroxy Linear vasopressin receptor antagonist »

HPLC : « High Performance Liquid Chromatography »

HRMS : « High Resolution Mass Spectrometry »

K_d : Constante de dissociation d'un ligand envers son récepteur calculée suite à une expérience de saturation à l'équilibre.

K_i : Constante de dissociation d'un ligand envers son récepteur calculée à partir d'une expérience de liaison compétitive avec un autre ligand dont le K_d est connu.

Kyn : Kynurénine

LIFT : Désigne la structure servant à augmenter le potentiel des ions dans le tube de vol d'un appareil MALDI-ToF/ToF pour former des ions métastables et obtenir des fragmentations

LLOQ : « Lowest Limit Of Quantification »

LoD : « Limit of Detection »

LoQ : « Limit of Quantification »

MRM : « Multi Reaction Monitoring »

MeCN : Acétonitrile

MRx : Classification des composés

Oia : Oxindolyl-L-alanine

SEM : « Standard Error on Mean »

SID-MS : « Stable isotope dilution mass spectrometry »

SIM/SIR : « Single Ion Monitoring / Single Ion Recording »

SPPS : « Solid Phase Peptide Synthesis »

SNAP-tag : « Synaptosomal-associated protein »

^{t}Boc : *t*-Butylcarbonate

$^{t}Boc_2O$: Di-*tert*-butyl dicarbonate

TEA : Triéthylamine

TFA : « Trifluoroacetic acid »

TIS : Triisopropylsilane

V_{1A} : Récepteur de l'hormone peptidique AVP

Partie A – Contexte bibliographique

Chapitre 1 : La pharmacologie : présentation des RCPG, théorie de la liaison d'un ligand à son récepteur et approches actuelles pour le criblage de récepteurs

La pharmacologie est un domaine appartenant aux sciences du vivant. Elle fait partie de la très large biologie qui est issue des deux mots grecs « βιος », *bios* en français qui signifie « vie » et « λογος », *logos* qui signifie « discours » ou encore « parole ». La pharmacologie s'intéresse plus précisément aux mécanismes qui régissent les interactions entre une substance dite active et un organisme parcouru par celle-ci. On parlera alors de substance « bioactive » car ayant une activité sur un organisme vivant via ses cellules. Lorsqu'il est question d'une interaction entre une substance bioactive et un organisme, celle-ci va donc agir par l'intermédiaire d'un récepteur qui peut être membranaire ou nucléaire. Il en existe une incroyable diversité comme les TLR (« Toll Like Receptor » ou récepteur de type Toll en Français) qui appartiennent à la famille des récepteurs de reconnaissance de motifs moléculaires (PRR pour « Pattern Recognition Receptor »).[1,2] Ceux-ci sont impliqués dans les mécanismes de l'immunité innée à travers la reconnaissance de motifs communs à de nombreux agents pathogènes.

Il existe également une large classe de récepteurs transmembranaires auxquels nous allons nous intéresser plus précisément dans ce chapitre : les RCPG pour « Récepteur Couplé aux protéines G ». Ces derniers sont très présents dans le monde vivant tant chez les mammifères comme l'Homme que chez les arthropodes ou même chez les champignons et levures.[3] Les RCPG ont été largement étudiés via différents types d'expérimentations qui ont été mises au point afin d'en comprendre la structure et l'activité comme la mutation dirigée de résidus au sein d'un récepteur pour en comprendre le rôle.[4] D'autres expérimentations comme la mesure de la liaison d'un ligand à son récepteur par des mesures cinétiques permettent de connaître le temps que mettra un ligand à se lier à son récepteur. D'autres grandeurs, thermodynamiques, nous renseignent également sur les constantes d'équilibre de ces molécules envers leur récepteur. Dans un premier temps, nous nous pencherons sur les RCPG, leur nature, leurs classes, leur rôle avant de passer dans un second temps à la théorie de la liaison d'un ligand à son récepteur. Enfin, nous nous intéresserons à différentes techniques de criblage de RCPG.

[1] S. Akira, K. Takeda, *Nat. Rev. Immunol.* **2004**, *4*, 499–511
[2] S. Akira, *Current Opinion in Immunology* **2003**, *15*, 5–11
[3] R. Fredriksson, *Molecular Pharmacology* **2005**, *67*, 1414–1425.
[4] N. Cotte, M. N. Balestre, A. Aumelas, E. Mahé, S. Phalipou, D. Morin, M. Hibert, M. Manning, T. Durroux, C. Barberis, et al., *Eur. J. Biochem.* **2000**, *267*, 4253–4263

I. Les RCPG

Au sein d'un organisme vivant, certains signaux impliqués dans les différentes modifications d'activité des cellules proviennent de molécules extérieures à celles-ci. Elles peuvent être très différentes comme les neurotransmetteurs, les facteurs de croissances ou encore les hormones. Les éléments permettant la réception de ces signaux, les récepteurs membranaires, sont alors l'interface entre le stimulus extérieur à la cellule et sa continuation à l'intérieur de cette dernière. Ces stimuli sont de natures très diverses et variées allant d'acides aminés à des protéases en passant par des toxines, des lipides, des hormones glycoprotéiques, des molécules sensorielles et même des photons. Il existe trois classes de protéines qui peuvent être discriminées par leur structure moléculaire et leur mode d'action :

- Les canaux ioniques activés par un ligand. Ceux-ci peuvent permettre une diffusion passive d'ions qui suivent un gradient, on parle alors de canaux ioniques. Ils sont présents dans les membranes de toutes les cellules et permettent la circulation des ions entre le milieu intracellulaire et le milieu extracellulaire. Ils peuvent également permettre une diffusion active d'ions allant à l'encontre d'un gradient, on parle alors de pompe membranaire comme la pompe sodium-potassium qui nécessite de l'énergie.[5] Celle-ci joue un rôle très important dans le maintien du potentiel de repos des cellules nerveuses, musculaires et cardiaques.
- Les récepteurs avec activité enzymatique qui peuvent être activés par la liaison d'un ligand. C'est le cas notamment du récepteur à l'insuline[6] ou encore du facteur de croissance des neurones (NGF pour « Nerve Growth Factor »).[7]
- Les RCPG largement représentés au sein des membranes cellulaires. Cette classe est composée de récepteurs qui vont transduire le signal reçu (voir Figure 1 P.16) via des protéines hétérotrimériques ou monomériques, les protéines G. Cela consiste en la transmission du signal extérieur, ou stimulus, et le déclenchement d'une cascade de signalisation à l'intérieur de la cellule.

I.A. Descriptif des RCPG

Les récepteurs couplés aux protéines G sont une très large famille de protéines avec pour caractéristique commune d'être composée d'une longue chaîne polypeptidique qui présente sept régions hydrophobes transmembranaires connectées par trois boucles intracellulaires et trois boucles extracellulaires. Le génome humain code pour environ 800 RCPG qui peuvent tout aussi bien participer à la détection la lumière que des hormones, des facteurs de croissance, des drogues et

[5] B. R. Larsen, A. Stoica, N. MacAulay, *Frontiers in Physiology* **2016**, *7*,
[6] M. F. White, C. R. Kahn, *J. Biol. Chem.* **1994**, *269*, 1–4
[7] C. Pincelli, M. Yaar, *Journal of Investigative Dermatology Symposium Proceedings* **1997**, *2*, 31–36

composés thérapeutiques. Environ 150 RCPG trouvés à partir du génome humain possèdent des ligands encore inconnus et sont appelés « récepteurs orphelins », ils seront abordés plus en détails au paragraphe I.G p.33. L'extrémité externe des RCPG est constituée par le côté N-terminal, la plupart du temps impliquée dans la liaison du ligand, tandis que l'extrémité intracellulaire est constituée par le côté C-terminal du récepteur (Figure 1 p.16). C'est à cette extrémité ou aux boucles intracellulaires que sont liées les protéines G qui déclenchent la cascade de signalisation intracellulaire.

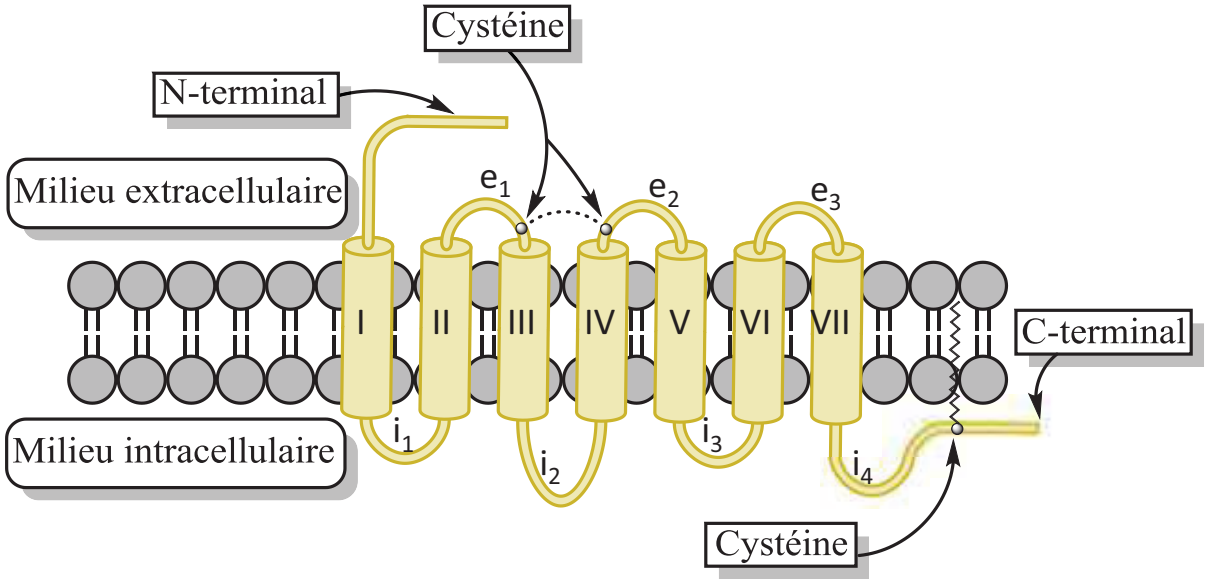


Figure 1 : Représentation schématique d'un récepteur couplé aux protéines G (RCPG). Ce type de récepteur est composé de 7 domaines transmembranaires (I, II, …., VII), de 3 boucles extracellulaires (e_1, e_2 et e_3), de 4 boucles intracellulaires (i_1, i_2, i_3 et i_4) et d'un pont disulfure entre les boucles e_1 et e_2. Il présente son côté N-terminal au milieu extracellulaire et son côté N-terminal au milieu intracellulaire

Ces récepteurs couplés aux protéines G produisent un effet grâce à l'activité d'un effecteur. Celui-ci peut être l'ouverture ou la fermeture d'un canal, l'inhibition ou l'activation de l'adényl-cyclase, l'inhibition ou l'activation d'une enzyme comme la phospholipase C ou encore d'une phosphodiestérase. C'est la transduction du signal : la transmission d'un stimulus extérieur à travers la membrane plasmique qui joue le rôle d'interface via ces récepteurs transmembranaires. Lors de la transduction du signal on a donc trois niveaux d'intervention :

1. Le récepteur transmembranaire (RCPG).
2. La protéine G (pour « Guanine nucleotide-binding protein ») liée, par définition au RCPG.
3. Les effecteurs, protéines qui traduisent le signal reçu par le récepteur en un effet intracellulaire.

La nature des effecteurs est très diverse puisqu'il peut s'agir d'un transport passif à travers un canal ou actif par l'intermédiaire d'une pompe qui permet le passage vers le cytoplasme d'un

second message comme l'ion Ca^{2+}. Cela peut également être une enzyme qui va catalyser la synthèse dans le cytoplasme d'un second message comme l'AMP cyclique obtenue à partir de l'ATP sous l'action de l'adényl-cyclase.

I.B. Les différentes Classes de RCPG

Les RCPG ont été classés par Kolakowski en six familles[8] : la famille des récepteurs de type Rhodopsine (A), les récepteurs de type sécrétine (B), les récepteurs métabotropiques de type glutamate (C), les récepteurs à phéromone fongique des facteurs P et α (D), les récepteurs aux facteurs A et M de phéromone fongique et les récepteurs à AMPc pour « Adénosine Monophosphate cyclique » (F). Plusieurs travaux sur ces familles ont démontré que toutes avaient une origine évolutive commune tout en les regroupant en trois superfamilles définies par Graul et Sadée, les classes A, B et C (voir Figure 2 p.17).[9]

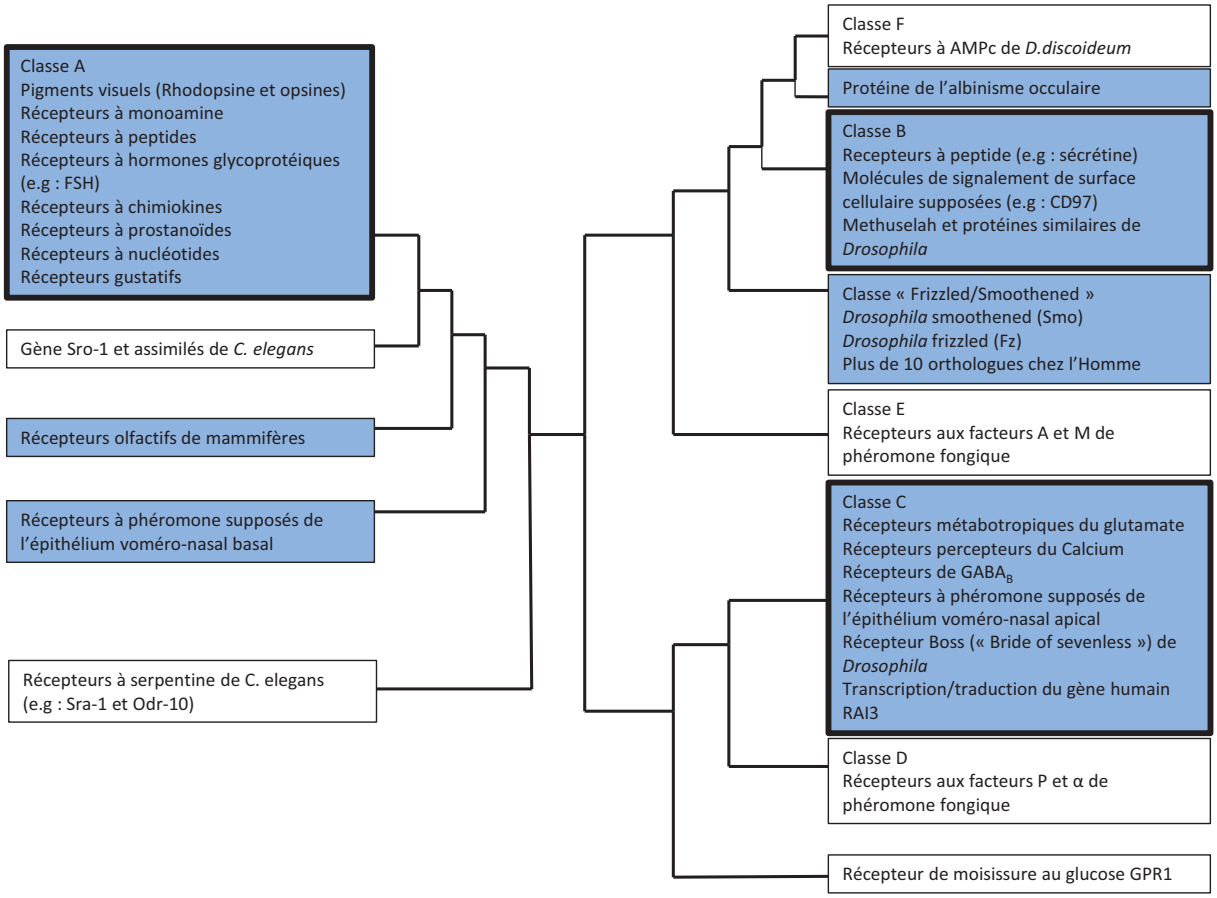


Figure 2 : Vue d'ensemble des liens phylogénétiques entre les classes de RCPG parmi lesquelles les 3 principales classes de RCPG (Classe A, classe B, classe C). Celle-ci est basée sur l'analyse de Graul et Sadée. Les familles de récepteurs présentes chez les mammifères sont surlignées en bleu

[8] L. F. Kolakowski, *Recept. Channels* **1994**, *2*, 1–7
[9] R. C. Graul, W. Sadée, *AAPS PharmSci* **2001**, *3*, E12

I.B.1. Classe A : les récepteurs de type rhodopsine

Ce groupe comprend donc la majorité des RCPG qui lient des substances aminés, puriques, lipidiques, glycoprotéiques sans oublier les récepteurs sensoriels de la vue et de l'odorat (voir Figure 3 p.18).[10] Il comprend également des récepteurs aux protéines, les récepteurs impliqués dans les réponses du système immunitaire et même aux peptides endogènes. On peut trouver parmi ces derniers les récepteurs de la ghréline, de l'ocytocine, de la vasopressine, de la cholecystokinine ou encore de la gastrine.

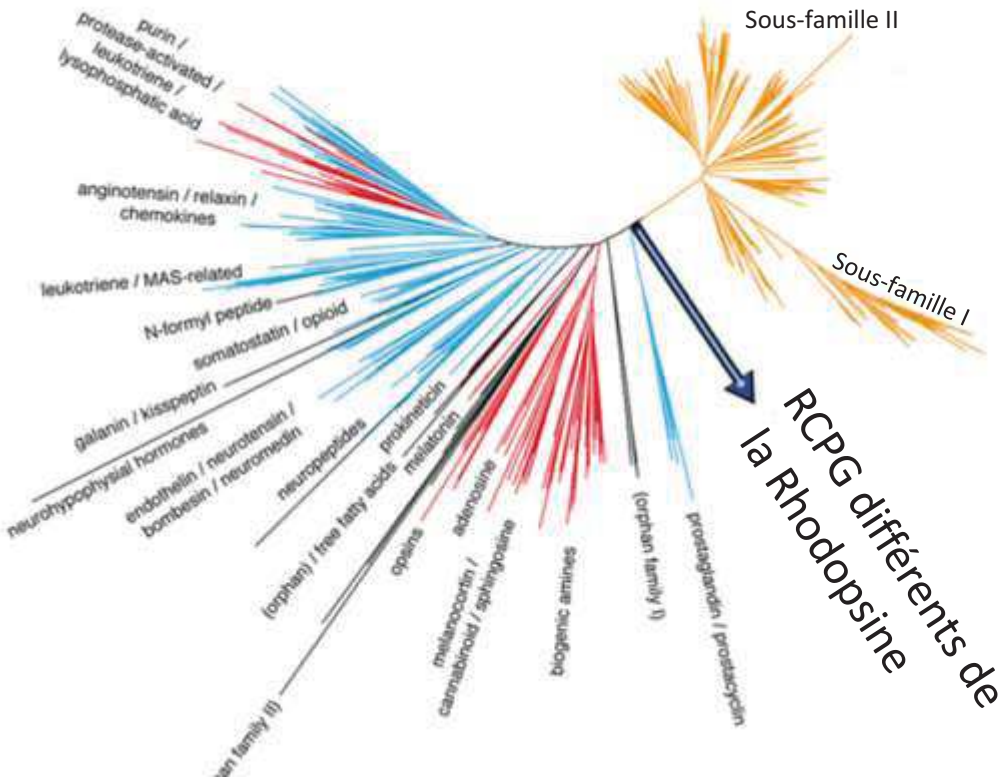


Figure 3 : Représentation phylogénétique des RCPG humains de classe A. L'analyse phylogénétique a été effectuée après assignation des hélices transmembranaires et alignement des séquences des récepteurs, ce qui permet de déterminer des degrés de similitude entre les récepteurs : plus les traits à partir de la ligne courbe centrale sont proches entre eux, plus les séquences des deux RCPG correspondant sont proches. Cette classification est proposée selon les types de ligands connus : en jaune orangé les récepteurs olfactifs, en rouge les récepteurs à petites molécules, en cyan les récepteurs peptidiques et les récepteurs orphelins en noir

La rhodopsine (voir Figure 4 p.19) prototype du RCPG,[11] quant à elle, est un récepteur essentiel impliqué dans la vision. Celui-ci a été l'objet d'intenses études afin d'en découvrir la structure. Les travaux entrepris en 1993 et 1995 par Schertler et Hargrave ont permis d'obtenir une projection électronique et une représentation de ce récepteur à une résolution de 9, 7 et 6 Å par cryo-microscopie.[12,13,14] Plus récemment, en l'an 2000, Palczewski et al. ont réussi à obtenir la

[10] C. Geithe, G. Andersen, A. Malki, D. Krautwurst, *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2015**, *63*, 9410–9420
[11] X. Deupi, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics* **2014**, *1837*, 674–682
[12] G. F. X. Schertler, C. Villa, R. Henderson, *Nature* **1993**, *362*, 770–772

structure cristallographique de ce récepteur avec une résolution de 2,8 Å.[15] Les données fonctionnelles et de structure à propos de la rhodopsine et d'autres récepteurs de cette classe ont permis de mettre en évidence des points de mécanisme communs. Un aspect central de ceci étant une séquence « signature » d'acides aminés largement partagée entre les hélices transmembranaires. La liaison d'un ligand (ou l'isomérisation du rétinal dans le cas de la rhodopsine) modifie les interactions entre les hélices pour aboutir à un mouvement de celles-ci et à un changement conformationnel, point de départ de la transduction du signal.

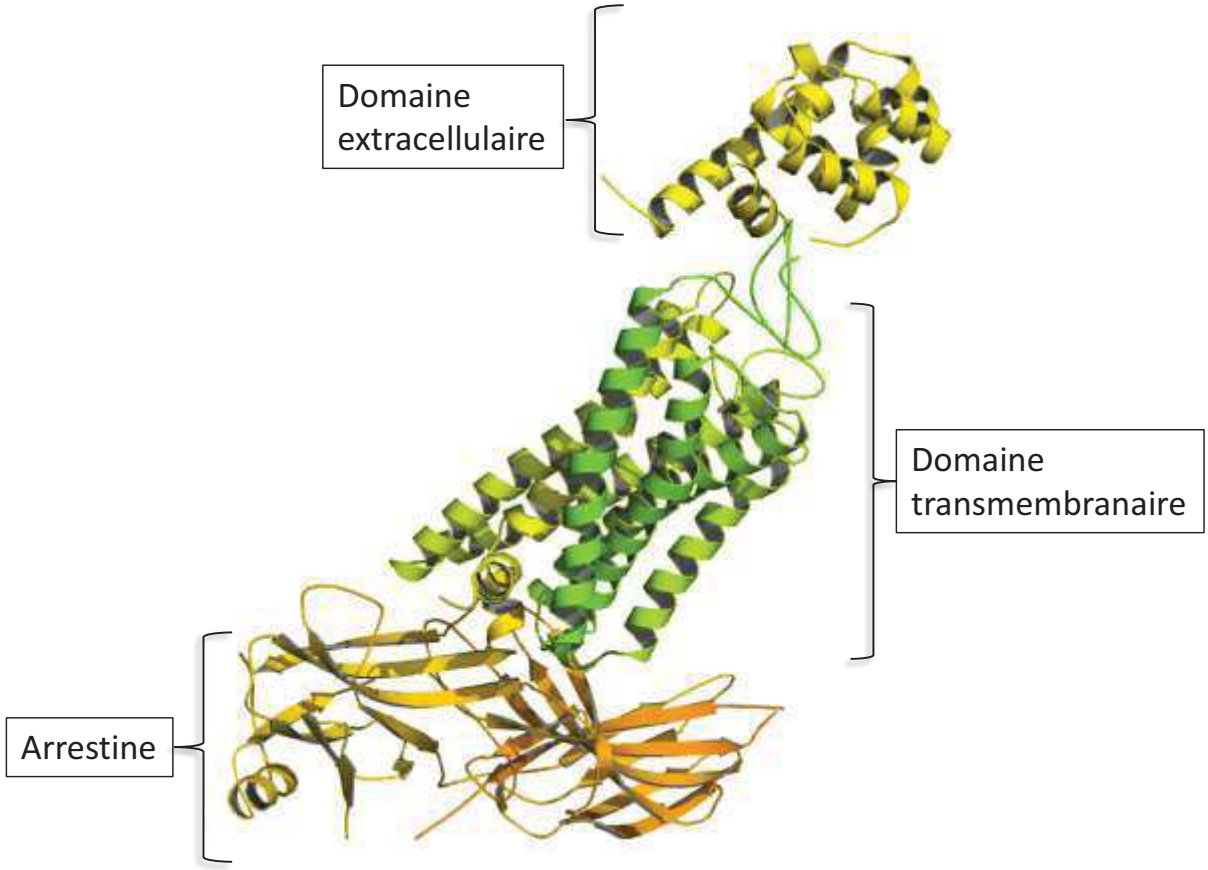


Figure 4 : Structure de la Rhodopsine obtenue par cristallisation et complexée avec l'arrestine, un régulateur de la transduction du signal

I.B.2. Classe B : les récepteurs de type sécrétine et leurs parents

Ce groupe comprend donc le récepteur à la sécrétine ainsi que les récepteurs liés entre eux du point de vue de l'évolution comme le récepteur au glucagon, qui est impliqué dans la régulation de la glycémie (voir Figure 5 ci-dessous).[16,17]

[13] V. M. Unger, G. F. Schertler, *Biophysical Journal* **1995**, *68*, 1776–1786
[14] G. F. Schertler, P. A. Hargrave, *Proceedings of the National Academy of Sciences* **1995**, *92*, 11578–11582
[15] K. Palczewski, *Science* **2000**, *289*, 739–745
[16] M. C. Chapter, C. M. White, A. DeRidder, W. Chadwick, B. Martin, S. Maudsley, *Pharmacology & Therapeutics* **2010**, *125*, 39–54
[17] A. J. Harmar, *Genome Biol.* **2001**, *2*, REVIEWS 3013.1-3013.10

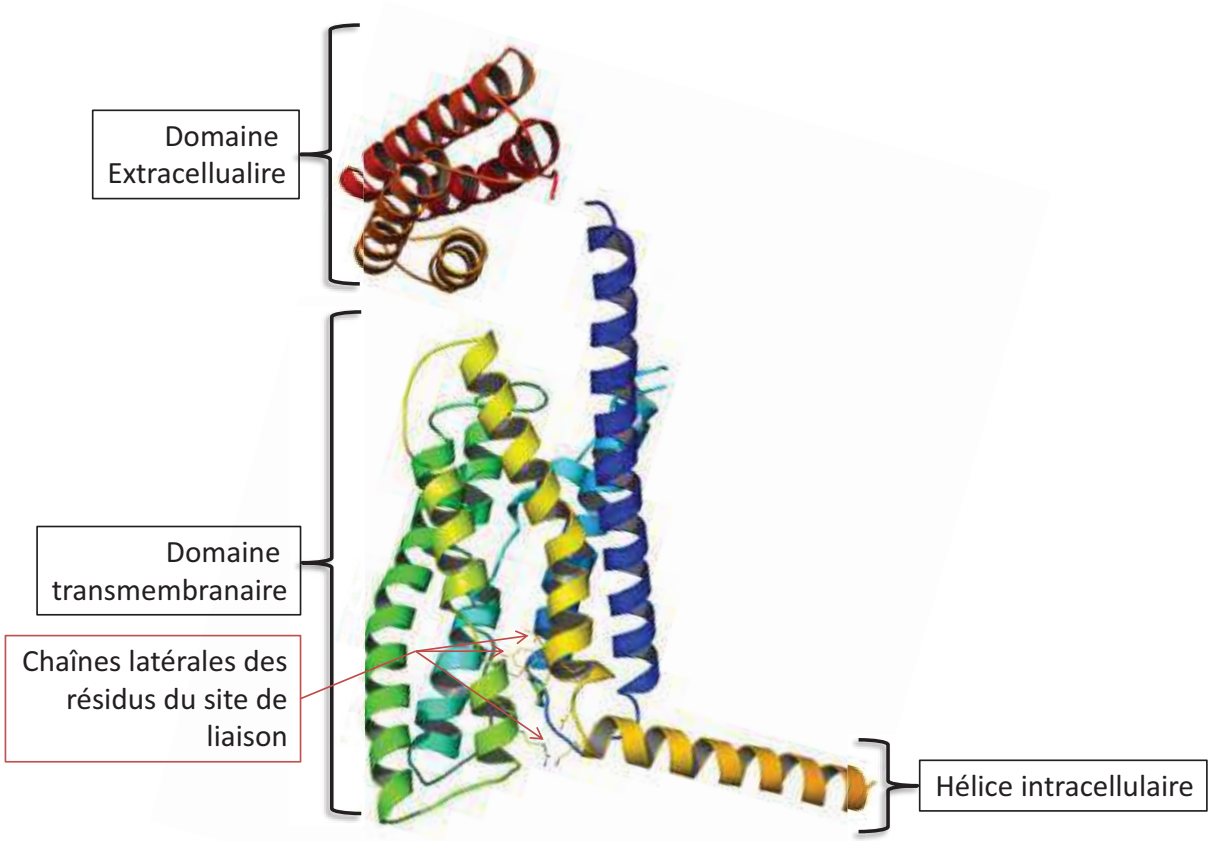


Figure 5 : Structure obtenue par cristallisation du récepteur au glucagon montrant les chaînes latérales des acides aminés du site de liaison. Les récepteurs de cette classe B ont tous la particularité d'avoir un domaine N-terminal particulièrement développé (hélices intracellulaires)

Cette famille inclue des récepteurs de peptide présentant une activité vasoactive dans la région de l'intestin. Bien que les récepteurs de cette classe présentent 7 hélices transmembranaires,[18] cette famille possède sa propre signature transmembranaire à l'instar de la famille A.[19] Il existe trois sous-familles, à savoir B1, B2 et B3 qui regroupent chacune des récepteurs partageant certaines caractéristiques (voir Figure 6 ci-dessous). Ainsi, les membres de la famille B1 sont typiquement des récepteurs à hormones capables de réguler l'AMPc par liaison à l'adényl-cyclase grâce à la protéine G_s, tandis que les membres de la sous-famille B2 ont tous une séquence N-terminale extracellulaire particulièrement longue. Enfin la sous-famille B3 regroupe des récepteurs dont le prototype est le « methuselah » impliqué dans la durée de vie chez la mouche du vinaigre.

[18] F. Y. Siu, M. He, C. de Graaf, G. W. Han, D. Yang, Z. Zhang, C. Zhou, Q. Xu, D. Wacker, J. S. Joseph, et al., *Nature* **2013**, *499*, 444–449
[19] K. Hollenstein, C. de Graaf, A. Bortolato, M.-W. Wang, F. H. Marshall, R. C. Stevens, *Trends Pharmacol. Sci.* **2014**, *35*, 12–22

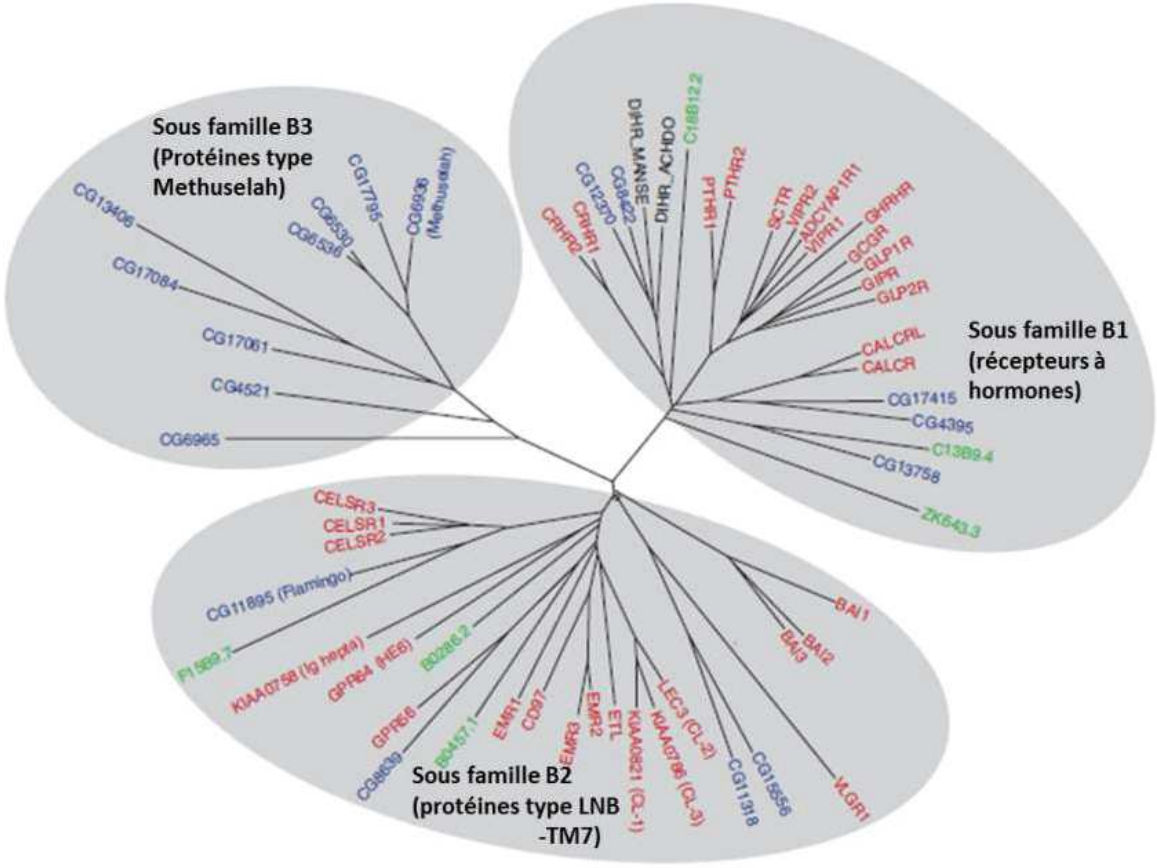


Figure 6 : Représentation phylogénétique de l'importante diversité de la classe B des RCPG suivant le même principe de similitude que la Figure 3. Les récepteurs humains sont en rouge, ceux appartenant à l'espèce *drosophilia* en bleu et ceux appartenant à *C. elegans* en vert. Le nom des gènes est édité selon la nomenclature HUGO, le site de publication Celera et la base de donnée « WormBase »[20,21,22]

I.B.3. Classe C : les récepteurs métabotropiques du glutamate et leurs parents

Ce groupe de RCPG rassemble tous les sous-types de récepteurs métabotropiques de l'acide glutamique et du récepteur GABA.[23] Cette famille de récepteurs (voir Figure 7 ci-dessous) est connue pour exister sous forme de complexes dimériques (récepteur au glutamate) voir trimériques (récepteurs du goût). Du point de vue de la structure les récepteurs de cette classe sont composés :

- D'une séquence signal N-terminale.
- D'une importante région hydrophile extracellulaire de liaison pour l'agoniste présentant un grand nombre de cystéines impliquées dans des ponts disulfure.
- D'une plus petite région comprenant les 7 domaines transmembranaires communs aux structures des RCPG.
- D'un domaine C-terminal intracellulaire.

[20] Comité de nomenclature des genes HUGO: http://www.gene.ucl.ac.uk/nomenclature/ ; A searchable database of human genes, giving official names approved by the Human Genome Organisation (HUGO).
[21] Site de publication Celera: http://public.celera.com/ ; Provides public access to Celera sequence data on the human and Drosophila genomes.
[22] WormBase : http://www.wormbase.org/ : A repository of mapping, sequencing and phenotypic information about the nematode C. elegans and some closely related nematodes.
[23] H. Bräuner-Osborne, P. Wellendorph, A. A. Jensen, *Curr Drug Targets* **2007**, *8*, 169–184

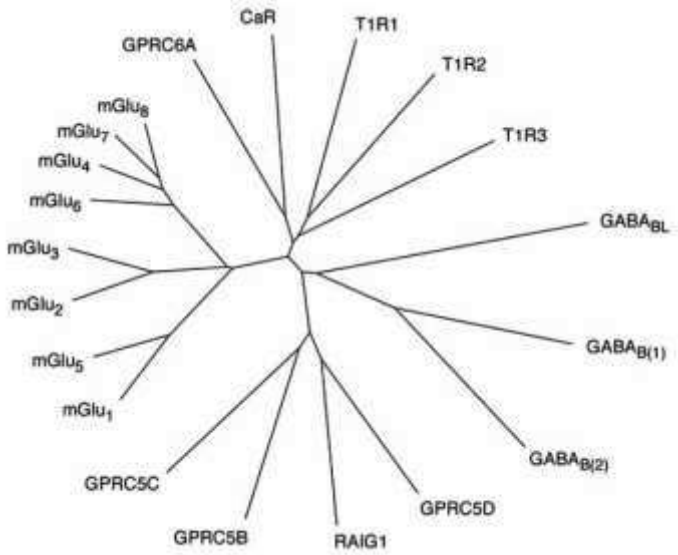


Figure 7 : Représentation phylogénétique des RCPG humain de classe C suivant le même principe de similitude que la Figure 3. Le logiciel ClustalX version 1.81 a été utilisé pour générer un alignement des séquences et la représentation arborescente a pu être générée grâce au logiciel Tree View version 1.6.6. L'échelle des branches de l'arbre sont fonction de la substitution des acides aminés

I.C. La transduction du signal par les protéines G

Le rôle des RCPG est celui d'une interface qui va permettre le transfert d'un signal reçu de l'extérieur de la membrane cytoplasmique vers le cytoplasme via ces récepteurs. Cette transduction permet la transformation du signal initial en un effet intracellulaire à travers différentes cascades de signalisations initiées par les protéines G.

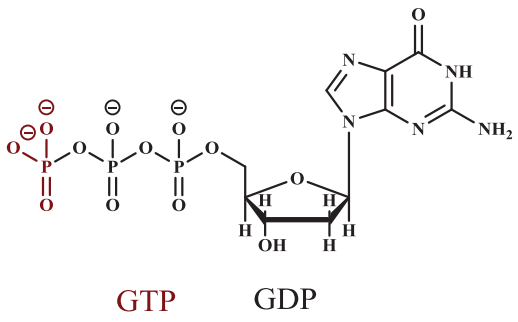


Figure 8 : Structures de la guanosine triphosphate (GTP) avec ses trois groupements phosphate et de la guanosine diphosphate (GDP) avec les deux groupements phosphate en noir

Les protéines G sont des molécules qui permettent le transfert d'information dans les cellules. Leur nom provient de l'utilisation de l'échange GTP/GDP (Guanosine TriPhosphate / Guanosine DiPhosphate ; voir Figure 8 ci-dessus), liés à la protéine G, comme « interrupteur moléculaire » dans l'optique de déclencher ou d'inhiber des réactions biochimiques au sein du milieu intracellulaire. Les protéines G (voir Figure 9 p.23) sont impliquées dans de nombreux processus de régulation et d'éléments métaboliques comme les canaux ioniques, les transporteurs protéiques

ainsi que d'autres parties de la machinerie cellulaire contrôlant la transcription, la motilité[24], la contractilité[25] et les sécrétions. Ces processus et éléments régulent à leur tour diverses fonctions systémiques comme le développement embryonnaire, l'apprentissage et la mémoire ou encore l'homéostasie.[26,27] Ces constituants de la cellule ont valu un prix Nobel de médecine en 1994 à et Martin Rodbell et Alfred G. Gilman pour « *leur découverte des protéines G et du rôle de ces protéines dans la transduction des signaux cellulaires* ».

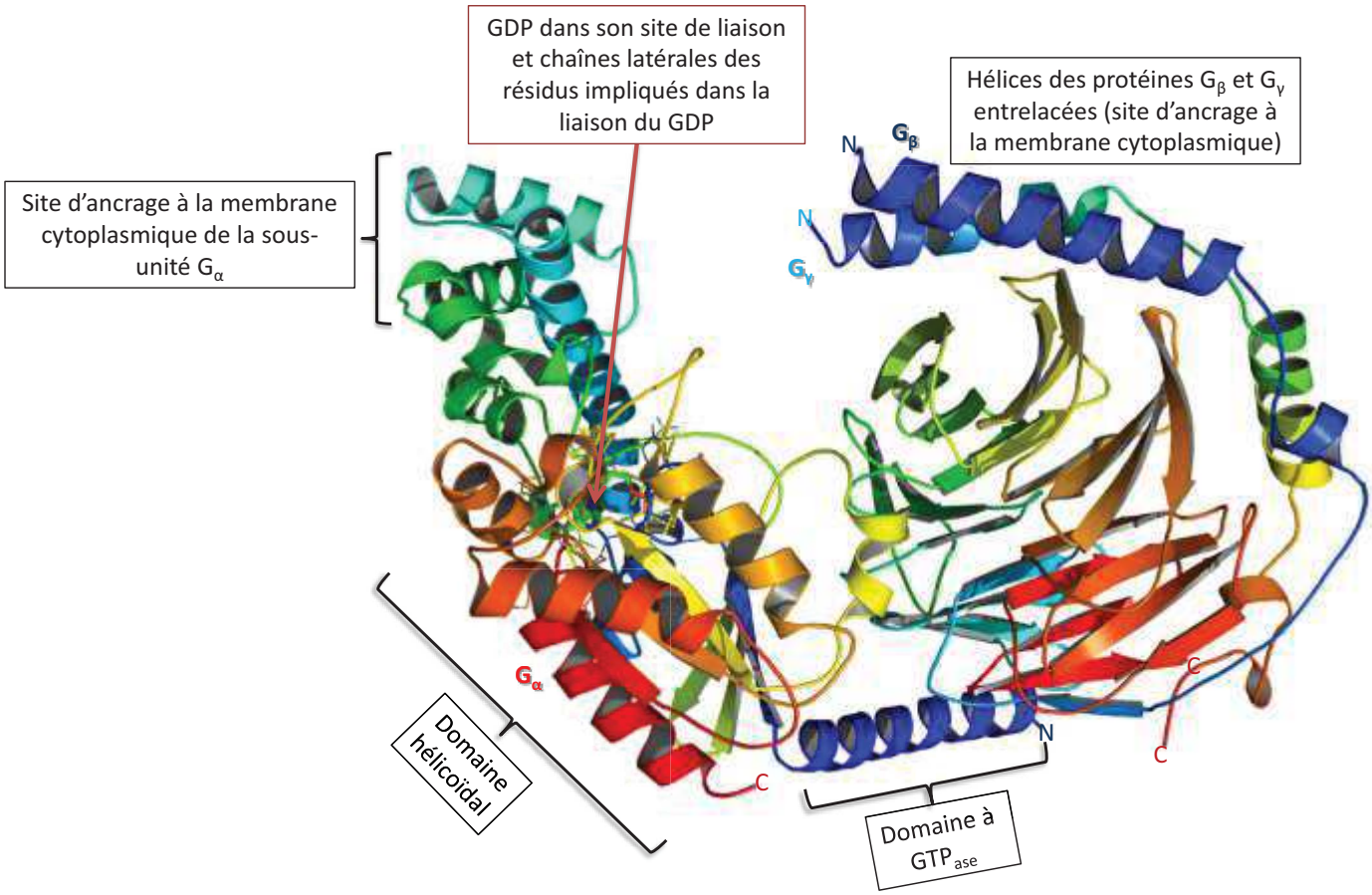


Figure 9 : Structure obtenue par cristallisation d'une protéine G hétérotrimérique avec la sous-unité α à gauche et le GDP lié dans son site d'interaction ; le complexe entre les sous-unités β et γ entrelacées est à droite. La sous-unité γ possède une accroche à la membrane cellulaire qui permet au complexe $G_{\beta/\gamma}$ de rester accroché à la membrane lors de la séparation de la sous unité α

Suite à l'activation du RCPG par la liaison d'un ligand à celui-ci, le « changement conformationnel » du récepteur aura pour effet l'activation de la protéine G liée à celui-ci. En effet, il a été montré que des complexes RCPG-protéine G pouvaient exister sous forme inactive à l'IBMM en

[24] Terme de biologie se référant à la capacité de se déplacer de façon spontanée ou en réponse à un stimulus tout en consommant de l'énergie.
[25] Terme de biologie se référant à la capacité pour l'autocontraction dans les cellules musculaires et les tissus biologiques actifs similaires.
[26] Terme de biologie désignant la propriété d'un système dans lequel des variables sont régulées pour que les conditions internes restent stables et relativement constantes comme un facteur clé maintenu autour d'une valeur bénéfique pour le système considéré grâce à une régulation.
[27] S. R. Neves, P. T. Ram, R. Iyengar, *Science* **2002**, *296*, 1636–1639

2013.[28] Ceci marque le démarrage de la cascade de signalisation, ou voie de transduction du signal, qui inclue notamment le déclenchement d'un effet activateur ou inhibiteur dans le milieu intracellulaire. Ce « changement conformationnel » permet au récepteur de fonctionner comme un facteur d'échange de guanine (GEF pour « Guanine nucleotide exchange factor ») pour l'échange GDP/GTP. Lorsqu'un ligand active le RCPG, la protéine G liée à ce dernier par la sous-unité G_α libère sa GDP de cette dernière qui sera remplacée par une GTP. Ce relargage de GDP a été modélisé à l'IBMM par M. Louet et N. Floquet en 2012, et il a été montré que celui-ci se fait côté phosphate pour un coût énergétique évalué à 15 kcal.mol^{-1} quand la constante de dissociation mesurée à température ambiante est de 10 kcal.mol^{-1}.[29] Cet échange GDP/GTP place le récepteur en position « on ». Cela entraîne la dissociation de la sous-unité G_α du complexe G_β/G_γ et du récepteur (Figure 10 ci-dessous).

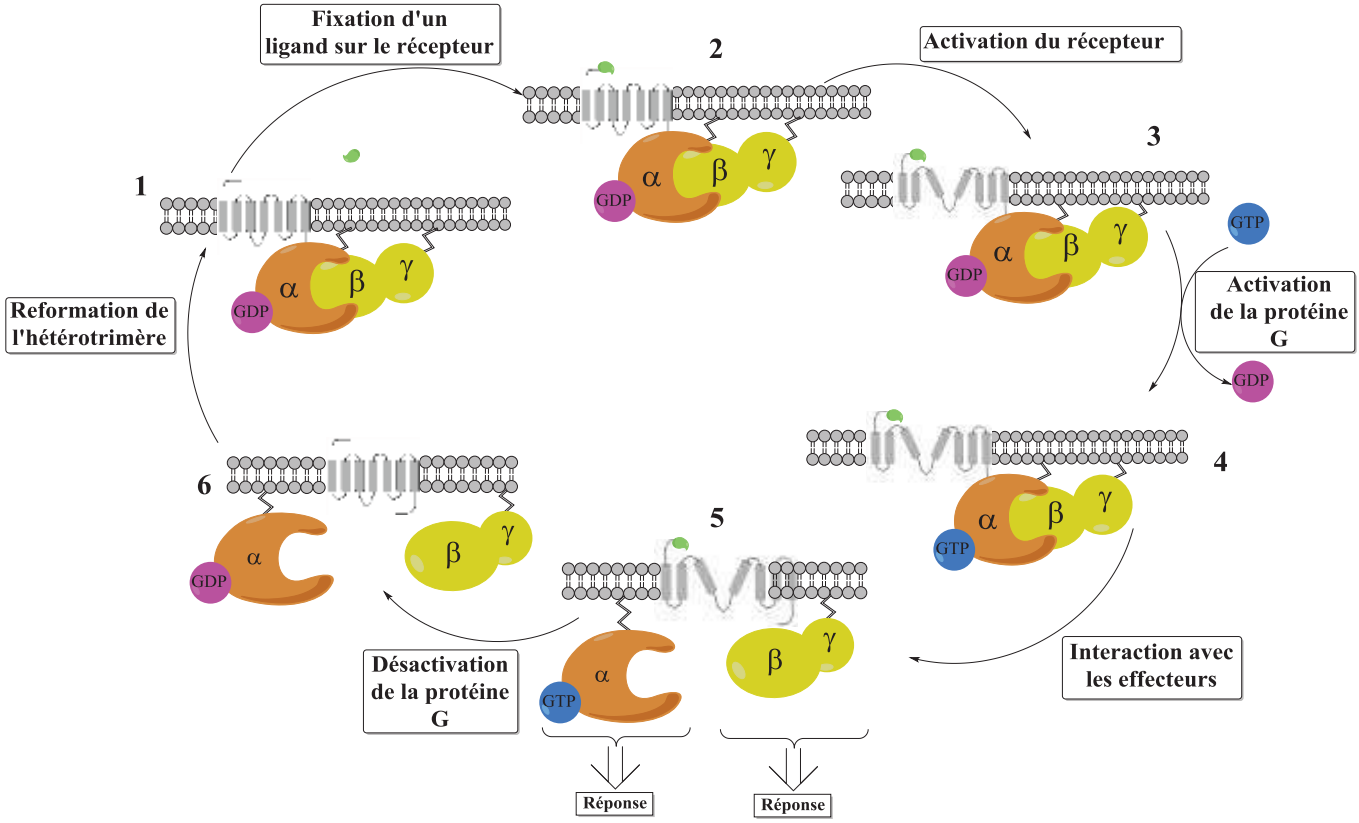


Figure 10 : Cycle d'activation d'une protéine G par un RCPG à la réception d'un ligand (en vert). Au cours de la première étape (1) le ligand s'approche du récepteur puis se lie à se dernier à la seconde étape (2). Cette liaison entraîne un « changement conformationnel » du RCPG (3) qui permet l'échange GDP/GTP au niveau de la sous-unité α de la protéine G (4). Cela amène à une dissociation de cette sous-unité du complexe $G_{\beta/\gamma}$ (5) et l'hydrolyse de GTP en GDP au sein de la sous-unité α (6). Ces deux entités (G_α et $G_{\beta/\gamma}$) vont transduire le signal extérieur et peuvent activer des seconds messagers

[28] S. Mary, J.-A. Fehrentz, M. Damian, G. Gaibelet, H. Orcel, P. Verdie, B. Mouillac, J. Martinez, J. Marie, J.-L. Baneres, *Journal of Biological Chemistry* **2013**, *288*, 24656–24665

[29] M. Louet, J. Martinez, N. Floquet, *PLoS Computational Biology* **2012**, *8*, e1002595

Cependant, il existe des modèles récents qui suggèrent des réarrangements moléculaires, des réorganisations et des pré complexations de molécules effectrices qui sont de plus en plus acceptés tout en nécessitant des preuves expérimentales.[30,31,32] M. Louet et N. Floquet ont, par exemple, montré en 2013 par simulation bio-informatique que le récepteur β_2-adrénergique couplé à sa protéine G pouvait adopter un mouvement principal lors de la liaison de son ligand ; mouvement retrouvé chez sept autres RCPG, laissant alors supposer qu'il serait le mouvement d'activation d'un RCPG.[33] Chacun des complexes, G_α-GTP et G_β/G_γ, pourra déclencher différentes voies de signalisation en cascade, appelées aussi « système de second messager », activer ou inhiber des protéines effectrices. A cet instant, le récepteur est alors à nouveau libre et en position « off ». Il est alors apte à activer une nouvelle fois la protéine G. Grâce à son activité enzymatique intrinsèque, la sous-unité G_α va hydrolyser la GTP en GDP ce qui rendra possible sa réassociation avec les sous-unités G_β/G_γ et le récepteur pour redémarrer un nouveau cycle. Il existe un groupe de protéines spécifique des sous-unités G_α appelé régulateur de signal des protéines G (RGS pour « Regulator of G protein Signalling ») qui agit en tant que protéine activatrice de GTPase (GAP pour « GTPase-Activating Proteins »). Ces protéines accélèrent l'hydrolyse de la GTP en GDP, ce qui entraîne l'arrêt du signal transduit. Dans certains cas, l'effecteur lui-même peut posséder une activité GAP intrinsèque qui peut aider à désactiver la transduction. C'est le cas en particulier de la phospholipase-C_β qui possède une activité GAP dans sa région C-terminale.[34,35] Ceci constitue une forme alternative de régulation de la sous-unité G_α. Il est important de noter, toutefois, qu'une telle G_α-GAP ne présente pas de résidus catalytiques, c'est-à-dire de séquence acide aminée spécifique, pour activer la protéine G_α. En revanche ce système fonctionne grâce à une diminution de l'énergie d'activation nécessaire pour que la réaction, d'hydrolyse, puisse avoir lieu.[36]

Les protéines G appartiennent au large groupe des GTPases. Ce groupe est une classe importante d'enzymes qui vont se lier à la GTP pour l'hydrolyser et donner la GDP. La GTP se fixe sur un domaine particulier de la protéine G commun à un très grand nombre d'organismes, le domaine à GTPase qui est caractéristique de celles-ci. Ces protéines sont généralement des hétérotrimères constituées de trois différentes sous-unités α, β et γ qui sont étroitement liées entre elles par des liaisons électrostatiques et hydrophobes mais également reliées à la membrane cytoplasmique (voir

[30] K. Qin, C. Dong, G. Wu, N. A. Lambert, *Nat. Chem. Biol.* **2011**, *7*, 740–747
[31] G. J. Digby, R. M. Lober, P. R. Sethi, N. A. Lambert, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2006**, *103*, 17789–17794
[32] K. Khafizov, G. Lattanzi, P. Carloni, *Proteins* **2009**, *75*, 919–930
[33] M. Louet, E. Karakas, A. Perret, D. Perahia, J. Martinez, N. Floquet, *FEBS Letters* **2013**, *587*, 2656–2661
[34] I. Litosch, *IUBMB Life* **2013**, *65*, 936–940
[35] E. M. Ross, *Science Signaling* **2011**, *4*, pe5-pe5
[36] S. R. Sprang, Z. Chen, X. Du, in *Advances in Protein Chemistry*, Elsevier, **2007**, pp. 1–65

Figure 9 p.23).[37] Il existe plusieurs classes de sous-unités G_α parmi lesquelles $G_s\alpha$ (stimulateur), $G_i\alpha$ (inhibiteur), $G_o\alpha$ (autre). L'hélice α de l'extrémité N-terminale de la protéine G_α assure la liaison avec les autres sous-unités. Elle est également responsable de la liaison à la GTP et de l'hydrolyse de cette dernière. Les chaînes β et γ quant à elles sont étroitement liées et fortement fixée à la chaîne α, permettant ainsi la liaison de la protéine entière au récepteur. Ces trois sous-unités α, β et γ existent sous de nombreuses isoformes et forment une grande variété de protéines dont les effets diffèrent fortement (Figure 11 ci-dessous). En effet, la sous-unité α, qui est fixée à la membrane lipidique, va porter : le site de liaison avec le récepteur, le site catalytique de l'hydrolyse de la GTP et le site de liaison avec l'adényl-cyclase ; tandis que le complexe formé par les sous-unités β et γ, qui est lié à la membrane lipidique par la sous-unité γ, porte des sites de liaison pour d'autres effecteurs.

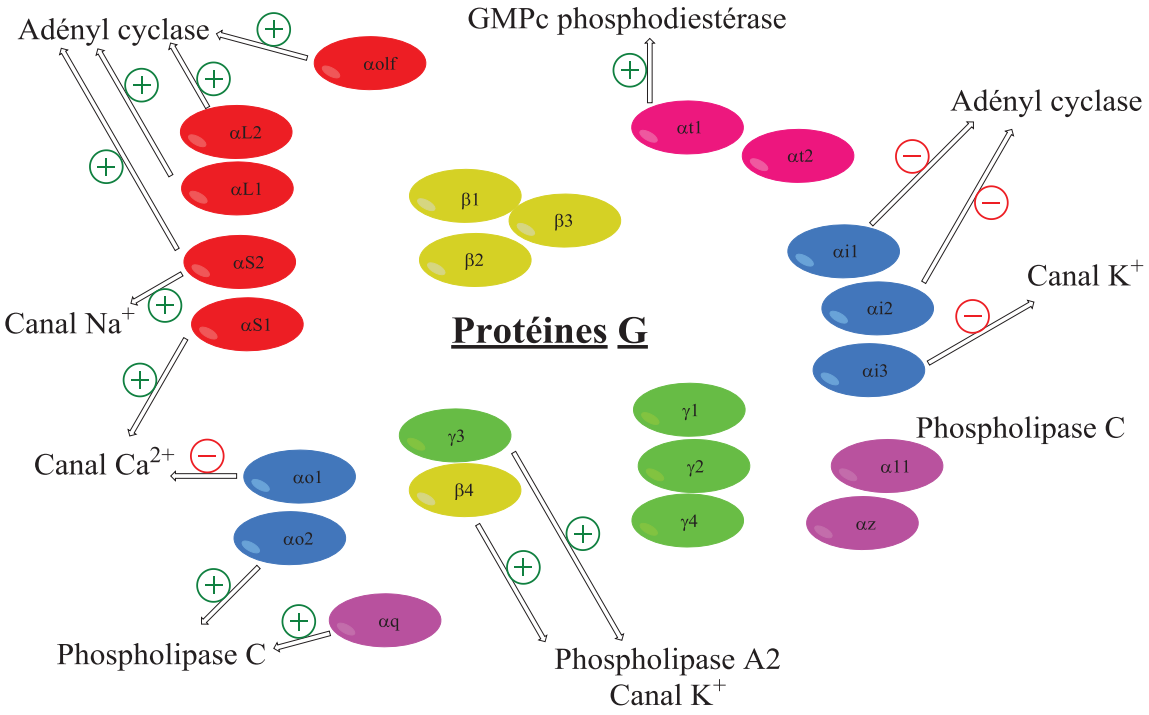


Figure 11 : Isoformes des sous-unités α, β et γ des protéines G et effets sur différents effecteurs (messagers seconds, canaux ioniques). Les effets stimulants sont identifiés par des « + » verts et les effets inhibiteurs par des « - » rouges

Il existe également des petites protéines G comme les Ras d'environ 20 kDa.[38] Celles-ci sont des monomères qui ne sont pas liés à la membrane mais conservent la capacité de se lier à la GTP/GDP et sont également impliquées dans la transduction des signaux ; elles interviennent principalement dans le cadre de la régulation de la prolifération des cellules ainsi que dans le cadre de la différenciation et de la survie de ces dernières et constituent une seconde classe de protéines

[37] E. H. Hurowitz, J. M. Melnyk, Y. J. Chen, H. Kouros-Mehr, M. I. Simon, H. Shizuya, *DNA Res.* **2000**, *7*, 111–120

[38] K. Wennerberg, K. L. Rossman, C. J. Der, *J. Cell. Sci.* **2005**, *118*, 843–846

G. Enfin, il existe des protéines G qui participent directement à la transcription/traduction des ARNm en tant que facteurs d'initiation ou d'élongation.[39]

I.D. Exemple de signalisation en cascade : l'action de l'adényl-cyclase

Une fois le RCPG activé par un stimulus, l'échange GDP/GTP effectué et la dissociation des complexes GTP-G_α/$G_{\beta\gamma}$ effectué, le complexe GTP-G_α devient apte à activer la cascade de signalisation qui dépend de l'AMPc en stimulant sa production à partir d'ATP (voir Figure 12 ci-dessous).

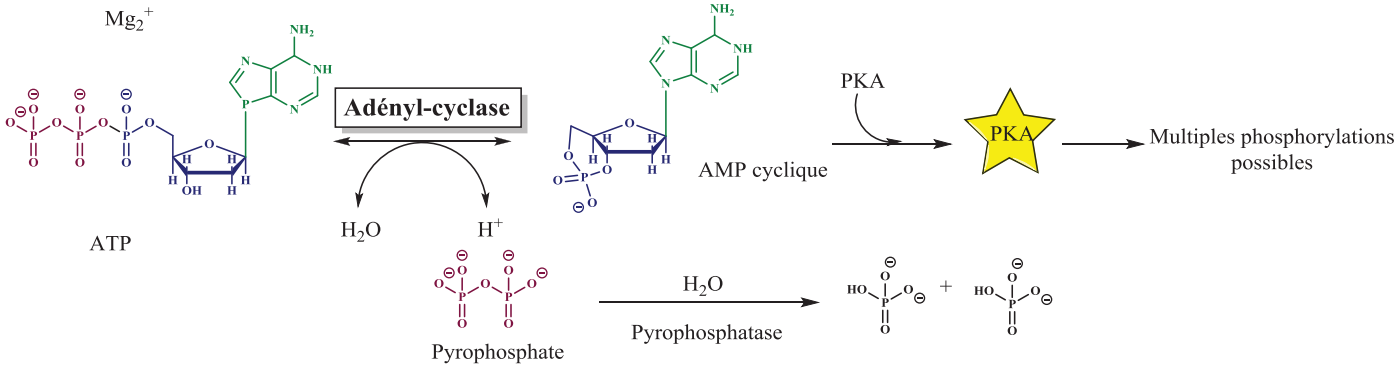


Figure 12 : Voie d'action de l'adényl-cyclase qui transforme l'ATP en AMPc, un second messager dans le cadre de la transduction du signal. Celui-ci peut ensuite réagir, entre autre, avec une protéine kinase A pour engendrer de multiples phosphorylations par exemple. Le pyrophosphate issu de la dégradation d'ATP en AMPc est ensuite à son tour dégradé en ions phosphate

Cet évènement est rendu possible par la stimulation en direct de l'adényl-cyclase, une enzyme membranaire (voir Figure 13 p.27). Par la suite l'AMPc produit va, en tant que second messager, interagir et activer la protéine kinase A (PKA) qui, elle-même, a la capacité de phosphoryler une myriade de cibles en aval de cette cascade de signalisation.[40] Ce second messager poursuit ainsi la transduction du signal et induira des changements de comportement dans la cellule.

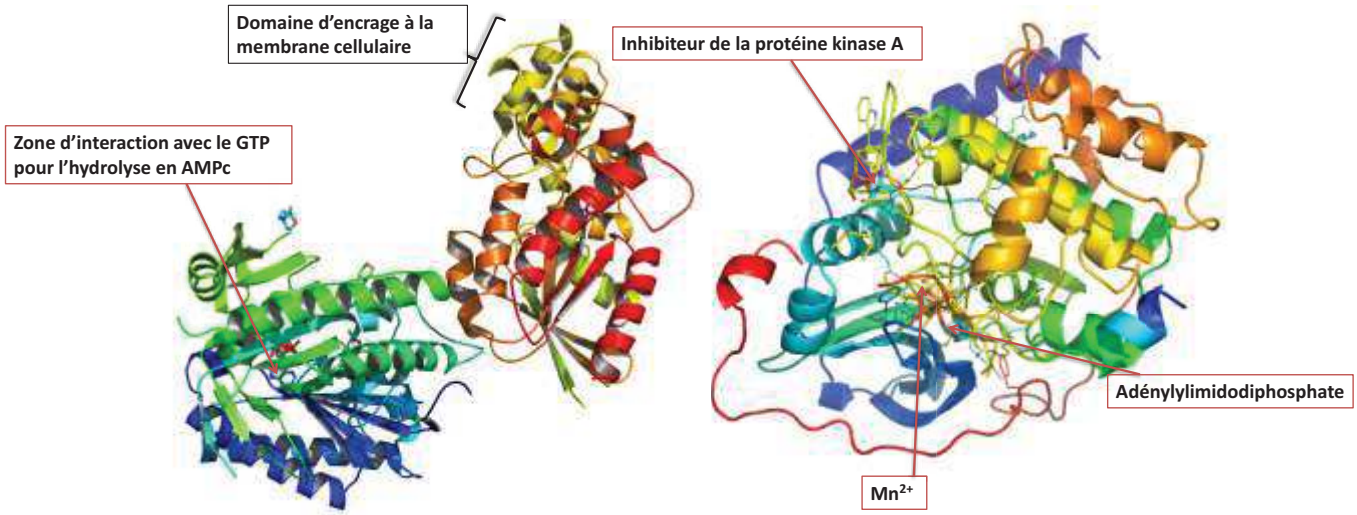


Figure 13 : Structure obtenue par cristallisation de l'adényl-cyclase accroché à la membrane cellulaire de hélices α (à gauche) et de la sous-unité catalytique de la protéine kinase A (à droite) complexé à un inhibiteur de la protéine, à des ions Mn^{2+} et à l'adénylylimidodiphosphate. Les structures sont représentées avec les chaînes latérales des résidus impliqués dans les sites de liaison

[39] P. J. Reid, S. S. Mohammad-Qureshi, G. D. Pavitt, *Journal of Biological Chemistry* **2012**, *287*, 8275–8285
[40] E. Scheeff, P. Bourne, *PLoS Computational Biology* **2005**, *preprint*, e49

I.E. Rôle des RCPG dans certaines pathologies :

Les RCPG sont omniprésents dans les cellules du règne animal et dans les processus biologiques qui régissent la vie des cellules et de l'organisme qu'elles composent. Il alors tout naturel de penser que ces mêmes récepteurs peuvent être impliqués dans nombre de pathologies. C'est notamment le cas pour des maladies telles que le diabète, la cécité, les allergies, la dépression, les défauts cardiovasculaires, les maladies auto-immunes ou encore certaines formes de cancer.

RCPG en cause	Pathologie associée
Rhodopsine	Rétinite pigmentaire
Récepteur de l'hormone lutéinisante (LH-R)	Puberté précoce mâle familiale (FMPP)
Récepteur de la TSH	Hyperthyroïdie
Récepteur de l'α-MSH (MC-RI) murin	Hyperpigmentation congénitale dominante
Récepteur sensible aux ions calcium (CAS-R)	Hypoparathyroïdie familiale
Récepteur de l'hormone folliculostimulante (FSH-R)	Spermatogénèse activée en permanence

Tableau 1 : Tableau présentant les récepteurs mutés et activés de manière constitutive (en permanence) avec la pathologie associée retrouvée chez l'homme et l'animal

La transduction défectueuse d'un signal qui à l'origine est médiée par un RCPG peut être observée lors d'un défaut d'expression ou bien lorsqu'une mutation intervient. En effet, l'apparition d'une mutation peut se faire de façon sporadique en ne touchant qu'un seul organe ou bien se limiter à un tissu. Elle peut aussi être transmisse de manière héréditaire. On peut alors observer deux altérations différentes :

- Une activation permanente qui se fera même en l'absence d'agoniste (voir Tableau 1 ci-dessus).
- Une diminution voir une perte d'activité constitutive (voir Tableau 2 ci-dessous).

RCPG en cause	Pathologie associée
Récepteur β2-adrénergique	Asthme nocturne familial
Récepteur β3-adrénergique	Obésité héréditaire
Récepteur sensible aux ions calcium	Trouble du métabolisme calcique
Récepteur de la GHRH (« Growth Human Receptor Hormone »)	Déficience isolée en hormone de croissance (nanisme)
Récepteur du glucagon	Diabète non-insulinodépendant
Mutation des opsines des cônes	Vision altérée des couleurs

Tableau 2 : Tableau présentant les récepteurs mutés avec perte d'activité constitutive et la pathologie associée

De ces altérations peut résulter un état physiologique particulier comme une altération de la pigmentation cutanée ou bien un état pathologique.[41] Les RCPG ne sont bien sûr pas les seules cibles de mutations. Celles-ci peuvent aussi intervenir en aval du récepteur, sur les protéines G elles-mêmes. Plusieurs affections humaines trouvent leur source dans une altération du gène codant pour certaines protéines G comme la $G_{s\alpha}$ ou la $G_{i2\alpha}$.

[41] D. E. Clapham, *Cell* **1993**, *75*, 1237–1239

Les RCPG sont également impliqués non seulement dans des pathologies liées à des mutations mais également des infections par des micro-organismes pathogènes. Certains d'entre eux servent de porte d'entrée à une infection et à l'inverse, l'inactivation d'un récepteur ou son absence peut diminuer la capacité d'un agent pathogène à infecter un organisme hôte. C'est le cas notamment d'un récepteur à chimiokine : le récepteur CCR5.[42,43,44] Celui-ci est impliqué dans l'infection d'un organisme humain par le VIH. En effet, en temps normal le changement de conformation de la glycoprotéine 120 permet l'interaction du virus avec CCR5 via la glycoprotéine 41 et la fusion membranaire du virus. Cependant, une mutation inactivante de CCR5 (Δ32-CCR5) a été identifiée chez des individus séronégatifs. Cette mutation consiste en la délétion de 32 nucléotides codant pour la seconde boucle extracellulaire du CCR5. Cela ayant pour conséquence la production d'une protéine tronquée et non fonctionnelle empêchant le VIH de pénétrer les cellules et d'infecter l'organisme.

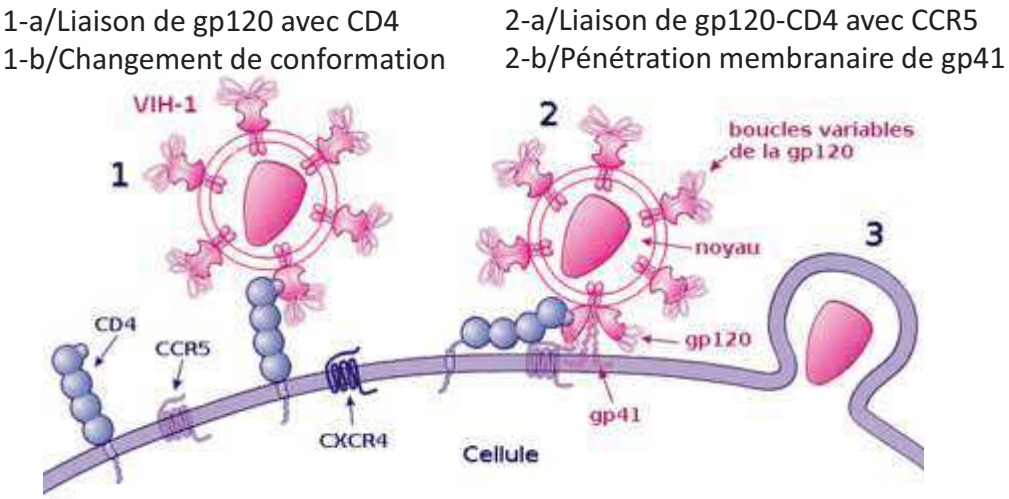


Figure 14 : Représentation de l'infection d'une cellule par le VIH. Celui-ci reconnaît une cellule hôte grâce à la molécule CD4 et à un co-récepteur (récepteur à chimiokines comme CCR5)[45]

Les voies de signalisation qui dépendent des RCPG sont extrêmement nombreuses, et malgré les découvertes d'une partie d'entre elles qui va concerner un état physiologique ou bien une prédisposition pour une pathologie ou même encore un état pathologique plus ou moins grave, il en reste encore de nombreuses à découvrir qui seront autant de cibles thérapeutiques potentielles pour soigner les pathologies associées.

[42] T. Dragic, V. Litwin, G. P. Allaway, S. R. Martin, Y. Huang, K. A. Nagashima, C. Cayanan, P. J. Maddon, R. A. Koup, J. P. Moore, et al., *Nature* **1996**, *381*, 667–673
[43] H. Deng, R. Liu, W. Ellmeier, S. Choe, D. Unutmaz, M. Burkhart, P. D. Marzio, S. Marmon, R. E. Sutton, C. M. Hill, et al., *Nature* **1996**, *381*, 661–666
[44] A. Trkola, T. Dragic, J. Arthos, J. M. Binley, W. C. Olson, G. P. Allaway, C. Cheng-Mayer, J. Robinson, P. J. Maddon, J. P. Moore, *Nature* **1996**, *384*, 184–187
[45] Processus d'attachement du VIH, 2007, repéré à https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/0/0d/HIV_attachment_fr.png

I.F. Importance de l'étude des RCPG en pharmacologie : une cible privilégiée

Typiquement, depuis que le premier récepteur de la famille A a été découvert, une importante quantité d'informations concernant la structure, les fonctions et la pharmacologie de ces récepteurs a été publiée.[46,47] Ceci a, par la suite, amené à l'introduction sur le marché des premiers médicaments ciblant les RCPG. La plupart des nouveaux RCPG découverts l'ont été soit en utilisant des approches par homologie et plus récemment par analyse bio-informatique du génome (identification de séquences d'ADN menant au codage de RCPG), par hybridation grossière (mélange de fragments de séquences connues et inconnues pour compléter une séquence incomplète) ou encore par des expériences PCR (pour « Polymerase Chain Reaction », réplication de l'ADN à très grande échelle pour un séquençage). Etant donné que ces récepteurs régulent une importante quantité de fonctions physiologiques, cela les rend très attractifs en tant que cible thérapeutique, point reflété par la proportion de médicaments ciblant les RCPG actuellement sur le marché estimée entre 40 et 50 %.

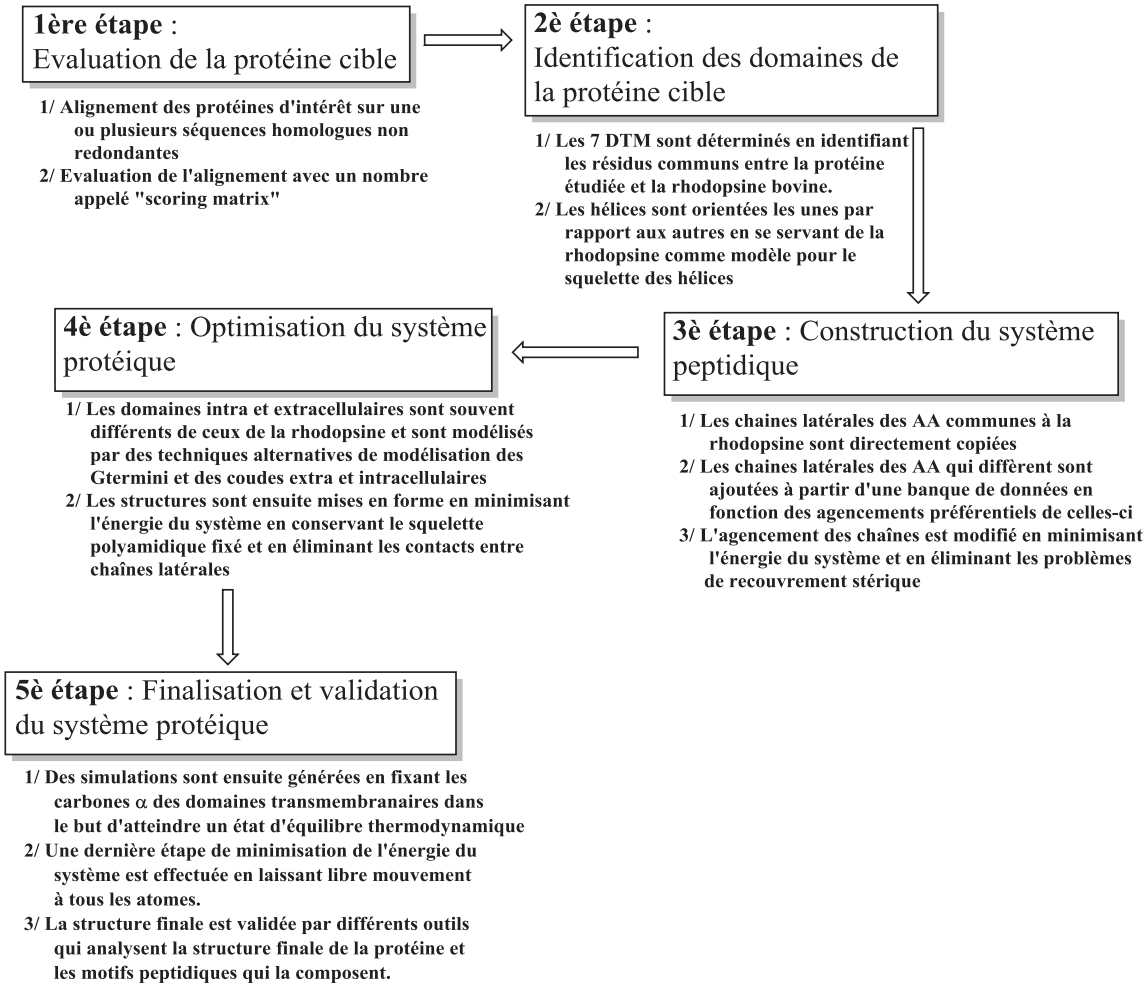


Figure 15 : Première méthode de prédiction de structure de RCPG : la modélisation par homologie

[46] C. S. Tautermann, *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* **2014**, *24*, 4073–4079
[47] R. M. Eglen, R. Bosse, T. Reisine, *ASSAY and Drug Development Technologies* **2007**, *5*, 425–452

Cependant, seulement 30 RCPG en 2006 sont ciblés par ces médicaments, laissant d'importantes opportunités de développement notamment en ce qui concerne les RCPG orphelins.[48] Dans le cas des RCPG en revanche, il existe actuellement deux méthodes particulièrement puissantes de recherche de candidats médicaments dites *in silico* que l'on pourrait inclure plus globalement dans la montée en puissance de la bio-informatique pour la recherche thérapeutique :

- La méthode de modélisation par homologie (voir Figure 15 ci-dessus).
- La prédiction de structures *de novo* par la méthode de Godard (voir Figure 16 p.31).
- La méthode « PREDICT ».

Concernant la première méthode, tous les modèles construits par homologie sont issus de la même structure cristallographique, celle de la rhodopsine.[49] Ces modèles suivent un processus bien particulier de composition. Actuellement, un grand nombre de modèles existent et il est très simple d'en obtenir un nouveau quand sa séquence est relativement proche de celle de la Rhodopsine. A l'inverse, plus sa séquence diffère de celle-ci et plus la construction du modèle sera complexe étant donné que de nouvelles données d'interaction sont à prendre en compte entre les différents acides aminés et la bicouche lipidique.

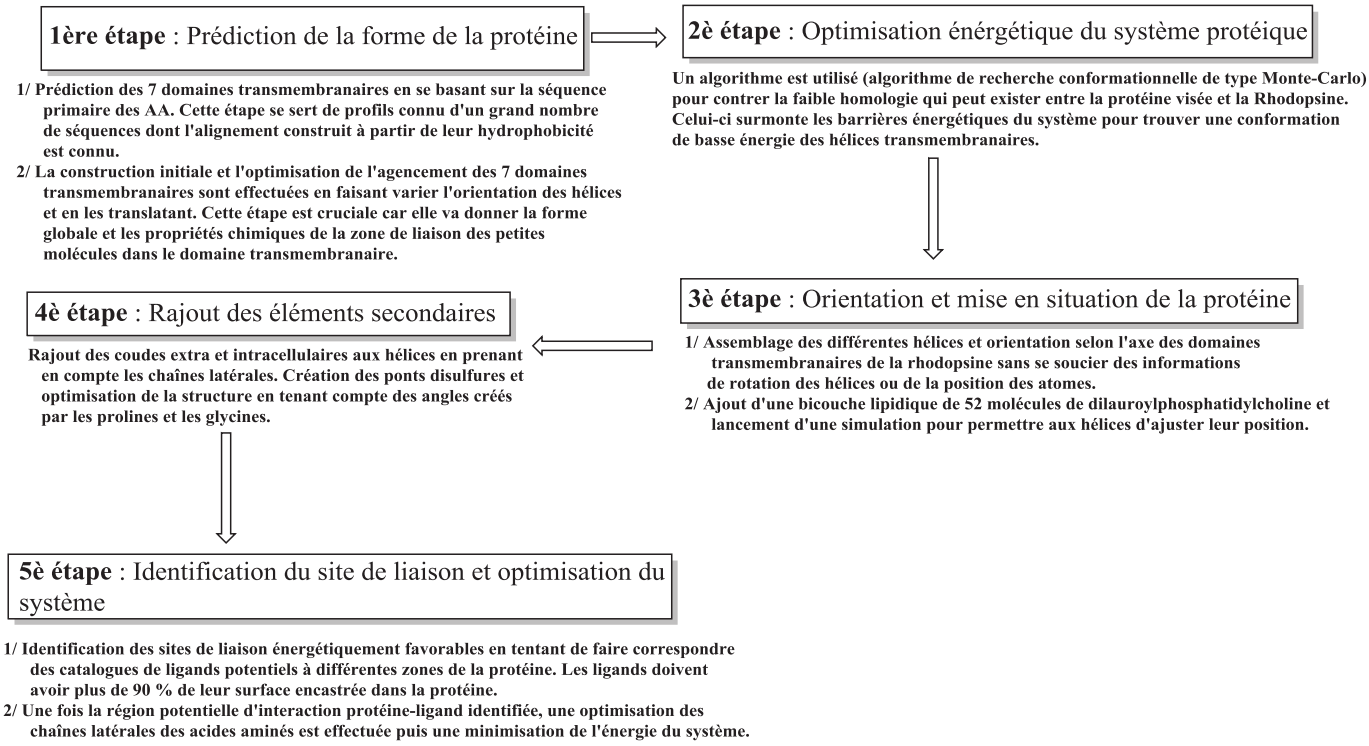


Figure 16 : Seconde méthode de prédiction de structure de RCPG : la méthode de Goddard

La troisième méthode, nommée PREDICT, utilise le principe des « Leurres de structure » (structural decoy en Anglais) pour prédire une structure de RCPG. Cela revient à générer plusieurs

[48] S. Schlyer, R. Horuk, *Drug Discovery Today* **2006**, *11*, 481–493
[49] K. Palczewski, *Science* **2000**, *289*, 739–745

structures qui sont optimisées simultanément. L'idée sous-jacente est d'empêcher une structure de se retrouver coincée dans une forme avec une énergie minimale sans avoir exploré d'autres conformations dans l'espace environnant.

Il y a 4 étapes principales :

1. L'application de l'algorithme PREDICT de manière grossière. Cela permet de créer les sept domaines transmembranaires comme dans l'approche de Goddard.
2. Une seconde application plus fine de l'algorithme. Différentes structures sont construites et la plus plausible est déterminée sur des critères énergétiques et structurels. Puis les structures des hélices sont optimisées par rotation.
3. Un affinement dynamique des structures par optimisation des hélices et de leur inclinaison. C'est une étape très consommatrice en puissance de calcul et faite uniquement sur les structures de plus basse énergie avant de passer à l'optimisation énergétique en rajoutant les molécules d'eau.
4. La génération virtuelle d'un complexe protéine-ligand et la simulation d'une libre orientation du ligand une fois inséré.

Les méthodes dites in silico ne sont pas les seules à s'intéresser à la structure des RCPG puisqu'il existe toujours une recherche autour de la cristallisation des récepteurs. Ce domaine a connu de belles avancées récemment avec des innovations en ce qui concerne les techniques de cristallisation des protéines. Un bel exemple est la cristallisation en 2007 du récepteur β_2-adrénergique (voir Figure 17 p.33) impliqué dans la contractilité des muscles lisses (vasculaires, bronchiques, utérins ou intestinaux).[50,51] Cela permet notamment de confirmer les séquences prédites *in silico* en les complétant d'une part, et d'obtenir la zone d'interaction entre le RCPG et un agoniste inverse partiel en les cristallisant ensemble.

[50] V. Cherezov, D. M. Rosenbaum, M. A. Hanson, S. G. F. Rasmussen, F. S. Thian, T. S. Kobilka, H.-J. Choi, P. Kuhn, W. I. Weis, B. K. Kobilka, et al., *Science* **2007**, *318*, 1258–1265

[51] S. G. F. Rasmussen, H.-J. Choi, D. M. Rosenbaum, T. S. Kobilka, F. S. Thian, P. C. Edwards, M. Burghammer, V. R. P. Ratnala, R. Sanishvili, R. F. Fischetti, et al., *Nature* **2007**, *450*, 383–387

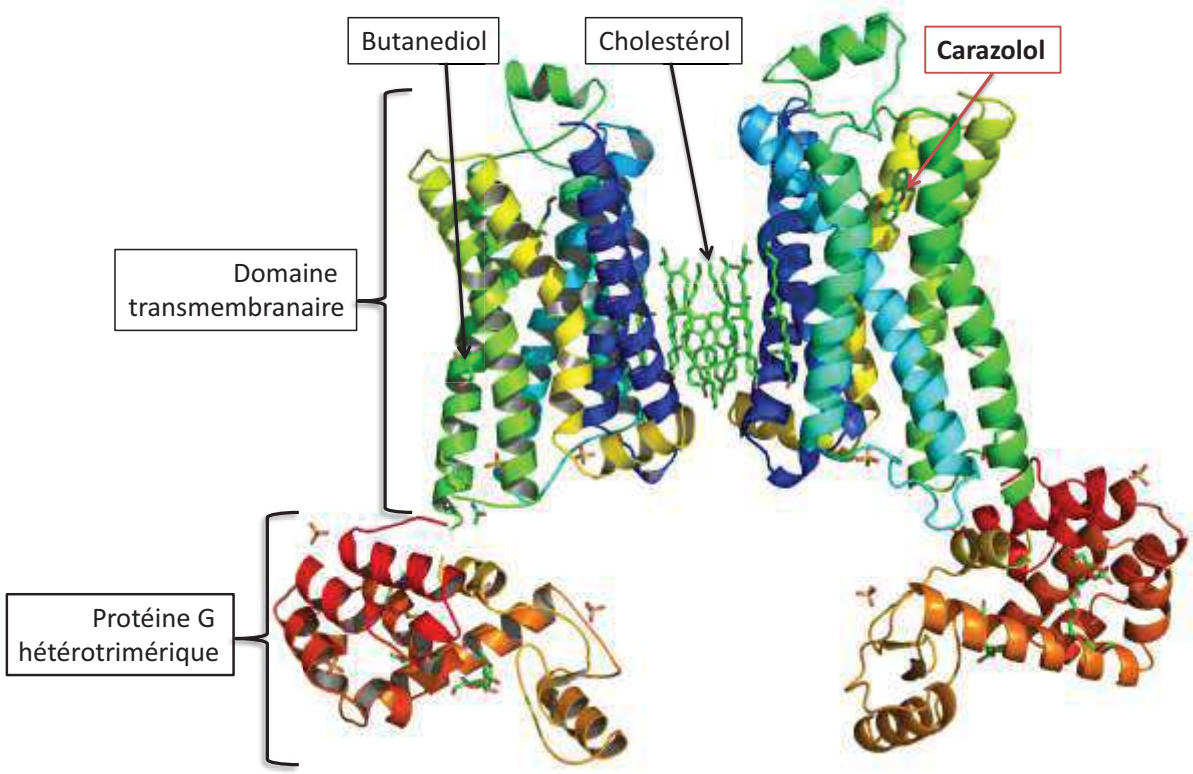


Figure 17 : Structure cristallographique homodimérique du récepteur β_2-adrénergique obtenue par Cherezov et al. en 2007. La protéine a été obtenue avec des lipides (butanediol) et du cholestérol cocristallisés ainsi que le Carazolol, agoniste inverse partiel du récepteur (au centre des 7 DTM pour Domaine Transmembranaire)

I.G. Les RCPG orphelins, syndrome de l'effervescence de la recherche pharmacologique

Les récepteurs orphelins sont par définition des RCPG dont le ligand endogène n'a pas encore été identifié.[52,53] Les RCPG découverts par l'intermédiaire des méthodes de recherche ci-dessus sont caractérisés sans leur ligand endogène. Et bien que la plupart des RCPG orphelins aient été « adoptés » par la découverte de leur ligand naturel, il en reste encore dont les ligands restent à découvrir. A titre d'exemple on peut trouver un site de liaison de la PCP[54] dans le récepteur NMDA (récepteur à N-méhtyl-D-aspartate) qui est un type de canal ionique activé par un ligand pour lequel le ligand endogène n'est pas encore connu.[55] Par conséquent, lorsqu'un ligand endogène est identifié, celui-ci peut être considéré comme adopté et retiré de la liste des récepteurs orphelins. Bien que constitués pour un certain nombre par des RCPG, il existe également des récepteurs orphelins parmi les récepteurs nucléaires.[56,57] Brièvement, leur nomenclature est spécifique à leur

[52] O. Civelli, Y. Saito, Z. Wang, H.-P. Nothacker, R. K. Reinscheid, *Pharmacology & Therapeutics* **2006**, *110*, 525–532
[53] A. Levoye, J. Dam, M. A. Ayoub, J.-L. Guillaume, R. Jockers, *EMBO Rep.* **2006**, *7*, 1094–1098
[54] Phénylcyclidine ou 1-(1-phenylcyclohexyl)piperidine, psychotrope hallucinogène d'abord développé pour ses propriétés anesthésiantes dont l'usage a ensuite été détourné en tant que drogue récréative.
[55] G. E. Fagg, *Neurosci. Lett.* **1987**, *76*, 221–227
[56] V. Giguère, *Endocr. Rev.* **1999**, *20*, 689–725
[57] G. Benoit, A. Cooney, V. Giguere, H. Ingraham, M. Lazar, G. Muscat, T. Perlmann, J.-P. Renaud, J. Schwabe, F. Sladek, et al., *Pharmacol. Rev.* **2006**, *58*, 798–836

statut d'orphelin : ils sont nommés par le sigle GPR suivi d'un nombre, GPR5 par exemple. Un exemple de récepteur nucléaire adopté est le FXR activé par des acides biliaires.[58] Historiquement, les RCPG étaient découverts en utilisant des ligands à la manière des appâts utilisés à la pêche pour tenter d'identifier le récepteur associé au ligand en question. Par conséquent, les récepteurs découverts de cette manière n'étaient, par définition, pas orphelins. Puis sont arrivées les techniques de biologie moléculaire moderne telles que le criblage de banque de données à ADNc[59]. Grâce à cet outil, il est alors devenu possible d'identifier des récepteurs similaires à des séquences provenant d'autres récepteurs connus sans avoir identifié leur ligand endogène.

Parmi l'ensemble des RCPG connus, la plupart sont des cibles de neurotransmetteurs, et d'autres transmetteurs comme des peptides et des hormones impliqués dans les interactions intercellulaires. C'est la raison pour laquelle les RCPG orphelins sont pressentis pour être activés par des molécules de type transmetteur. Compte-tenu de cette information, la découverte du ligand naturel du RCPG orphelin équivaut donc à rechercher un nouveau transmetteur. Ceci étant dit, trouver le ligand endogène d'un RCPG orphelin est un réel défi en soi étant donné que ni les propriétés biochimiques du ligand en question ni la réponse du récepteur à son activation par ce dernier ne sont connues à l'avance.

Plusieurs stratégies ont donc été développées pour pouvoir identifier ces ligands.[60] Il existe actuellement deux manières distinctes pour la découverte des ligands naturels des RCPG orphelins :

- La pharmacologie inverse.[61]
- La stratégie du récepteur orphelin.[62]

Historiquement, la première approche utilisée pour identifier un ligand de RCPG orphelin joue sur le fait que très peu de récepteurs étaient clonés et consistait simplement à tester toute une série de ligands potentiels sur ceux-ci. Cette technique a permis en 1988 « d'adopter » deux récepteurs : le récepteur à la sérotonine 5-HT_{1A} et le récepteur D_2 à la dopamine.[63,64] La plupart des sous-types de récepteurs ont été découverts grâce à cette technique qui a permis d'adopter un grand nombre de récepteurs. Elle a également été adaptée à du criblage à haut débit (HTS pour « High Throughput Screening ») pour l'analyse de séries entières de RCPG orphelins vis-à-vis de

[58] L.-Z. Mi, S. Devarakonda, J. M. Harp, Q. Han, R. Pellicciari, T. M. Willson, S. Khorasanizadeh, F. Rastinejad, *Mol. Cell* **2003**, *11*, 1093–1100
[59] ADN complémentaire : fragment d'ADN inséré dans une cellule hôte dans le but d'exprimer le gêne et d'obtenir le transcriptôme correspondant.
[60] A. Wise, S. C. Jupe, S. Rees, *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **2004**, *44*, 43–66
[61] F. Libert, G. Vassart, M. Parmentier, *Current Opinion in Cell Biology* **1991**, *3*, 218–223
[62] O. Civelli, *FEBS Letters* **1998**, *430*, 55–58
[63] J. R. Bunzow, H. H. M. V. Tol, D. K. Grandy, P. Albert, J. Salon, M. Christie, C. A. Machida, K. A. Neve, O. Civelli, *Nature* **1988**, *336*, 783–787
[64] A. Fargin, J. R. Raymond, M. J. Lohse, B. K. Kobilka, M. G. Caron, R. J. Lefkowitz, *Nature* **1988**, *335*, 358–360

centaines de ligands potentiels. Cependant la pharmacologie inverse a réservée quelques surprises. En effet, le but initial étant de rechercher des ligands affins pour un récepteur, beaucoup ont été éliminés car présentant une constante de dissociation de l'ordre du micromolaire alors que des constantes de l'ordre du nanomolaire étaient spécifiquement recherchées. Or certains ligands, comme des amines biosynthétiques telles que la noradrénaline et la dopamine pour les plus connues,[65] n'activent leur récepteur que dans cette gamme du micromolaire. La plupart de ces éliminations se retrouvent au sein de compagnies pharmaceutiques pour lesquelles des composés affins sont synonymes de rentabilité et amènent à découvrir des ligands de substitution différents des ligands naturels qui restent alors toujours à trouver.

A la fin des années 80, le nombre toujours croissant de récepteurs clonés allait de façon certaine dépasser le nombre de ligands naturels connus qui pouvaient correspondre à un RCPG. Pendant les années 90, la stratégie de la pharmacologie inverse a permis la caractérisation de nombreux RCPG. Puis les approches de criblage par homologie basées sur les expériences PCR ont entraîné une nouvelle augmentation du nombre de RCPG découverts pour dépasser le nombre de ligands potentiels connus. Ces récepteurs étant censés être la cible de molécules, l'idée d'utiliser les récepteurs comme des appâts à ligands endogènes a été développée par certains chercheurs signifiant ainsi la découverte de nouveaux transmetteurs. C'est à cet instant que la stratégie du récepteur orphelin s'est développée. Celle-ci consiste à exprimer un RCPG orphelin dans une lignée cellulaire eukaryotique stimulée par des tissus contenant le récepteur ciblé. L'activation du RCPG est suivie en mesurant la réponse des messagers secondaires comme le niveau intracellulaire d'AMPc avant de passer au fractionnement des échantillons ayant donné une réponse positive. Cela permet d'isoler et de caractériser le composé actif sur le récepteur cible, la plupart du temps sur des tissus de cerveau étant donné que dans le système nerveux central, les transmetteurs et les récepteurs sont souvent colocalisés. Le but étant de trouver de nouveaux ligands dans les tissus supposés les produire. En 1995, la méthode de la pharmacologie inverse a donc été elle-même « inversée » en se servant directement de tissus comme sources de nouveaux transmetteurs pour déboucher sur la découverte d'un nouveau neuropeptide, la nociceptine/orphanine FQ associée à son récepteur orphelin ORL-1, première application publiée de cette stratégie. [66] Ceci a démontré la possibilité d'identifier de nouveaux ligands grâce à ces récepteurs orphelins, marquant ainsi le début d'une décennie de découvertes similaires. Cela a aussi été le point de départ d'un intérêt croissant de l'industrie pharmaceutique pour cette méthode grâce à sa capacité à effectuer du criblage à haut débit, c'est-à-dire d'effectuer des mesures d'affinité sur un grand nombre de récepteurs en très peu

[65] L. Lindemann, M. C. Hoener, *Trends in Pharmacological Sciences* **2005**, *26*, 274–281
[66] R. K. Reinscheid, H. P. Nothacker, A. Bourson, A. Ardati, R. A. Henningsen, J. R. Bunzow, D. K. Grandy, H. Langen, F. J. Monsma, O. Civelli, *Science* **1995**, *270*, 792–794

de temps, sur les RCPG orphelins qui a conduit à l'adoption de 40 autres récepteurs.[67] D'où le besoin d'une approche différente pour la recherche de nouveaux transmetteurs.

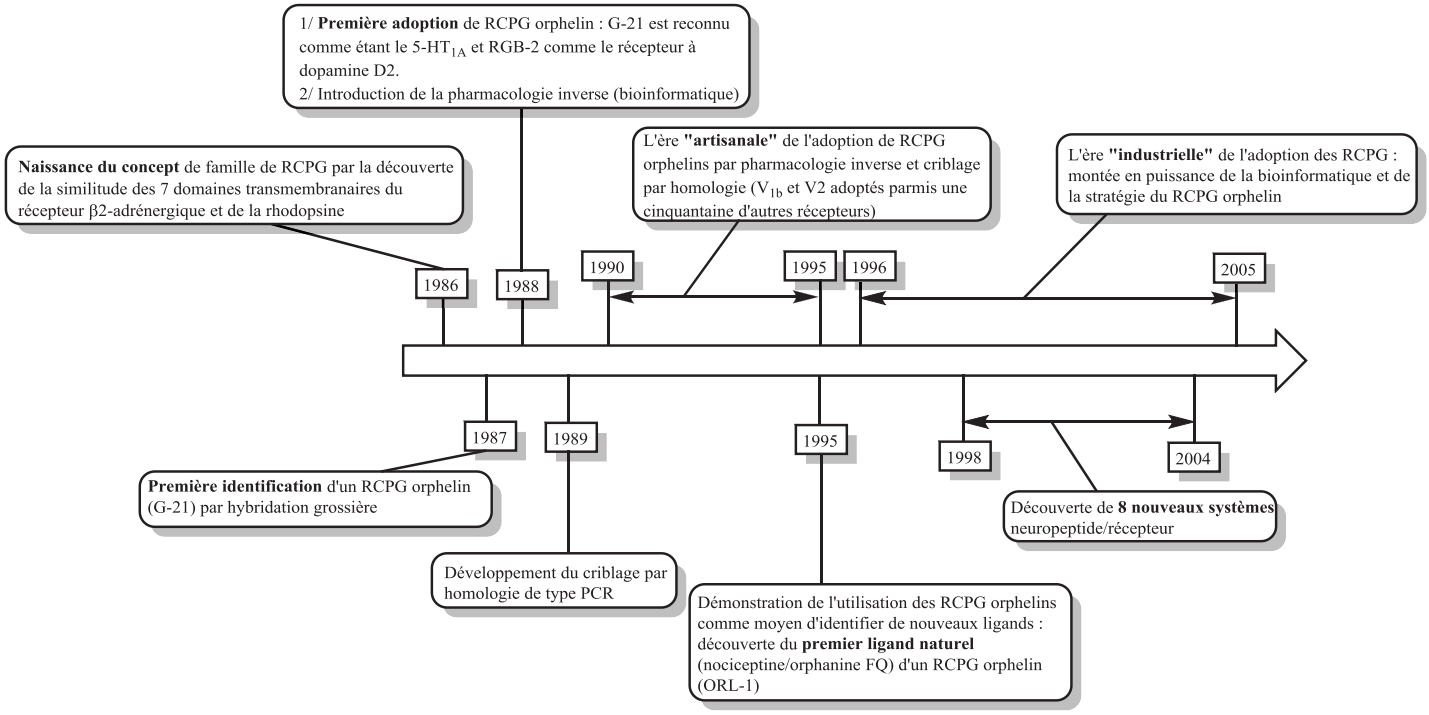


Figure 18 : Frise chronologique retraçant les principales découvertes et avancées dans le domaine des RCPG et plus particulièrement de l'adoption des récepteurs orphelins

La stratégie du récepteur orphelin, quant à elle, a donc été appliquée avec succès de 1995 à 2005 avec la découverte d'une douzaine de nouvelles familles de neuropeptides comme la ghréline. Le nombre de récepteurs orphelins étant toujours conséquent, la connaissance fine et précise des mécanismes physiologiques qui régissent la vie du corps humain sera fortement enrichie à mesure qu'ils seront adoptés. L'intérêt pour la découverte de nouveaux ligands endogènes, notamment les neuropeptides, et l'adoption des récepteurs orphelins est double avec l'importance de la compréhension des fonctions cérébrales, d'une part et la possibilité d'analyser finement les rôles de ces neuropeptides grâce au développement d'antagonistes. Les avancées en cristallisation de protéine ont débouchées sur la publication de nombreuses nouvelles structures cristallines utiles aux bio-informaticiens dont les moyens techniques ont été énormément améliorés. Ceci permet de confirmer des structures existantes et d'en découvrir de nouvelles de manière toujours plus précise. Ce qui a rendu la bio-informatique crédible envers la découverte de ligands agonistes supposés tout autant que la découverte d'antagonistes et l'adoption de récepteurs orphelins. L'avantage de faire travailler de concert la bio-informatique et la recherche *in vitro* a été au final de pouvoir tirer parti de la capacité des modèles informatiques à comparer des milliers de récepteurs à autant de ligands sans

[67] O. Civelli, *Trends in Neurosciences* **2001**, *24*, 230–237

surcoût à la paillasse et à sélectionner les résultats les plus prometteurs pour les traiter *in vitro* et *in vivo*. A titre d'exemple, les approches *in silico* ont permis d'obtenir, par docking de plus de 3 millions de composés sur le récepteur D3 à la dopamine (DRD3 pour « Dopamine Receptor D3 ») à partir d'un modèle par homologie du récepteur β2-adrénergique, 26 composés d'intérêt puis 6 d'affinité de l'ordre du micromolaire en 2011.[68,69] Le fait marquant est la publication la même année d'une structure cristallographique de ce même récepteur avec l'identification de 5 molécules d'affinité entre le nano et le micromolaire avec des taux d'identification de 23 % pour la méthode *in silico* et 20 % pour la méthode cristallographique, démontrant ainsi la crédibilité de ces approches bio-informatiques.

A l'heure actuelle les principaux enjeux de l'adoption de récepteurs orphelins tournent autour d'aspects techniques et conceptuels. Premièrement, le type de transmetteur doit être déterminé en passant par des étapes de purification et d'enrichissement. Deuxièmement, il a été mis en évidence la capacité de RCPG à former des dimères,[70] ce qui complique la tâche d'identification des ligands lorsqu'il s'agit de dimériser « au hasard » deux récepteurs. Troisièmement, certains RCPG ne produisent pas de messagers secondaires mais induisent simplement une réponse intracellulaire forçant les chercheurs à adapter leurs méthodes de suivi qui se focalisaient initialement sur ces seconds messagers (e.g : IP_3, PLC, complexe $G_{\beta/\gamma}$…).[71]

I.H. Présentation des modèles d'étude des travaux thèse

I.H.1. Le récepteur à la vasopressine V_{1A}

C'est ce récepteur qui a servi de modèle au développement de la méthodologie de quantification par dilution isotopique par spectrométrie de masse MALDI de peptides modifiés, affins pour ce récepteur dans le cadre des travaux de recherche de cette thèse.

Le type V_1 a en particulier un rôle vasoconstricteur tandis que l'activation des récepteurs V_2 produit un effet antidiurétique. De nouveaux analogues de l'AVP (pour « Arginine VasoPressine), agoniste endogène du récepteur V_{1A}, ont permis de montrer après synthèse l'existence de deux sous familles des récepteurs V_1 : V_{1A} et V_{1B}. Le sous-type V_{1A} a été séquencé et cloné par Thibonnier et al en 1994.[72]

[68] J. Carlsson, R. G. Coleman, V. Setola, J. J. Irwin, H. Fan, A. Schlessinger, A. Sali, B. L. Roth, B. K. Shoichet, *Nat. Chem. Biol.* **2011**, *7*, 769–778
[69] J. A. Stockert, L. A. Devi, *Frontiers in Pharmacology* **2015**, *6*, DOI 10.3389/fphar.2015.00100
[70] G. Milligan, *Mol. Pharmacol.* **2004**, *66*, 1–7
[71] K. Kristiansen, *Pharmacol. Ther.* **2004**, *103*, 21–80
[72] M. Thibonnier, C. Auzan, Z. Madhun, P. Wilkins, L. Berti-Mattera, E. Clauser, *J. Biol. Chem.* **1994**, *269*, 3304–3310.

Classe[73]	A
Autres sous-types (ligand endogène)	V_{1b} (Vasopressine) ; V_2 (Vasopressine) ; OT-R (OcyTocine)
Localisation	Cerveau (V_{1a}) ; Glande pituitaire (V_{1b}) ; Reins (V_2) ; Cerveau, utérus, testicules, prostate, épididyme (OT-R)[74,75]
Voie de signalisation	Couplage à la protéine $G_{q/11}$, activation de PLC et production d'inositol
Rôle/implication métabolique	Modulation de l'action vasoconstrictrice de l'AVP Action sur le comportement et les interactions sociales, la créativité, la prise de décisions
Ligand(s) endogène(s) principal(aux)	Vasopressine ; Ocytocine

Tableau 3 : Carte d'identité du récepteur V_{1A}

Le récepteur V_{1A} à la vasopressine module l'action vasoconstrictrice de l'arginine vasopressine ou AVP (voir Tableau 3 ci-dessus). Sa présence a été démontrée dans un grand nombre de tissus dont le cerveau.[76] Il est impliqué dans le système nerveux central dans le cadre de l'action de type neurotransmetteur de l'AVP.[77] Ce récepteur sert également de médiateur en ce qui concerne la prolifération et la contraction des cellules musculaires vasculaires, le foie, la glycogénolyse, l'agrégation des plaquettes, la sécrétion d'aldostérone qui influe sur la volémie plasmatique et la tension artérielle. Le schéma d'expression du récepteur V_{1A} dans le cerveau peut être associé à des comportements sociaux caractéristiques de certaines espèces comme les associations entre individus chez les rongeurs.[78,79] Des polymorphismes dans la région promotrice du gène codant pour le récepteur V_{1A} ont été associés à une inhibition pré pulsion,[80] la prise de décision dans un jeu[81] ainsi que la performance créative en danse chez les humains.[82] Il a même été découvert une association entre les polymorphismes du gène codant pour le récepteur V_{1A} et l'autisme attendant confirmation,[83] obtenue quelques années plus tard.[84] Ce récepteur est également mis en cause dans

[73] S. M. Foord, T. I. Bonner, R. R. Neubig, E. M. Rosser, J.-P. Pin, A. P. Davenport, M. Spedding, A. J. Harmar, *Pharmacol. Rev.* **2005**, *57*, 279–288
[74] R. Yoshimura, H. Kiyama, T. Kimura, T. Araki, H. Maeno, O. Tanizawa, M. Tohyama, *Endocrinology* **1993**, *133*, 1239–1246
[75] J. Frayne, H. D. Nicholson, *Mol. Hum. Reprod.* **1998**, *4*, 527–532
[76] N. L. Ostrowski, S. J. Lolait, D. J. Bradley, A. M. O'Carroll, M. J. Brownstein, W. S. Young, *Endocrinology* **1992**, *131*, 533–535
[77] I. Reymond-Marron, E. Tribollet, M. Raggenbass, *European Journal of Neuroscience* **2006**, *24*, 1565–1574
[78] M. M. Lim, Z. Wang, D. E. Olazábal, X. Ren, E. F. Terwilliger, L. J. Young, *Nature* **2004**, *429*, 754–757
[79] D. Vezzosi, D. Cartier, C. Régnier, P. Otal, A. Bennet, F. Parmentier, M. Plantavid, A. Lacroix, H. Lefebvre, P. Caron, *Eur. J. Endocrinol.* **2007**, *156*, 21–31
[80] R. Levin, U. Heresco-Levy, R. Bachner-Melman, S. Israel, I. Shalev, R. P. Ebstein, *Psychoneuroendocrinology* **2009**, *34*, 901–908
[81] A. Knafo, S. Israel, A. Darvasi, R. Bachner-Melman, F. Uzefovsky, L. Cohen, E. Feldman, E. Lerer, E. Laiba, Y. Raz, et al., *Genes Brain Behav.* **2008**, *7*, 266–275
[82] R. Bachner-Melman, C. Dina, A. H. Zohar, N. Constantini, E. Lerer, S. Hoch, S. Sella, L. Nemanov, I. Gritsenko, P. Lichtenberg, et al., *PLoS Genet.* **2005**, *1*, e42
[83] S.-J. Kim, L. J. Young, D. Gonen, J. Veenstra-VanderWeele, R. Courchesne, E. Courchesne, C. Lord, B. L. Leventhal, E. H. Cook, T. R. Insel, *Mol. Psychiatry* **2002**, *7*, 503–507

certaines pathologies. En effet, la surexpression du récepteur V_{1A} a été trouvée dans l'hyperplasie adrénale macronodulaire indépendante de l'adrénocorticotrophine qui est une perturbation de la production de cortisol dans l'organisme.[85,86]

Il a été montré que deux récepteurs V_{1A} peuvent souvent s'associer pour former un homodimère *in vitro* (observation faite également sur d'autres récepteurs) et même s'hétérodimériser avec les récepteurs à l'ocytocine.[87,88] Cet aspect de dimérisation du récepteur V_{1A} avec un second récepteur est important pour une raison très simple : dans le cadre d'expériences de pharmacologies *in vitro* (détaillées au paragraphe XI p.309, chapitre 2, *Partie B* – **Travaux de recherche**) seul un récepteur est transfecté dans des cellules et donc surexprimé. Ce point est à mettre en parallèle des cellules *in vivo* car il pourra être observé de façon certaine des changements au niveau pharmacologie. Une manière intéressante de procéder est donc, après l'étude *in vitro* sur des cellules transfectées, d'exécuter l'expérimentation tout d'abord *in vitro* sur des cellules naturelles et enfin *in vivo* pour que soit intégré dans les paramètres l'environnement naturel des cellules comme le tissu dans lequel elles se trouvent, les multiples récepteurs présents à leur surface ou encore le fluide biologique à leur contact.

I.H.2. Le récepteur CCKB-R (ou CCK2-R)

Le récepteur à la CCK (pour « Cholecystokinine ») existe sous deux types : CCK-A et CCK-B qui possèdent une importante homologie de séquence.[89] On retrouve les deux entités au niveau du cerveau, dans quelques cellules cérébrales et dans la moelle épinière de quelques espèces pour CCK-A et plus largement distribué dans le cortex cérébral, le cervelet, les ganglions basals et les amygdales en ce qui concerne CCK-B.[90,91] Ce dernier est largement impliqué dans la digestion, le contrôle de la satiété, l'anxiété, les accès de panique et l'analgésie (voir Tableau 4 ci-dessous).

[84] N. Yirmiya, C. Rosenberg, S. Levi, S. Salomon, C. Shulman, L. Nemanov, C. Dina, R. P. Ebstein, *Mol. Psychiatry* **2006**, *11*, 488–494
[85] T. Mune, H. Murase, N. Yamakita, T. Fukuda, M. Murayama, A. Miura, T. Suwa, J. Hanafusa, H. Daido, H. Morita, et al., *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **2002**, *87*, 5706–5713
[86] D. Vezzosi, D. Cartier, C. Régnier, P. Otal, A. Bennet, F. Parmentier, M. Plantavid, A. Lacroix, H. Lefebvre, P. Caron, *Eur. J. Endocrinol.* **2007**, *156*, 21–31
[87] S. Terrillon, T. Durroux, B. Mouillac, A. Breit, M. A. Ayoub, M. Taulan, R. Jockers, C. Barberis, M. Bouvier, *Mol. Endocrinol.* **2003**, *17*, 677–691
[88] S. Terrillon, C. Barberis, M. Bouvier, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2004**, *101*, 1548–1553
[89] A. de Weerth, J. R. Pisegna, K. Huppi, S. A. Wank, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1993**, *194*, 811–818
[90] Y. M. Lee, M. Beinborn, E. W. McBride, M. Lu, L. F. Kolakowski, A. S. Kopin, *J. Biol. Chem.* **1993**, *268*, 8164–8169
[91] Shulkes, A., and Baldwin, G. S., *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology*, **1997**, *24*, 209–216

Classe[92]	A
Autre sous-type	CCK-1 (ou CCK-A)
Localisation	Système nerveux central (CCK-A et CCK-B)
Voie de signalisation	Couplage à la protéine G_q, activation de PLC, stimulation de l'hydrolyse de phosphatidylinositol et recrutement de Ca^{2+} intracellulaire
Rôle/implication métabolique	Modulation de l'anxiété, des paniques, de l'analgésie et de la satiété
Ligand(s) endogène(s) principal(aux)	CCK-4, CCK-8, CCK-33, gastrine-17

Tableau 4 : Carte d'identité du récepteur B à la cholecystokinine

Certaines études tendent même à montrer qu'il serait impliqué dans les affections neuropsychiatriques. Ses ligands naturels proviennent du neuropeptide CCK largement présent dans le système nerveux des mammifères. Celui-ci est un propeptide de 158 acides aminés sécrété au niveau du duodénum et coupé en plusieurs fragments par activité enzymatique. Le récepteur CCK-B humain a pu être cloné à partir d'ADNc isolé grâce à une sonde d'hybridation, qui n'était autre que le récepteur canin à la gastrine, dans le but d'identifier la version humaine par criblage.[93] Une expérience d'hybridation par Southern blot a montré qu'un unique gène codait pour les récepteurs CCK-B cérébraux et stomacaux. Il a été montré que les récepteurs CCK-B pouvaient être transfectés de manière stable et surexprimés dans des cellules HEK (pour « Human Embryonic Kidney ») tout en conservant leur activité.[94] C'est ce modèle cellulaire qui a été choisi pour les expérimentations détaillées au paragraphe VIII p.363, chapitre 2, *Partie B* – **Travaux de recherche** en tant que validation de la méthodologie développée au cours de cette thèse.

II. Théorie de la liaison d'un ligand à son récepteur

II.A. Présentation des grandeurs mesurées

Dans le cadre de la théorie de la liaison d'un ligand (peptidique ou protéique) envers un récepteur il existe plusieurs expérimentations qui permettent de caractériser le comportement dudit ligand pour son récepteur via la mesure de différentes constantes. Ces grandeurs ont été développées pour mesurer d'une part l'aspect cinétique, d'autre part l'aspect thermodynamique d'une interaction ligand-récepteur (voir Tableau 5 ci-dessous).

[92] Voir note de bas de page 73 p.38
[93] Voir note de bas de page 90 p.39
[94] R. Magnan, B. Masri, C. Escrieut, M. Foucaud, P. Cordelier, D. Fourmy, *Journal of Biological Chemistry* **2011**, *286*, 6707–6719

	Type d'expérience	Grandeur physique	Unité	Signification
Grandeur thermodynamique	Saturation	K_d	$mol.L^{-1}$	Mesure de l'affinité d'un ligand pour son récepteur.
		B_{max}	$fmol.mg^{-1}$	Mesure du titre récepteur maximal dans un échantillon donné.
	Compétition	IC_{50}	$mol.L^{-1}$	Concentration en ligand compétiteur à laquelle on observe 50 % de liaison spécifique du ligand traceur.
		K_i	$mol.L^{-1}$	Mesure de l'affinité d'un ligand compétiteur pour son récepteur.
Grandeur cinétique	Cinétique	k_{on}	$L.mol^{-1}.min^{-1}$	Mesure de la vitesse d'association d'un ligand marqué à son récepteur.
		k_{off}	min^{-1}	Mesure de la vitesse de dissociation d'un complexe ligand marqué-récepteur.

Tableau 5 : Types d'expérimentation possibles pour caractériser un récepteur de type RCPG du point de vue fonctionnel.

II.B. Expérience de saturation de la liaison à l'équilibre

Les expériences de saturation donnent accès à la constante de dissociation (K_d) illustrant l'affinité d'une part, et à la quantité maximale de sites de liaison existants (B_{max}) dans un échantillon donné d'autre part dans des conditions expérimentales données. Dans un premier temps le ligand [L*] marqué par une sonde (radioactive, fluorescente ou chimique) dont la constante de dissociation est à déterminer va se lier préférentiellement au récepteur [R], permettant de déterminer la liaison totale (voir Figure 19 ci-dessous). Dans une seconde expérimentation, un ligand compétiteur [L] non marqué va être introduit en large excès, de 100 à 1 000 fois la concentration en ligand [L*], dans le but de chasser ce dernier en saturant le récepteur [R] et ne mesurer que la quantité de ligand [L*] non déplacée, c'est-à-dire celle restée liée à des sites non spécifiques. Par la suite, la soustraction de la mesure de la liaison non spécifique à la liaison totale permet d'obtenir la liaison spécifique et d'atteindre le B_{max} et le K_d du ligand [L*] (voir Figure 22 p.44).

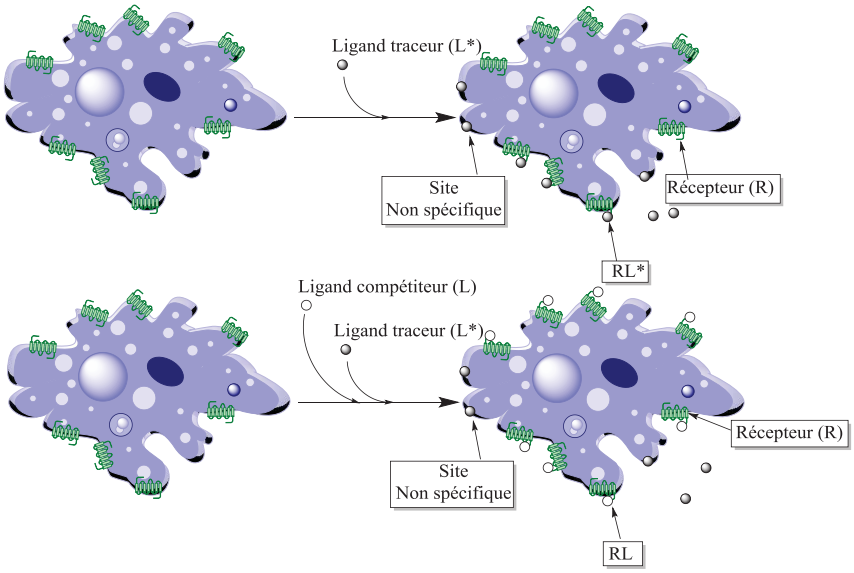


Figure 19 : Représentation des mesures de liaison totale (en haut) et non spécifique (en bas) dans le cadre de l'évaluation d'une interaction ligand/récepteur. Dans le premier cas, le ligand traceur est ajouté à différentes concentrations tandis que dans le second, un ligand compétiteur est rajouté pour saturer le récepteur, déplacer le ligand d'affinité inconnue de ce dernier et mesurer la liaison non spécifique du ligand d'étude sur le substrat biologique choisi

Dans ce cadre-là, des tissus, des cellules entières ou bien des préparations membranaires peuvent être utilisés, voir même des coupes de tissus. Les cellules peuvent être issues de cultures de cellules exprimant soit naturellement le récepteur d'intérêt, soit artificiellement après une transfection. L'avantage d'utiliser une coupe de tissu provient de la possibilité de visualiser une région anatomique entière, point important lorsqu'il s'agit de comparer un état sain d'un état malade. D'un autre côté, les cellules transfectées et les préparations membranaires issues de ces dernières permettent d'obtenir des récepteurs en bien plus grand nombre, car surexprimés, pour augmenter le signal mesuré dans un premier temps et ainsi optimiser les conditions expérimentales sur une quantité confortable de récepteurs.

L'expression de la constante de dissociation K_d découle de la formalisation de l'équilibre étudié (voir Figure 20 ci-dessous), à savoir la dissociation du complexe ligand/récepteur [RL] en ligand libre [L] et site de liaison libre [R].

$$[R] + [L] \underset{k_{off}}{\overset{k_{on}}{\rightleftharpoons}} [RL] \qquad K_d = \frac{k_{off}}{k_{on}} = \frac{[R].[L]}{[RL]}$$

Figure 20 : Equilibre de dissociation d'un couple ligand (L) / récepteur (R). L'équilibre est atteint lorsque les vitesses de dissociation et d'association atteignent des constantes au terme d'un certain temps d'incubation

L'expression du B_{max} peut être obtenue à partir de cette dernière en faisant apparaître la quantité totale de sites de liaison (voir Figure 21 ci-dessous) sous forme de concentration comme étant la soustraction du nombre de site occupés [RL] au nombre de site total [R_{total}]. Cela permet par

la suite, au terme d'une démonstration mathématique, d'aboutir à l'expression du nombre de sites de liaison occupés en fonction du B_{max}.

$$K_d = \frac{([R_{total}] - [RL]).[L]}{[RL]} \Longleftrightarrow K_d + [L] = \frac{([R_{total}] - [RL]).[L]}{[RL]} + \frac{[L] \times [RL]}{[RL]}$$

$$K_d + [L] = \frac{[R_{total}].[L]}{[RL]} \Longleftrightarrow [RL] = \frac{[R_{total}].[L]}{K_d + [L]} \Longleftrightarrow \boxed{[RL] = B_{max} \times \frac{[L]}{K_d + [L]}} \quad \boxed{\mathbf{A}}$$

$$K_d \times [RL] = B_{max}.[L] - [RL] \times [L] \Longleftrightarrow K_d \times [RL] + [RL] \times [L] = B_{max}.[L]$$

$$\boxed{\frac{[RL]}{[L]} = -\frac{[RL]}{K_d} + \frac{B_{max}}{K_d}} \quad \boxed{\mathbf{B}}$$

Figure 21 : Démonstration mathématique amenant à l'expression du nombre de sites de liaison occupés en fonction du B_{max} (A), mettant en évidence le fait qu'à des concentrations en ligand [L] infinies, le nombre de sites occupés tendra vers une quantité maximale de sites de liaisons exprimée par le terme B_{max}. Et démonstration de la linéarisation de Scatchard (B) exprimant le rapport de concentration en ligand lié sur la concentration en ligand libre en fonction de la concentration en ligand lié

L'objectif principal de l'expérience de saturation est de déterminer la constante de dissociation K_d du ligand d'étude en mettant en jeu différentes concentrations de celui-ci dans un intervalle d'un ordre de grandeur en-deçà et au-dessus de la valeur de la constante de dissociation. Cela sous-entendrait que la constante soit connue à l'avance. Deux cas ce présentent alors dans le cas d'un ligand synthétique :

- Soit il s'agit d'une expérience de répétition ou de vérification auquel cas la constante est connue (au moins son ordre de grandeur) et il suffit simplement d'optimiser la répartition des points de mesure autour de cette dernière.
- Soit la constante n'est pas connue. Auquel cas, une approche par tâtonnement peut être envisagée pour cerner la valeur de constante de dissociation.

La linéarisation de Scatchard est un moyen très pratique et très précis pour accéder aux constantes. Celle-ci est inspirée de la linéarisation de Lineweaver-Burk à partir de l'équation de Michaelis-Menten décrivant la vitesse d'une réaction enzymatique. Ce type d'opération mathématique permet de transformer une courbe croissante (voir Figure 22 ci-dessous) en une

droite dont l'intersection avec l'axe des abscisses donne accès au B_{max} et la pente au K_d, sans avoir besoin de supercalculateur.

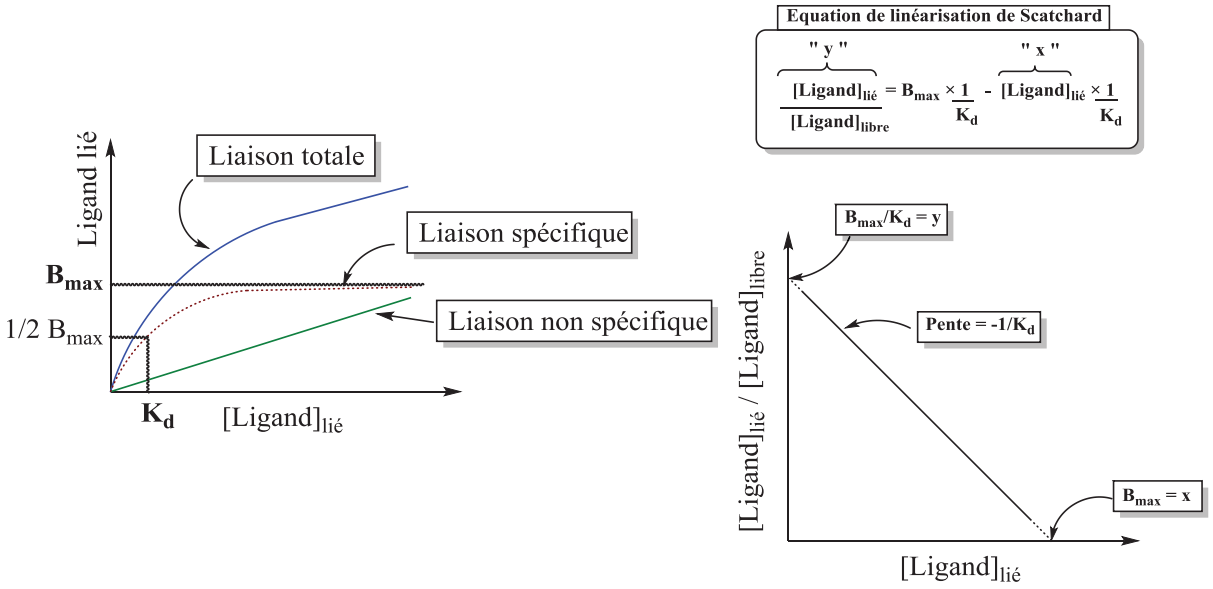


Figure 22 : Représentation graphique d'une expérience de saturation par mesure du ligand lié (à gauche) avec le calcul de la liaison spécifique selon l'équation : Liaison totale = Liaison spécifique + Liaison non spécifique. La représentation de Scatchard permet d'accéder précisément et aisément aux grandeurs mesurées. Le B_{max}, quantité maximale de sites de liaison pour le ligand, est déterminé grâce à la courbe de liaison spécifique ou en prolongeant la linéarisation de Scatchard et en croisant l'axe des abscisses. D'un autre côté, la constante de dissociation K_d est mesurée à l'abscisse correspondant à la moitié du B_{max} ou bien grâce à la pente de la linéarisation de Scatchard

II.C. Expérience de déplacement de la liaison à l'équilibre

Les expériences de compétition ont pour objectif de renseigner la constante de dissociation d'une molécule donnée non marquée qui traduit son affinité par compétition avec un second ligand marqué sur un récepteur commun.

Elles ne peuvent être mise en place qu'après avoir déterminé l'affinité d'une première molécule, la molécule marquée qui sera suivie par une méthode analytique, pour un récepteur donné. En effet, ce type d'expérience met en jeu deux ligands dont un d'affinité connue (généralement le ligand traceur à mesurer) ajouté à une concentration constante et proche de la moitié de sa valeur de K_d. Cela permet de ne pas saturer le récepteur et de permettre un déplacement total par le compétiteur. Ce dernier, dont l'affinité est inconnue, est ajouté en quantités croissantes pour créer une compétition au niveau de la liaison au récepteur et finir par déplacer totalement le traceur. La courbe correspondante est obtenue en indiquant le pourcentage de liaison au récepteur du traceur d'affinité connue en fonction du logarithme de base 10 de la concentration de la molécule dont le K_i est inconnu.

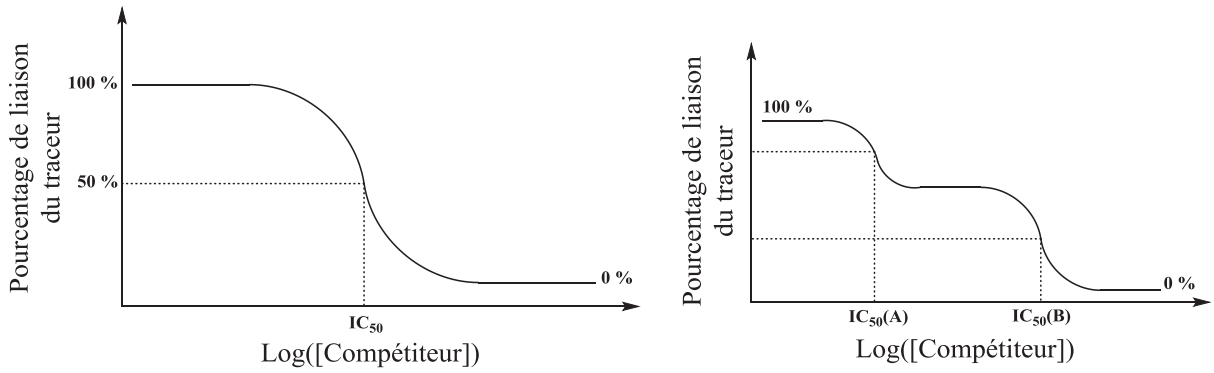


Figure 23 : Représentation graphique d'une expérience de compétition avec un seul site d'affinité à gauche et deux sites d'affinités à droite. Dans chaque cas l'abscisse correspondant à 50 % de la différence entre deux plateaux permet de déterminer graphiquement une valeur d'IC_{50} qui sera utilisée pour calculer la constante de dissociation K_i correspondante

Une courbe de forme sigmoïdale à deux plateaux (voir Figure 23 ci-dessus, courbe de gauche) indique un unique site d'affinité pour la molécule dont le K_i est inconnu. En revanche, si la courbe tracée forme trois plateaux (voir Figure 23 ci-dessus, courbe de gauche), cela indique la présence de deux sites d'affinités. Ces courbes donnent accès à l'IC_{50} qui correspond à la concentration de ligand d'affinité inconnue pour laquelle 50 % des récepteurs sont occupés par ce dernier (les 50 % restants étant occupés par le traceur). Grâce à cette donnée, il est alors possible en utilisant l'équation de Cheng-Prusoff (voir Equation 1 ci-dessous) d'accéder à la constante de dissociation de la molécule d'affinité inconnue dont la démonstration peut être consultée en Partie E – ***Annexes***, paragraphe II.C.2 p.501.[95]

Equation 1 : Relation de Cheng-Prusoff permettant le calcul de la constante de dissociation d'un ligand d'affinité inconnue envers un récepteur

$$K_i = \frac{IC_{50}}{1 + \frac{[L]}{K_d}}$$

Avec :

- K_i : la constante de dissociation du compétiteur exprimée en $mol.L^{-1}$.
- IC_{50} : la concentration en compétiteur déplaçant 50 % du traceur exprimée en $mol.L^{-1}$.
- K_d : la constante de dissociation connue du traceur exprimée en $mol.L^{-1}$.
- [L] : la concentration en traceur mise en jeu exprimée en $mol.L^{-1}$.

II.D. Expérience de cinétique de liaison

Les expériences de cinétique ont pour objectif de mesurer les constantes d'association et de dissociation qui illustrent la vitesse avec laquelle un ligand va se lier et se dissocier de son récepteur. Dans le cadre des expériences de cinétique une concentration fixée de ligand est mise en contact avec un récepteur et des mesures sont effectuées pour des temps d'incubation croissants. Bien

[95] C. Yung-Chi, W. H. Prusoff, *Biochemical Pharmacology* **1973**, *22*, 3099–3108

évidemment il faut pouvoir tenir compte de la liaison non spécifique. Raison pour laquelle une seconde mesure est effectuée avec un ligand en excès d'un facteur 1 000 au moins pour mesurer la liaison non spécifique à chaque point temporel de mesure. L'association est complète lorsque la concentration mesurée en ligand devient constante. A cet instant et une fois le plateau atteint, il est possible d'engager la dissociation par dilution infinie, c'est-à-dire par ajout d'un tampon de liaison exempt de ligand, ou bien par compétition en ajoutant en très large excès un ligand compétiteur.

Pour déterminer les constantes d'association et de dissociation, il faut tracer une courbe reliant les concentrations mesurées en fonction du temps qui permet d'accéder à la constante k_{obs}. La même opération sur les données de la dissociation permet, quant à elle d'accéder à la constante k_{off}. Il est alors possible de déduire la constante k_{on} (voir Figure 24 ci-dessous).

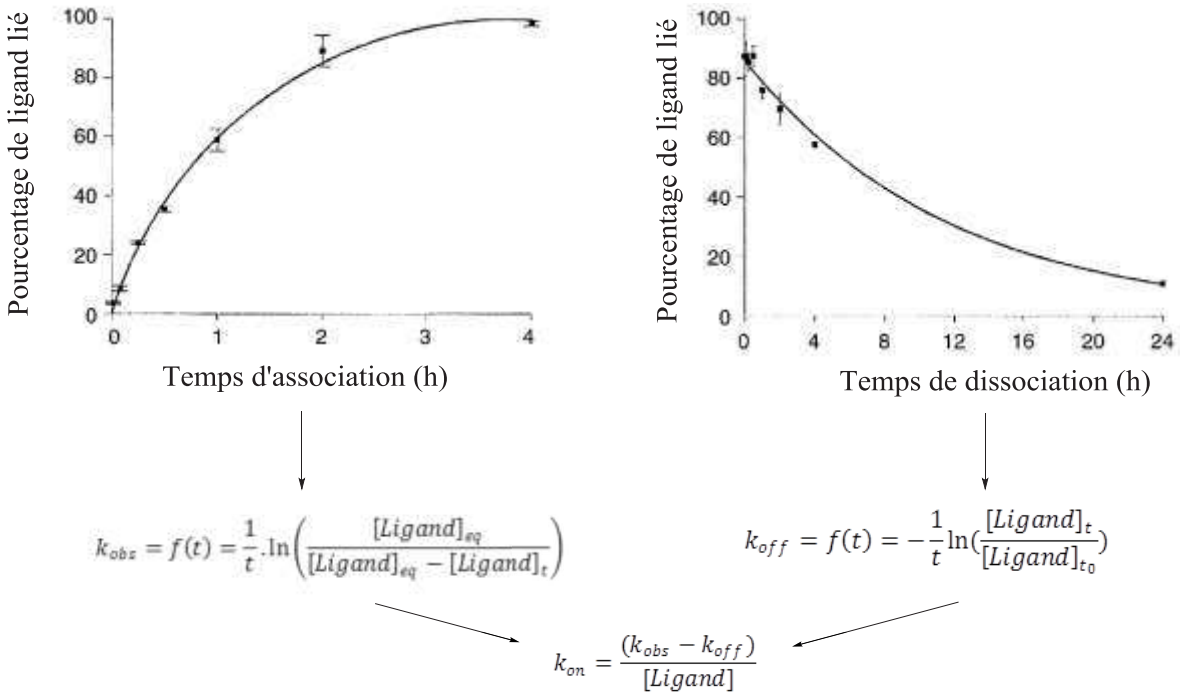


Figure 24 : Principe général d'une expérience de cinétique. La quantité de ligand mesurée (en concentration ou en pourcentage) est tracée en fonction du temps d'association et de dissociation jusqu'à atteindre un plateau. Le tracé en fonction du temps des équations Y_{on} et Y_{off} permet d'obtenir une droite et les constantes k_{obs} et k_{off} respectivement (les pentes des droites) avant de pouvoir accéder à la constante k_{on}

III. Approches actuelles employées pour le criblage des RCPG

III.A. La radioactivité pour la mesure de la liaison d'un ligand à son récepteur

L'utilisation de radioligands pour la mesure d'interactions protéine-ligand est encore largement répandue pour caractériser un récepteur.[96,97] Le choix du radioligand doit se faire avec attention étant donné que c'est son signal qui est mesuré et que le radiomarquage peut influencer la

[96] L. A. A. de Jong, D. R. A. Uges, J. P. Franke, R. Bischoff, *J. Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.* **2005**, *829*, 1–25
[97] J. J. Maguire, R. E. Kuc, A. P. Davenport, *Methods Mol. Biol.* **2012**, *897*, 31–77

liaison d'un ligand à son récepteur (e.g : HO-LVA vs [^{125}I]HO-LVA envers le récepteur V_{1A}).[98,99] Les avantages principaux que possède cette approche par radiomarquage sont la sensibilité accrue de la mesure ainsi que les modifications minimales opérées lors de l'ajout d'un atome radioactif minimisant les effets de l'ajout d'iode sur l'interaction ligand-récepteur. Deux radioisotopes sont majoritairement utilisés : ^{3}H et ^{125}I.

Le tritium fait partie, avec l'iode 125 et le carbone 14 (voir Tableau 6 p.48), des principaux radionucléides utilisés pour la mesure d'interaction protéine-ligand par radioactivité. Celui-ci émet un rayonnement de type β^- en se désintégrant en ^{3}He. Le marquage s'effectue soit par échange hydrogène/tritium, soit par réaction chimique classique comme l'hydrogénation catalytique à base de tritium, la dés-halogénation avec du $^{3}H_2$ catalysée par un métal, la réduction via des hydrures, une réaction de méthylation ou encore l'acétylation d'amines grâce à de l'anhydride acétique préalablement tritié. Le principal inconvénient du tritium incorporé dans ces radioligands provient de sa longue demi-vie qui, bien que permettant un stockage sur une longue période, présente une faible activité radioactive (30 – 100 Ci/mmol) et une émission faible d'énergie. Cela peut, d'une part endommager le ligand à moins de stocker le composé au froid avec un produit pour contrer les effets du rayonnement β^- comme l'éthanol, d'autre part poser problème au niveau de l'efficacité de la détection. Le principal inconvénient de l'iode 125, au contraire, est bien sa demi-vie relativement courte de 59,4 jours qui force son utilisation rapidement après sa production.

L'iode 125 est l'isotope radioactif de l'iode couramment utilisé en pharmacologie pour ces études de liaison. C'est un radionucléide artificiel produit par les réacteurs nucléaires considéré comme un émetteur X (rayonnement à 27 KeV) et un émetteur γ (rayonnement à 35 KeV). Ses émissions peuvent être stoppées par des écrans d'acier ou de plomb. Son introduction dans les biomolécules est aisée en particulier sur les chaînes latérales des acides aminés comme la tyrosine (où il est introduit en position ortho) et l'histidine. Sa forte activité (2 000 Ci/mmol) permet d'améliorer la sensibilité de l'expérimentation et même la diminution des quantités de récepteurs et de ligands utilisés. Ce qui est très intéressant compte-tenu du fait que les ligands radiomarqués sont très souvent affins pour leur récepteur (K_d de l'ordre du nanomolaire voir subnanomolaire) et que les concentrations utilisées lors de l'expérimentation peuvent très vite saturer le récepteur. Ceci est une chose à éviter car il faut pouvoir mesurer une augmentation progressive de la quantité de ligand qui se lie au récepteur pour déterminer la constante de dissociation de façon fiable. Un autre enjeu important pour les radioligands est la possibilité de recourir à un agoniste, antagoniste ou agoniste

[98] B. Chini, B. Mouillac, Y. Ala, M. N. Balestre, S. Trumpp-Kallmeyer, J. Hoflack, J. Elands, M. Hibert, M. Manning, S. Jard, *EMBO J.* **1995**, *14*, 2176–2182
[99] M. Thibonnier, J. A. Preston, N. Dulin, P. L. Wilkins, L. N. Berti-Mattera, R. Mattera, *Endocrinology* **1997**, *138*, 4109–4122

inverse sachant qu'il est toujours préférable de choisir une molécule du même type que le compétiteur mis en jeu dans l'expérimentation.

Isotope	Demi-vie	Type de rayonnement	Energie émise	Moyens de détection
^{125}I	59,4 jours	X, γ	35,5 KeV	Sonde à rayons X, sonde γ
^{35}S	87,5 jours	β^-	48,8 KeV	Sonde β (scintillation liquide)
^{33}P	25,34 jours	β^-	250 KeV	Sonde β (scintillation liquide)
^{32}P	14,26 jours	β^-	1 710 KeV	Sonde β (scintillation liquide)
^{14}C	5 730 ans	β^-	156 KeV	Sonde β (scintillation liquide)
^{3}H	12,32 ans	β^-	5,7 KeV	Sonde β (scintillation liquide)

Tableau 6 : Radioisotopes utilisés en phamacologie présentant les demi-vies, le type de rayonnement émis, l'énergie émise et les moyens de détection

D'autres radioisotopes sont également disponibles pour le radiomarquage mais plus rarement utilisés. Le premier d'entre eux, le carbone 14, est un autre élément radioactif dont l'utilisation en radioactivité est limitée par la difficulté de son incorporation dans des biomolécules et sa faible activité qui empêche les mesures sur un court laps de temps, celui d'une expérience de liaison typiquement. Le phosphore 32 quant à lui est surtout utilisé en laboratoire pour marquer des brins d'ADN ou d'ARN ou encore dans les expériences Southern et Western blot, deux techniques de séparation par électrophorèse. Le second isotope radioactif du phosphore (^{33}P) est utilisé pour les mêmes applications à ceci près qu'étant moins énergétique, il fournit une meilleur résolution mais reste plus cher. Enfin, le soufre radioactif (^{35}S) est relativement peu utilisé mais peut servir à marquer des protéines contenant des cystéines et des méthionines comme cela a été le cas, par exemple, lorsqu'Alfred Hershey et Martha Chase ont, en 1952, confirmé que l'ADN était le support de l'hérédité.

III.B. La fluorescence : historique, photochimie et application à l'étude des RCPG

La fluorescence, une forme de luminescence, est caractérisée par l'émission de lumière par un composé qui va absorber de la lumière ou toute autre radiation électromagnétique. La plupart du temps, la lumière émise possède une longueur d'onde plus grande, et donc une énergie plus faible que la radiation absorbée. Ce phénomène est appelé « déplacement de Stokes ». Le point le plus intéressant est l'absorption de radiations dans l'ultraviolet avec une émission de radiation se retrouvant dans le domaine visible (400 – 800 nm) pour l'œil humain. De ce fait, les composés fluorescents se retrouvent visibles uniquement lorsqu'ils sont exposés à de la lumière ultraviolette. A l'inverse de la phosphorescence, pour laquelle les composés continuent de briller après que la source de radiation soit éteinte pour un temps, les substances fluorescentes cessent d'émettre dès l'extinction de la source de radiations. Cependant, lorsque la radiation électromagnétique est

intense, un électron peut alors absorber deux photons. Ce phénomène d'absorption à deux photons induit alors l'émission d'une radiation de longueur d'onde plus faible et de plus grande énergie que la radiation absorbée.

III.B.1. Bref historique

Une des premières observations de la fluorescence est décrite en 1565 par Nicolás Monardes dans une infusion appelée *lignum nephriticum* (« kidney wood ») provenant du bois de deux espèces d'arbres (*Pterocarpus indicus* et *Eysenhardtia polystachya*).[100,101,102,103] Le composé responsable de cette fluorescence étant la matlaline qui est le produit d'oxydation d'un flavonoïde présent dans le bois de ces espèces d'arbre.

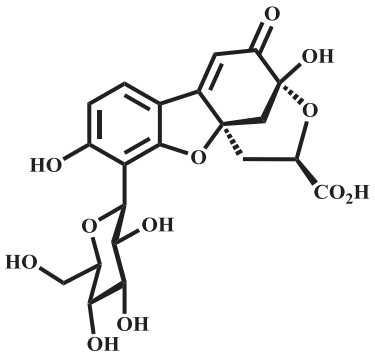


Figure 25 : Structure de la matlaline

En 1819, Edward D. Clarke et René Just Haüy décrivent la fluorescence dans des fluorites (difluorure de calcium ou chaux fluatée)[104,105] tandis que le phénomène fut à nouveau mis en évidence pour la quinine en 1845 par Sir John Herschel.[106,107]

III.B.2. Aspect photochimique de la fluorescence

La fluorescence apparaît lorsqu'un électron orbitalaire d'une molécule, d'un atome ou d'une structure nanométrique va subir une relaxation à partir d'un état singulet excité pour retourner à son état initial tout en émettant un photon (voir Figure 26 ci-dessous).

[100] S. William Edwin, *ANNUAL REPORT OF THE BOARD OF REGENTS OF THE SMITHSONIAN INSTITUTION* **1916**, 271–298
[101] M. Muyskens, Ed Vitz, *Journal of Chemical Education* **2006**, *83*, 765
[102] A. U. Acuña, F. Amat-Guerri, P. Morcillo, M. Liras, B. Rodríguez, *Org. Lett.* **2009**, *11*, 3020–3023
[103] B. Valeur, M. N. Berberan-Santos, *Journal of Chemical Education* **2011**, *88*, 731–738
[104] E. D. Clarke, *The Annals of Philosophy* **1819**, *14*, 34–36
[105] R. J. Haüy, *Traité de minéralogie* **1822**, *1*, 505–527
[106] J. F. W. Herschel, *Philosophical Transactions of the Royal Society of London* **1845**, *135*, 143–145
[107] J. F. W. Herschel, *Philosophical Transactions of the Royal Society of London* **1845**, *135*, 147–153

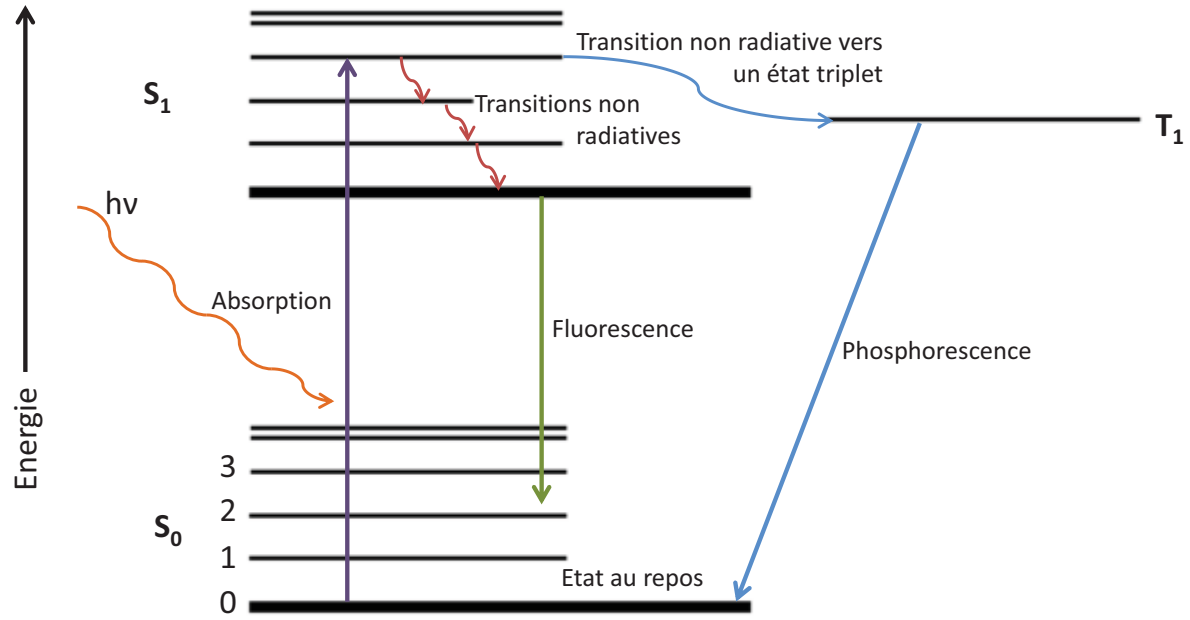


Figure 26 : Excitation et relaxation d'un électron lors du processus de fluorescence par opposition au phénomène de phosphorescence

$Excitation : S_0 + hv_{ex} \rightarrow S_1$
$Fluorescence : S_1 \rightarrow S_1 + hv_{em} + \Delta$
$Phosphorescence : S_1 \rightarrow T_1 \rightarrow S_1 + hv'_{em} + \Delta$, où « hv » est le terme générique désignant l'énergie d'un photon, h étant la constante de Planck, Δ la chaleur émise et ν, la fréquence lumineuse.

S_0 constitue l'état initial, ou état au repos, du fluorochrome et S_1 son premier état singulet excité immédiatement supérieur en énergie à S_0. Plusieurs voies de relaxations sont alors possibles pour une substance dans l'état S_1 :

- Relaxation non radiative : cas pour lequel l'énergie d'excitation est dissipée sous forme de chaleur (vibrations).
- Phosphorescence : cas pour lequel les substances excitées se relaxent en passant par un état triplet qui par la suite vont subir une relaxation pour donner la phosphorescence.
- Fluorescence : cas pour lequel les substances excitées se relaxent vers l'état S_0 en émettant une radiation.

La fluorescence trouve de nombreuses applications en sciences de la terre (minéralogie, gemmologie) et en sciences du vivant, notamment en biochimie, pharmacologie et médecine (voir Figure 27 p.51).

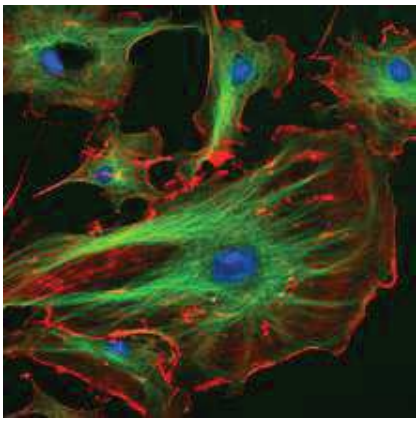


Figure 27 : Visualisation de cellules endothéliales par fluorescence à trois canaux marquant spécifiquement des constituants cellulaires (bleu : noyaux ; rouge : actine ; vert : micro tubules)[108]

III.B.3. Application de la fluorescence et du FRET à l'étude de RCPG

En sciences du vivant la fluorescence est en général utilisée comme une manière non destructrice de suivre et d'analyser des composés biologiques grâce à ces émissions de lumière à des fréquences spécifiques pour lesquelles aucun bruit de fond provenant de la radiation incidente n'est observé. En effet, très peu de composés cellulaires sont naturellement fluorescents ; on parle alors de fluorescence intrinsèque, ou autofluorescence. On s'intéressera uniquement au marquage fluorescent par des groupements externes aux substances marquées possédant cette propriété de fluorescence, appelés fluorochromes. Ceux-ci peuvent être des petites molécules ou même des protéines. Ces molécules peuvent être fixées sur des protéines, comme les RCPG, grâce à des groupes fonctionnels tels que :

- Les groupements amino via des succinimides, isothiocyanates ou encore hydrazines.
- Les groupements carboxyles par l'intermédiaire des carbodiimides.
- Les groupements thiol à travers des maléimides ou encore des bromures d'acétyle.

Les fluorochromes organiques ont cette capacité de fluorescer grâce à leurs électrons délocalisés qui permettent de stabiliser l'énergie absorbée, c'est la raison pour laquelle beaucoup de fluorochromes sont des systèmes conjugués. Plusieurs familles existent avec des gammes d'excitation allant de l'infrarouge à l'ultraviolet. Les lanthanides chélatés, à titre d'illustration, sont des métaux fluorescents uniques qui émettent grâce à des transitions énergétiques mettant en jeu leur orbitales 4*f* mais présentant de faibles coefficients d'absorption et une émission lente. Ceci nécessite une excitation via des groupements chélatant organiques comme le dipicolinate de terbium (III).[109] Il existe également une troisième classe de molécules fluorochromes composée de complexes de métaux de transition. Ceux-ci ont la capacité de fluorescer grâce à un processus de

[108] Cellules endothéliales vues au microscope, 2010, repéré à https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/0/09/FluorescentCells.jpg
[109] J. B. Lamture, T. G. Wensel, *Bioconjugate Chemistry* **1995**, *6*, 88–92

transfert de charge entre le métal et le ligand. La plupart du temps ces fluorochromes sont constitués de ruthénium, de rhénium ou d'osmium.[110]

Un type particulier de fluorescence très utilisée est le FRET pour « Förster Resonance Energy Transfert » ou « Fluorescence Resonance Energy Transfert » (voir Figure 28 ci-dessous) qui est un phénomène au sein duquel l'énergie d'un électron excité d'un fluorochrome (donneur à longue fluorescence à 620 nm), est transférée à un accepteur voisin (fluorescence courte). Ce peut-être un corps noir qui va totalement absorber l'énergie sans réémission ou un autre fluorochrome qui possèdera un spectre d'excitation qui chevauchera le spectre d'émission avec pour conséquence une intensité de fluorescence moindre à une longueur d'onde de 665 nm. Ce type de fluorescence peut être très utile pour :

- Détecter un contact entre deux protéines (dans le cadre d'une interaction protéine-récepteur par exemple) ou acides nucléiques marqués, ou une molécule doublement marquée puis hydrolysée.
- Détecter des changements de conformation.
- Mesurer des concentrations au cours d'expériences de liaison compétitive sur des RCPG à titre d'exemple.

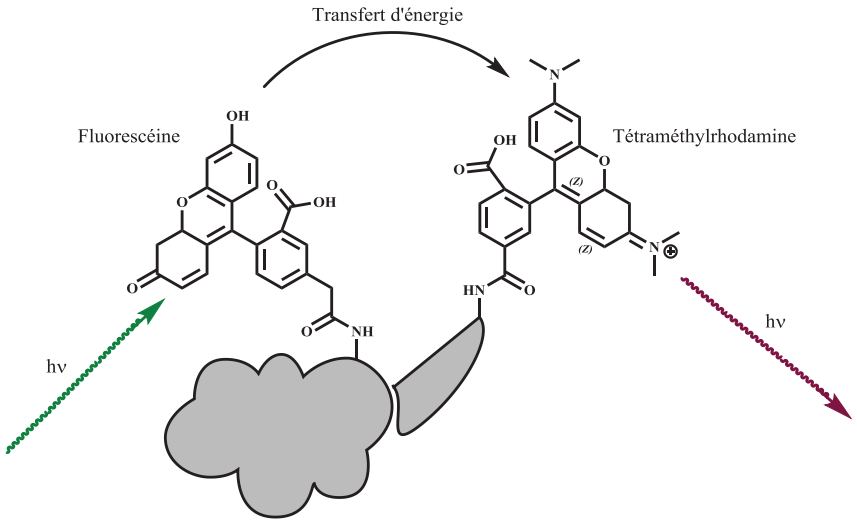


Figure 28 : Mécanisme de transmission d'énergie par FRET pour « Förster Resonance Energy Transfert ». L'énergie incidente à 337 nm est absorbée par le fluorophor donneur (la fluorescéine) puis est transmise au fluorochrome receveur (la tétraméthylrhodamine) pour être réémise à 620 nm

Cependant, avant que la fluorescence n'apparaisse et ne se démocratise au cours des 30 dernières années, l'utilisation de la radioactivité en tant que marqueur était largement acceptée. La technique a peu à peu gagné du terrain notamment grâce aux avantages qu'elle présente (voir Tableau 7 ci-dessous) et ce malgré ses inconvénients.

[110] J. N. Demas, B. A. DeGraff, *Journal of Chemical Education* **1997**, *74*, 690

Avantages de la fluorescence	Inconvénients de la fluorescence
Meilleure sécurité	Toxicité
Utilisation facilité	Interférence avec certains processus biologiques
Multiplexage de la fluorescence (utilisation de plusieurs fluorochromes simultanément avec plusieurs canaux d'acquisition)	Utilisation de deux radionucléides simultanés maximum (^{3}H et ^{33}P grâce à leurs intensités différentes)
Transfert d'énergie (FRET)	Larges molécules à lier aux protéines et aux ligands

Tableau 7 : Avantages et inconvénients de la fluorescence appliquée aux sciences du vivant

III.C. La technique HTRF, une récente amélioration du FRET

Cette approche HTRF (pour « Homogenous Time-Resolved FRET »),[111] parfois connue par le sigle TF-FRET pour « Time-Resolved-FRET », est dérivée du FRET en combinant cette technologie avec un délai temporel avant la mesure de fluorescence. On y retrouve donc le transfert d'énergie entre deux fluorochromes en contact rapproché. La principale avancée, par rapport au FRET qui souffrait de problèmes de fort bruit de fond lors de la mesure de la fluorescence, est l'introduction d'un délai (50-150 µs) avant la mesure de la fluorescence des molécules marquées. Celui-ci est appliqué entre l'excitation initiale et la prise de mesure, ce qui permet d'éliminer tout bruit de fond (toute fluorescence non spécifique) causé par des émissions à courte durée de vie caractéristiques de ce bruit de fond étant donné que les fluorochromes sont conçus pour émettre sur une longue durée (voir Figure 29 ci-dessous).

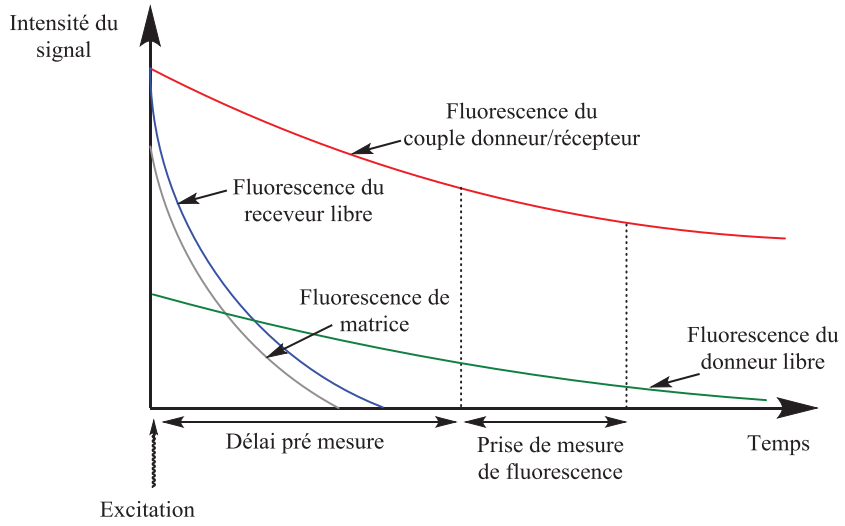


Figure 29 : L'émission d'énergie à partir d'une source d'excitation (lampe, LASER) est suivie d'un délai prévu pour prendre en compte la décroissance des émissions de fluorescence à courte durée de vie. La ligne rouge correspond au signal FRET à 665 nm, la ligne verte au signal du donneur libre de fluorescence à 620 nm, la ligne grise à la fluorescence de la matrice (i.e : les composés présents dans le tampon) et la ligne bleue au signal de l'accepteur libre de fluorescence

L'élément central des fluorochromes à HTRF est le lanthanide qui peut être soit de l'Europium (Eu^{3+}) soit du Terbium (Tb^{2+}), sachant que le Terbium donne un signal 10 à 20 fois plus

[111] F. Degorce, *Current Chemical Genomics* **2009**, *3*, 22–32

intense que son acolyte. Bien entendu, ils ne sont pas fluorochrome à eux seuls mais nécessitent une antenne pour collecter l'énergie incidente. Rôle joué par la cage moléculaire qui les entoure (voir Figure 30 ci-dessous) et qui permet le transfert d'énergie au receveur.

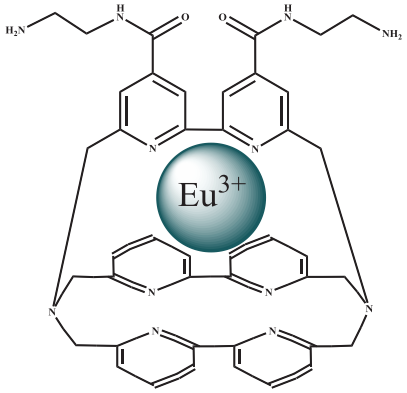


Figure 30 : Structure du cryptate d'europium utilisé en HTRF. On parle de cryptate car le lanthanide est enfermé dans une cage à l'image d'une crypte

Les signaux HTRF sont mesurés à deux longueurs d'onde correspondant au donneur (620 nm) et au receveur (665 nm). C'est le grand avantage de la technique : cela permet d'une part de réduire les variations entre micro-tubes, d'autre part d'étalonner les mesures par rapport à l'émission du donneur. En effet, pour une mesure dupliquée donnée, l'intensité des deux signaux peut varier à cause d'interférences. Cependant le rapport entre les intensités des deux longueurs d'onde doit être constant, tout du moins proche, ce qui permet de réduire cette variabilité inter micro-tubes. Second point, l'émission du donneur sert d'étalon interne étant donné que ce dernier n'est pas affecté par l'expérimentation menée, tandis que l'émission du receveur sert d'indicateur de l'évolution de la réaction biologique suivie (voir Figure 31 ci-dessous).

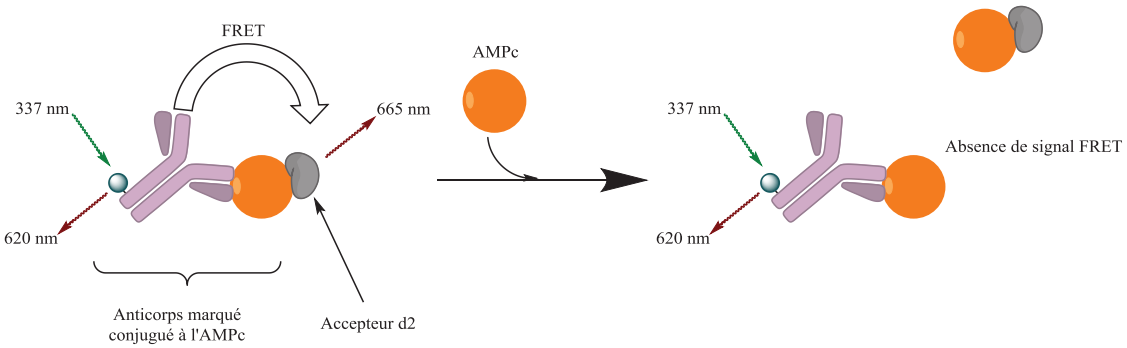


Figure 31 : Principe de l'expérience de suivi de l'AMPc qui consiste en la mesure du signal FRET du complexe AMPc-d2. De l'AMPC liée à un anticorps portant un fluorochrome donneur se complexe avec l'accepteur d2 pour émettre le signal FRET par excitation du premier à 337 nm. Au fur et à mesure que de l'AMPc libre est produite par la cascade réactionnelle d'un RCPG, celle-ci complexe l'accepteur d2 conduisant à la diminution puis à l'arrêt du signal FRET

Les applications de cette technique sont nombreuses. Récemment, l'approche HTFR a été utilisée dans une expérimentation fonctionnelle mettant en jeu la ghréline et un RCPG au sein de

l'IBMM (le récepteur à hormone de croissance sécrétagogue de type 1a, ou GHS-R1a).[112] La quantification de messagers secondaire de l'activation d'un RCPG (expérimentation fonctionnelle) fait également partie des applications possibles de l'HTRF tout autant que des études de dimérisation de récepteur (expérimentation mécanistique).[113] D'autres, comme les interactions protéine virale/protéine humaine ou ADN/protéine peuvent être suivies par cette approche et, de façon générale, toute interaction mettant en jeu deux protéines. Enfin cette technique peut aussi être utilisée pour effectuer du contrôle qualité de bioprocédé cherchant à produire des molécules biothérapeutiques,[114] c'est-à-dire par culture cellulaire, et même pour de la détection de biomarqueurs.[115]

III.D. La technique SPR, une approche de type « Label-free »

La résonance plasmonique de surface (SPR pour « Surface Plasmonic Resonance ») est une technique de détection de l'interaction de deux molécules qui se base, quant à elle, sur un changement de l'indice de réfraction d'une surface « sonde ». Ce phénomène est caractérisé par une oscillation résonnante d'électrons stimulée par une lumière incidente. Cette oscillation se produit à l'interface entre deux couches de matériaux de permittivités[116] opposées (e.g : une couche métallique et l'air). La résonnance est quant à elle atteinte pour une fréquence particulière des photons incidents, et donc une longueur d'onde, qui doit correspondre à la fréquence naturelle d'oscillation des électrons.

Lorsque le faisceau lumineux incident touche la surface d'analyse, il s'en suit la propagation dans la surface métallique d'une onde électromagnétique non-radiative : le polariton plasmonique de surface. Ce dernier est extrêmement sensible à tout changement de la surface comme l'adsorption de molécule étant donné que l'onde se propage à la limite entre la surface métallique et le milieu extérieur (air, verre d'un prisme).

Lorsque le polariton plasmonique rencontre et interagit avec une particule locale ou une irrégularité, comme une biomolécule adsorbée, une partie de l'énergie peut être à nouveau émise sous forme de lumière. C'est cette émission qui peut être détectée dans une direction qui dépendra de l'angle d'incidence de la source lumineuse et de l'angle de résonnance plasmonique de surface.

---

[112] J.-P. Leyris, T. Roux, E. Trinquet, P. Verdié, J.-A. Fehrentz, N. Oueslati, S. Douzon, E. Bourrier, L. Lamarque, D. Gagne, et al., *Analytical Biochemistry* **2011**, *408*, 253–262

[113] F. Ciruela, V. Casadó, R. J. Rodrigues, R. Luján, J. Burgueño, M. Canals, J. Borycz, N. Rebola, S. R. Goldberg, J. Mallol, et al., *J. Neurosci.* **2006**, *26*, 2080–2087

[114] E. Idusogie, J. Castro, C. Casipit, A. Sato, Y. Terasawa, M. Mulkerrin, *BioProcess Int* **2008**, *6*, 20–33

[115] H. Lewis, D. Beher, N. Cookson, A. Oakley, M. Piggott, C. M. Morris, E. Jaros, R. Perry, P. Ince, R. A. Kenny, et al., *Neuropathology and Applied Neurobiology* **2006**, *32*, 103–118

[116] La permittivité est une propriété physique essentielle qui mesure la résistance d'un milieu soumis à un champ électrique, en l'occurrence un faisceau lumineux.

La première expérience basée sur la SPR a été publiée par Liedberg, Nylander et Lundström en 1983.[117] Au cours de leur expérimentation, des immunoglobulines de type IgG ont été adsorbées sur un film d'argent de 600 Å d'épaisseur à partir d'une solution aqueuse pour tenter de les détecter sur ce film métallique. C'est une approche qui peut être utilisée aussi bien pour la détection de gaz que la biodétection. L'avantage de cette technique par rapport à d'autres expérimentations comme le test ELISA est bien son absence de marquage en cela qu'aucune molécule sonde n'est nécessaire pour détecter un analyte.[118]

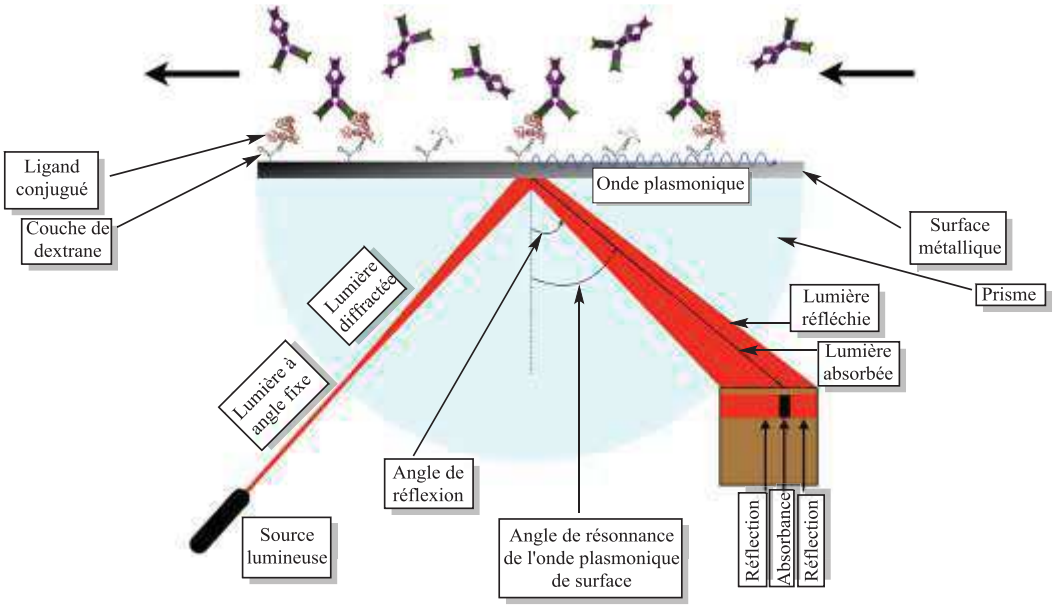


Figure 32 : Schéma d'une plaque à SPR. La surface métallique est recouverte par une couche de dextrane (un exopolysaccharide naturel) capable de se lier aux NH_2 terminaux des protéines. Une lumière est émise et diffractée par le prisme frappant sous de multiples angles la surface métallique. Tous les rayons diffractés sont réfléchis par la surface métallique sauf pour l'angle pour lequel le métal absorbera la radiation transformée en onde plasmonique. Cela entraîne une absence de réflexion et une faible intensité sur le détecteur. Comme l'onde se déplace à la surface du métal, n'importe quel changement dans la surface fera varier cet angle

Grâce à la SPR il est possible de déterminer des constantes de dissociation étant donné que c'est le rapport de la vitesse de dissociation sur la vitesse d'association d'un ligand pour un récepteur, deux grandeurs qui peuvent être obtenues par cette méthode. Pour cela une protéine qui servira d'appât est fixée sur la surface métallique, en l'occurrence imprégnée de dextrane, du cristal de SPR. Par la suite, une solution contenant l'analyte (le ligand) est injectée sur la couche contenant la protéine réceptrice. La liaison du ligand à son récepteur induit une variation au niveau de la surface qui va avoir pour conséquence l'augmentation du signal SPR. Cela permet d'obtenir la vitesse d'association du ligand. Une fois que l'équilibre est atteint, traduit par un plateau dans l'intensité du signal SPR, une solution exempte de ligand est injectée dans le but de déplacer le déplacer et d'engager la dissociation pour, *in fine*, obtenir la vitesse de dissociation de ce ligand. Ces données

[117] B. Liedberg, C. Nylander, I. Lunström, *Sensors and Actuators* **1983**, *4*, 299–304
[118] R. L. Rich, D. G. Myszka, *Anal. Biochem.* **2007**, *361*, 1–6

permettent ensuite d'accéder directement à la constante de dissociation du ligand. L'évolution du signal SPR peut s'expliquer par le couplage de la lumière incidente avec le polariton plasmonique de la surface métallique qui peut être influencé par une modification de la couche/interface jusqu'à une distance de quelques nanomètres, ce qui correspond à la couche de protéine appât additionné de la taille du ligand. C'est la raison pour laquelle la liaison entraînera une modification ressentie par le polariton plasmonique qui aura pour conséquence une modification de l'angle de réflexion de la lumière incidente.

	Expérience	Cible	Technique	Avantages	Inconvénients
Mesure de liaison récepteur/ligand	Mesure de radioactivité	RCPG quelconque	Filtration	Criblage haut débit, peu d'interférences, mesure de l'agoniste et de l'antagoniste en une expérience	Disponibilité du radioligand, déchets radioactifs produits, besoin d'une seconde expérience fonctionnelle
	Mesure de ligand marqué	RCPG quelconque	Système Tag-lite™	Pas de radioactivité, criblage haut débit, peu d'interférences, mesure de l'agoniste et de l'antagoniste en une expérience	Disponibilité du ligand marqué, besoin d'une seconde expérience fonctionnelle
	Mesure d'intensité lumineuse réfléchie	RCPG quelconque	SPR	Pas de marqueur à intégrer (label-free), étude de cinétique d'association et de dissociation, étude d'équilibres de liaison, étude d'interactions protéines-protéines	Surface métallique très fine à produire et à recouvrir par un polymère adapté et très fin (épaisseur totale de l'ordre du nanomètre) permettant l'ancrage de biomolécules
	Dimérisation de récepteurs (mesure de luminescence)	RCPG quelconque	BRET/FRET	Les hétérodimères sont de plus en plus considérés comme des cibles pharmacologiques d'intérêt ➔ Intérêt croissant de l'expérience	Système très artificiel, pas d'accès pour l'instant aux états natifs des dimères de RCPG
Suivi de l'activation des protéines G	Suivi d'AMPc	RCPG à $G\alpha_{i/o}$, $G\alpha_s$	HTRF™, radioactivité, fluorescence	Criblage haut débit, haute sensibilité	Besoin de connaître le mécanisme de liaison et les voies de signalisation, inadapté aux RCPG orphelins, récepteurs mutants (HTRF)
	Suivi de Ca^{2+}	RCPG à $G\alpha_q$ avec $G\alpha_{15/16}$	Fluorescence, FRET, BRET	Criblage haut débit, expérience fonctionnelle sur cellules vivantes, mesure de l'agoniste, de l'antagoniste et d'un allostère en une expérience	Interférences fluorescentes dues aux composés, inadapté pour les agonistes inverses et les agonistes à liaison lente
	Suivi d'IP_1	RCPG à $G\alpha_q$ avec $G\alpha_{15/16}$	HTRF™, radioactivité	Criblage haut débit, expérience fonctionnelle sur cellules vivantes, adaptée aux ligands à liaison lente	Validation à l'étape industrielle limitée
Expérience fonctionnelle	Mutation de récepteur	RCPG quelconque	Mesure par LASER confocal	Imagerie, expérience fonctionnelle sur cellule vivante, méthode générique pour tous les RCPG	Criblage lent
	Recrutement de β-arrestine	RCPG quelconque	BRET/FRET	Criblage haut débit, avec ou sans imagerie, expérience fonctionnelle sur cellule vivante, utile pour la détection de signal biaisé, méthode générique pour tous les RCPG	Méthode à faible sensibilité, affinité pour la β-arrestine variable selon le RCPG

Tableau 8 : Tableau résumé des principales techniques de criblage de RCPG

III.E. La spectrométrie de masse MALDI-ToF comme nouvel outils de mesure de la liaison d'un ligand à son récepteur

La spectrométrie de masse a longtemps été un outil d'analyse avant de devenir la technique de choix pour la caractérisation de molécules du vivant, pour preuve tous les développements autour des domaines d'études « -omiques »[119] tels que la génomique,[120] la peptidomique,[121] la lipidomique,[122,123] la protéomique,[124,125] la transcriptomique,[126] la métabolomique [127,128]et même la vénomique.[129,130]

Les travaux discutés dans cette thèse sont, quant à eux, orientés vers la quantification par dilution isotopique avec ionisation MALDI et analyse par temps de vol. Ceux-ci ont été rendus possible grâce à des résultats antérieurs obtenus dans le cadre de travaux orientés, d'une part sur l'amélioration du signal produit par des biomolécules modifiées,[131] d'autre part sur la détection par spectrométrie de masse MALDI-ToF de molécules modifiées et internalisées par des cellules.[132]

Fort de ces résultats, l'idée développée au cours de cette thèse a été de démontrer la capacité de la spectrométrie de masse MALDI à, non seulement détecter des biomolécules à des concentrations extrêmement faibles, et de surcroît à les quantifier de façon fiable. Le sujet de ces études s'est porté sur des expériences de pharmacologie, à savoir des expériences de saturation à l'équilibre et de liaison compétitive. Le but est alors d'atteindre des grandeurs pharmacologiques traditionnellement obtenues par mesure de radioactivité ou de fluorescence afin d'ouvrir une voie vers une alternative à ces deux techniques. Un avantage certain de l'utilisation du MALDI-ToF étant le fait d'utiliser des récepteurs natifs et non mutants à l'inverse des mesures par HTRF pour lesquelles les récepteurs doivent être mutés en les marquant avec une protéine SNAP

[119] S.-K. Yan, R.-H. Liu, H.-Z. Jin, X.-R. Liu, J. Ye, L. Shan, W.-D. Zhang, *Chin J Nat Med* **2015**, *13*, 3–21
[120] H. Kitano, *Science* **2002**, *295*, 1662–1664
[121] E. Clynen, A. De Loof, L. Schoofs, *General and Comparative Endocrinology* **2003**, *132*, 1–9
[122] A. Carrasco-Pancorbo, N. Navas-Iglesias, L. Cuadros-Rodríguez, *TrAC Trends in Analytical Chemistry* **2009**, *28*, 263–278
[123] N. Navas-Iglesias, A. Carrasco-Pancorbo, L. Cuadros-Rodríguez, *TrAC Trends in Analytical Chemistry* **2009**, *28*, 393–403
[124] S. Gallien, E. Duriez, B. Domon, *Journal of Mass Spectrometry* **2011**, *46*, 298–312
[125] W. X. Schulze, B. Usadel, *Annual Review of Plant Biology* **2010**, *61*, 491–516
[126] A. Valdés, C. Ibáñez, C. Simó, V. García-Cañas, *TrAC Trends in Analytical Chemistry* **2013**, *52*, 142–154
[127] K. Dettmer, P. A. Aronov, B. D. Hammock, *Mass Spectrometry Reviews* **2007**, *26*, 51–78
[128] K. Hollywood, D. R. Brison, R. Goodacre, *PROTEOMICS* **2006**, *6*, 4716–4723
[129] J. R. Prashanth, R. J. Lewis, S. Dutertre, *Toxicon* **2012**, *60*, 470–477
[130] I. Vetter, J. L. Davis, L. D. Rash, R. Anangi, M. Mobli, P. F. Alewood, R. J. Lewis, G. F. King, *Amino Acids* **2011**, *40*, 15–28
[131] D. Lascoux, D. Paramelle, G. Subra, M. Heymann, C. Geourjon, J. Martinez, E. Forest, *Angewandte Chemie International Edition* **2007**, *46*, 5594–5597
[132] D. Paramelle, G. Subra, L. L. Vezenkov, M. Maynadier, C. André, C. Enjalbal, M. Calmès, M. Garcia, J. Martinez, M. Amblard, *Angewandte Chemie International Edition* **2010**, *49*, 8240–8243

(pour « Synaptosomal-Associated Protein ») qui permet par la suite au fluorochrome receveur d'être attaché au récepteur.

La spectrométrie de masse représente un outil qui permet le criblage très rapide, notamment d'interactions ligands/protéines en quelques minutes. Et, grâce au développement instrumental qui permet sans cesse d'améliorer la sensibilité et la résolution des analyses, la spectrométrie de masse peut devenir, à l'instar des techniques par fluorescence, une voie incontournable dans le processus de développement de médicaments. En effet, avec la découverte chaque jour d'interfaces protéiques via des interactions ligand-récepteur impliquées dans diverses pathologies, le nombre de nouvelles cibles thérapeutiques pour l'industrie pharmaceutique augmente exponentiellement.[133] Celles-ci sont alors des cibles de choix pour le développement d'inhibiteur de ces interactions, soulignant la nécessité de poursuivre le développement de stratégies analytiques en spectrométrie de masse.

Conclusion

Les RCPG sont assurément le sujet de recherche le plus prometteur et le plus dynamique en sciences du vivant depuis le lancement du projet de cartographie du génome humain en 1990. La caractérisation du protéome humain est sans aucun doute un projet d'envergure illustré par la dynamique des publications sur le sujet tant du point de vue pharmacologique que du point de vue analytique. De plus, les découvertes des différentes familles A, B et C ainsi que des implications de ces récepteurs dans différentes pathologies de façon régulière attisent l'attractivité de ces derniers. Les techniques de criblage *in silico* ont aussi permis d'accélérer la découverte de récepteurs dits orphelins car non reliés à un ligand naturel et potentiellement sources de projets de recherche pharmacologique.

Les tests d'affinité sont un type d'expérience essentiel pour connaître le comportement de candidats médicaments ou tout simplement d'une molécule envers un récepteur donné. Les expériences de cinétique et de détermination de k_{on} et k_{off}, quant à elles, ont été mises de côté et commencent à trouver un regain d'intérêt, notamment de la part des laboratoires pharmaceutiques. Elles donnent la possibilité, bien entendu de calculer une constante de dissociation. Cependant elles sont aussi des données cinétiques sur l'établissement de l'équilibre et de sa suppression. En effet, pour deux molécules données il est tout à fait possible d'obtenir deux constantes de dissociations identiques avec des différences de cinétique. Et du point de vue d'un laboratoire, un composé qui va s'associer plus rapidement et mettre plus de temps à se dissocier qu'un concurrent sera à même d'activer beaucoup plus longtemps le RCPG donné, ou de l'inactiver beaucoup plus longtemps en fonction de l'effet recherché, d'où un intérêt croissant pour ce type d'expérimentation. Ajoutons à cela le concept des ligands biaisés qui est en train d'ajouter une nouvelle dimension au paradigme

[133] P. Chène, *ChemMedChem* **2006**, *1*, 400–411

des voies de signalisation des RCPG.[134,135,136,137] En effet, ce type de ligand est capable d'activer une cascade de signalisation ou une autre de façon sélective. Cette capacité éveille des intérêts autour de la possibilité de concevoir des ligands avec des effets potentiellement plus intenses, car ciblant spécifiquement une cascade de signalisation au lieu de se disperser via l'activation de plusieurs voies de signalisation. Il a même été proposé que les ligands biaisés puissent engendrer moins d'effets secondaires, ce qui nécessiterait des confirmations par des structures cristallines. En effet, leur principe étant d'activer une unique voie de signalisation par rapport à un ligand natif, l'intérêt devient extrêmement important pour l'industrie pharmaceutique qui y voit là la possibilité de sélectionner une voie de signalisation pour traiter une maladie donnée sans en activer d'autres qui seraient liées aux actuels « effets secondaires » sur des récepteurs tiers. Un autre concept également de plus en plus accepté est la possibilité avancée par différents chercheurs pour les RCPG de s'homodimériser ou même de s'hétérodimériser. Il a été montré par l'équipe de Kern et al en 2012 que les récepteurs à la ghréline, impliqués dans la régulation de l'appétit, et à les récepteurs à la dopamine, impliqués dans le circuit de la récompense, s'hétérodimérisaient.[138] Cela permettrait d'expliquer des comportements qui lieraient prise alimentaire et récompense à une épreuve par exemple. La confirmation de telles hétérodimérisation pourrait à l'avenir permettre de mettre en lumière des comportements particuliers, liés à des addictions ou même des solutions pour se libérer d'addictions délétères pour le corps ou encore découvrir des mécanismes nouveaux pour certaines maladies psychiatriques par exemple.

Les différentes techniques de criblage de récepteurs en pharmacologie comme la radioactivité et la fluorescence sont déjà bien ancrées dans le paysage scientifique pour cela. D'autres techniques alternatives apparaissent toutefois comme des approches crédibles telles que la SPR et plus récemment la spectrométrie de masse MALDI-ToF qui permet de travailler sur des récepteurs naturels non mutés contrairement à l'HTRF, technique très largement employée par l'industrie pharmaceutique car bien adaptée au criblage à haut débit. Cette approche par MALDI-ToF MS est très prometteuse surtout si l'on considère les avancées technologiques des instruments, le développement pour des applications en criblage à haut débit et les nombreuses méthodes de quantification développées à partir de la dilution isotopique (SID pour « Stable Isotope Dilution ») qui feront l'objet du chapitre suivant.

[134] J. W. Wisler, K. Xiao, A. R. Thomsen, R. J. Lefkowitz, *Current Opinion in Cell Biology* **2014**, *27*, 18–24
[135] L. M. Luttrell, *Molecular Endocrinology* **2014**, *28*, 281–294
[136] T. Kenakin, *Nat. Biotechnol.* **2010**, *28*, 928–929
[137] A. K. Shukla, G. Singh, E. Ghosh, *Trends Biochem. Sci.* **2014**, *39*, 594–602
[138] A. Kern, R. Albarran-Zeckler, H. E. Walsh, R. G. Smith, *Neuron* **2012**, *73*, 317–332

Chapitre 2 : La quantification par dilution isotopique de peptides

Dans ce chapitre nous allons nous focaliser dans un premier temps sur l'aspect historique et les fondements de la dilution isotopique (SID). Puis nous poursuivrons avec une introduction à la quantification de peptides et protéines par SID qui a été rendue possible grâce à différentes approches analytiques qui ont été développées au fil des années par le besoin d'accéder à une information quantitative à propos des biomolécules par l'intermédiaire de la spectrométrie de masse. Celle-ci est alors présentée comme une alternative de poids face aux techniques utilisées jusqu'ici (radiomarquage, marquage fluorescent, tests immunologiques…) et à leur inconvénients en termes de coût et de traitement des déchets par exemple. Enfin, ces méthodes de quantification seront regroupées et discutées en trois catégories distinctes : le marquage chimique associée à la dilution isotopique (SID, pour « Stable Isotope Dilution ») qui fait intervenir le chimiste sur sa paillasse, le marquage métabolique associé à la méthode SID qui fait intervenir la cellule dans sa boîte culture cellulaire, et l'approche label-free, seule méthode ne se servant pas la SID, qui fait intervenir des ordinateurs à grande puissance de calcul pour retraiter les données acquises.

Dans le premier paragraphe de ce chapitre nous allons discuter, dans un premier temps, des premiers travaux menés par les chercheurs à propos de la dilution isotopique qui ont démarré en 1996 et ont débouché sur 20 années de recherche florissante. Dans un second temps nous considérerons la nécessité de développer des méthodes de séparations pour l'analyse d'échantillons complexes avant d'aborder les modes de quantification.

I. Historique et fondements de la méthode SID

I.A. Les travaux pionniers en spectrométrie de masse par dilution isotopique (SID-MS)

Le développement de la technique de dilution isotopique a historiquement débuté avec la publication par Barr et al. de travaux qui traite de la première tentative de quantification de protéine par une méthodologie de type « bottom-up » faisant appel à la dilution isotopique en spectrométrie de masse.[139] Le sujet de cette étude était la quantification de l'apolipoprotéine (apo)-A-1 en utilisant des peptides de références synthétisés suivant une stratégie Fmoc, ouvrant ainsi la voie au marquage chimique de biomolécules. Ces peptides étaient marqués par du ^{2}H et par du ^{13}C.[140] Ces éléments ont été introduits grâce à la Leucine-[D_3] et à l'alanine-[$^{13}C_3$] dans 3 peptides protéotypiques de l'(apo)-A-

[139] J. R. Barr, V. L. Maggio, D. G. Patterson, G. R. Cooper, L. O. Henderson, W. E. Turner, S. J. Smith, W. H. Hannon, L. L. Needham, E. J. Sampson, *Clin. Chem.* **1996**, *42*, 1676–1682.

[140] Notation utilisée pour décrire un atome et ses isotopes ${}^{A}_{Z}X$, où A est le nombre de nucléons et Z le nombre de protons. Généralement, seul le nombre de nucléon est indiqué à côté du symbole atomique ; le nombre de protons pouvant être facilement retrouvé grâce à la classification périodique des éléments chimiques.

1. Ces peptides « protéotypiques » sont des peptides dont la séquence est caractéristique et unique à une protéine dans le contexte d'un protéome donné, ce qui permettra une détection efficace en MS.[141] Afin de quantifier les 3 peptides de référence marqués par ces isotopes, l'équipe a procédé à une analyse de l'azote et des acides aminés des peptides. Expérimentalement, il s'agissait d'additionner deux peptides de référence avant digestion trypsique. Le premier peptide donnait une première estimation de la quantité d'apo-A-1 tandis que le second permettait de confirmer la quantité calculée. Le troisième peptide était, quant à lui, ajouté après digestion trypsique d'(apo)-A-1 et était utilisé pour obtenir une mesure absolue. Les résultats obtenus ont été d'une précision impressionnante avec des coefficients de variation de 4 % environ. L'objectif des expérimentations étaient alors de développer une alternative à la détection basée sur des méthodes immunochimiques de mesures d'épitopes pour la quantification de protéines. Un inconvénient de la méthode était, cependant, la nécessité de fournir du matériel en quantités importantes, parfaitement caractérisé et pur. En l'occurrence, il s'agissait de la protéine (apo)-A-1 purifiée et caractérisée à environ 1mg/mL et certifiée sans aucune dégradation ni modification. Compte-tenu du fait que les peptides quantifiés contenaient des acides aminés modifiables et de l'absence de contrôle du taux de digestion trypsique, la quantification par cette technique de traces d'(apo)-1-A dans un milieu biologique complexe est sujet à questionnements. Le fait est que 44 % de l'imprécision expérimentale était attribuable aux différences entre les divers échantillons issus de la digestion trypsique plutôt qu'à une erreur analytique.

En ce qui concerne les peptides, Stocklin et al. ont développés en 1997 une expérimentation par dilution isotopique pour déterminer les niveaux de pro-insuline, d'insuline et de peptide-C[142] contenu dans du sérum de personnes en bonne santé et de patients diabétiques.[143,144] Ils ont produits des analogues de ces trois polypeptides marqués par ^{15}N et/ou ^{2}H grâce à des bactéries *E. coli*, ouvrant ainsi la voie du marquage métabolique. Ces analogues ont ensuite été utilisés comme étalons internes dans des expériences de type « top-down » qui consistent en l'analyse par spectrométrie de masse des protéines intactes. La détection et la quantification de ces polypeptides ont pu être réalisées avec succès grâce à un enrichissement efficace des molécules cibles avant analyse par spectrométrie de masse. En revanche, la sensibilité des méthodes de type « top-down » en MS est limitée par l'importante distribution des états de charge des protéines ; ceci ayant pour conséquence le basculement vers une approche « bottom-up » pour la détection et la quantification des larges protéines de plus de 15 kDa (voir Figure 33 ci-dessous). Dans ce type de stratégie, les

[141] P. Mallick, M. Schirle, S. S. Chen, M. R. Flory, H. Lee, D. Martin, J. Ranish, B. Raught, R. Schmitt, T. Werner, B. Kuster, R. Aebersold, *Nat. Biotechnol.* **2007**, *25*, 125–131
[142] Peptide de connexion entre les chaînes A et B de l'insuline possédant également une bioactivité.
[143] R. Stocklin, L. Vu, L. Vadas, F. Cerini, A. D. Kippen, R. E. Offord, K. Rose, *Diabetes* **1997**, *46*, 44–50
[144] A. D. Kippen, *J. Biol. Chem.* **1997**, *272*, 12513–12522

analyses s'effectuent sur des peptides après digestion enzymatique de la(les) protéine(s) d'intérêt. Dans ce cas-là, les méthodes de quantification absolue, qui reposent sur la dilution isotopique, nécessitent une première d'analyse afin d'identifier, de façon expérimentale (*de novo*) ou prédictive (recherche de séquences peptidiques dans la séquence de la protéine), la signature peptidique de(s) la(les) protéine(s) considérée(s). Dans un second temps, un étalonnage interne est effectué avec un analogue d'un peptide protéotypique et marqué par un isotope stable. Celui-ci est alors introduit dans l'échantillon considéré en quantité définie et connue avant analyse par LC-MS. Ce type d'étalonnage permet ensuite de réduire les biais dû à la quantification et liés à des effets de matrice, d'efficacité d'ionisation et de réponse instrumentale.

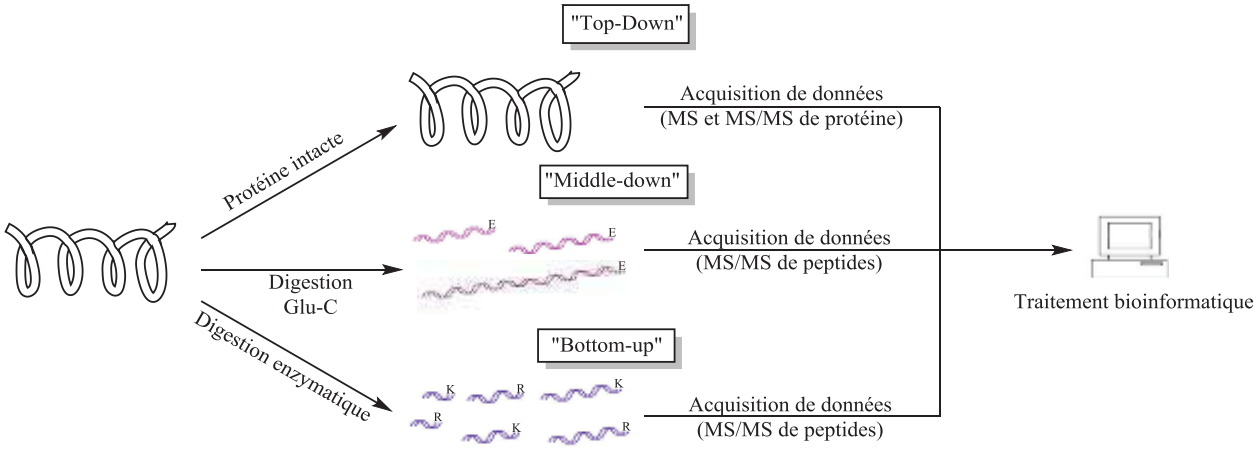


Figure 33 : Représentation schématique des stratégies « bottom-up » (en bas), « middle-down » (au milieu) et « top-down » (en haut). En stratégie « bottom-up » les protéines sont digérées par une enzyme, le plus souvent avec de la trypsine, pour obtenir des peptides protéolytiques très courts, c'est-à-dire obtenus par la coupure enzymatique d'une protéine. L'approche « middle-down » se sert d'enzymes type Glu-C ou Asp-N qui mènent à des peptides protéolytiques de plus grande taille tandis que l'approche « top-down » se sert des protéines intactes

L'approche « top-down » consiste dans un premier temps à analyser par MS les protéines et leurs multiples états de charges après séparation chromatographique. Dans un second temps, celles-ci sont fragmentées en MS^2 de manière ciblée pour obtenir un spectre de fragmentation qui sera comparé à des bases de données comme Uniprot flatfile.[145] L'approche « bottom-up » permet, quant à elle, d'identifier une protéine en comparant la quantité de peptides protéotypiques à ce qui est présent dans la protéine entière et qui doit correspondre de façon stoechiométrique. Cela signifie que les quantités relatives de ces peptides doivent correspondre à leurs rapports au sein de la protéine étudiée. En général, les peptides issus de digestion trypsique (voir Figure 33 ci-dessus) sont idéals pour le séquençage par LC-MS/MS grâce à leur taille relativement petite et au positionnement en C-terminal d'un acide aminé basique. En effet, les résidus arginine et lysine étant bien représentées parmi les protéines, les coupures permettent d'obtenir des peptides de longueur

[145] K. R. Durbin, L. Fornelli, R. T. Fellers, P. F. Doubleday, M. Narita, N. L. Kelleher, *Journal of Proteome Research* **2016**, *15*, 976–982

modérée. En ionisation positive, les ions obtenus sont alors généralement di voir trichargés avec des rapports m/z compris la plupart du temps entre 400 et 1 000 Th. De plus, grâce à la fragmentation par CID basse énergie, on voit apparaître de façon prédominante des fragments correspondant aux séries d'ions b et y.[146] Au final, une protéine sera identifiée avec certitude lorsqu'un, et en général plusieurs, peptides protéotypiques seront caractérisés.[147,148,149]

A la suite de Stocklin, Oda et al. de l'équipe de Chait ont développé le concept avec un marquage uniforme de levures avec ^{15}N : un groupe de levure était élevé avec l'isotope naturel de l'azote (^{14}N à 99,6%) tandis que le second a crû dans un environnement enrichi en ^{15}N (>96 %). Des souches de levures mutantes ont été utilisées ; elles exprimaient ou présentaient un défaut dans une protéine, la cycline G1 qui est impliquée dans la transition entre les phases G1 et S qui, respectivement, correspondent à une phase de croissance cellulaire et une phase de réplication de l'ADN.[150] Grâce à cette technique de marquage, la comparaison des souches de levures a révélée des altérations dans le niveau d'expression de la protéine et également des différences de phosphorylation sur d'importantes protéines signal pour la vie cellulaire. Le fractionnement du gel n'aurait pas altéré les rapports entre protéines marquées et non marquées selon les auteurs étant donné que les protéines marquées par ^{15}N étaient mélangées aux protéines non marquées avant traitement des échantillons ;[151] un grand avantage de cette technique étant alors le contrôle obtenu par l'ajout de protéines marquées au début des étapes de préparation des échantillons.

Quelques années après la publication des travaux de Barr et al., l'équipe d'Aebersold a également eu recours à des stratégies de marquage isotopique pour quantifier des protéines exprimées dans des levures, mais de manière différente par quantification relative.[152] Ainsi, Gygi et al. ont utilisés un marquage par affinité (ICAT pour « Isotope-Coded Affinity Tag ») pour marquer sélectivement des groupements thiols de protéines contenant des cystéines avec des réactifs deutérés ($^2H_8$) ou non. Le marquage de deux groupes de levures avec la technique ICAT a permis d'effectuer une quantification relative de protéines sur ces deux populations et ainsi de déterminer une différence d'expression protéique. En revanche, une limite de la technique et qui fait également sa spécificité étant le marquage des cystéines, seuls les peptides contenant les cystéines ont pu servir à l'analyse.

[146] J. J. Coon, *Anal. Chem.* **2009**, *81*, 3208–3215
[147] R. Aebersold, M. Mann, *Nature* **2003**, *422*, 198–207
[148] N. L. Anderson, N. G. Anderson, T. W. Pearson, C. H. Borchers, A. G. Paulovich, S. D. Patterson, M. Gillette, R. Aebersold, S. A. Carr, *Mol. Cell. Proteomics* **2009**, *8*, 883–886
[149] P. Mallick, M. Schirle, S. S. Chen, M. R. Flory, H. Lee, D. Martin, J. Ranish, B. Raught, R. Schmitt, T. Werner, B. Kuster, R. Aebersold, *Nat. Biotechnol.* **2007**, *25*, 125–131
[150] J. Bartek, J. Lukas, *FEBS Lett.* **2001**, *490*, 117–122
[151] Y. Oda, K. Huang, F. R. Cross, D. Cowburn, B. T. Chait, *Proc. Natl. Acad. Sci.* **1999**, *96*, 6591–6596
[152] S. P. Gygi, B. Rist, S. A. Gerber, F. Turecek, M. H. Gelb, R. Aebersold, *Nat. Biotechnol.* **1999**, *17*, 994–999

En résumé, ces deux dernières publications (Oda et al. ; Gygi et al.) sont emblématiques des travaux de quantification de peptides et protéines par SID qui ont été développés par la suite et qui font appel à un marquage métabolique ou bien chimique en se servant du signal MS ou MS^2.

I.B. Les deux voies de quantification : MS^1 et MS^2

La quantification peut s'effectuer en mode MS par comparaison du signal extrait pour chaque ion (hauteur de pic ou aire sous le pic) des formes natives ou marquées par un isotope d'un peptide protéotypique donné à la suite d'expériences de type SIM/SIR (pour « Single Ion Monitoring / Single Ion Recording », voir Figure 34 ci-dessous). Des analyses répétées ainsi que l'utilisation de plusieurs paires de peptides protéotypiques sont requises afin d'assurer une quantification fiable d'une protéine donnée. En mode tandem (MS/MS), une comparaison des signaux des ions fragments à partir des peptides natifs et marqués peut aussi être effectuée pour la quantification.[153]

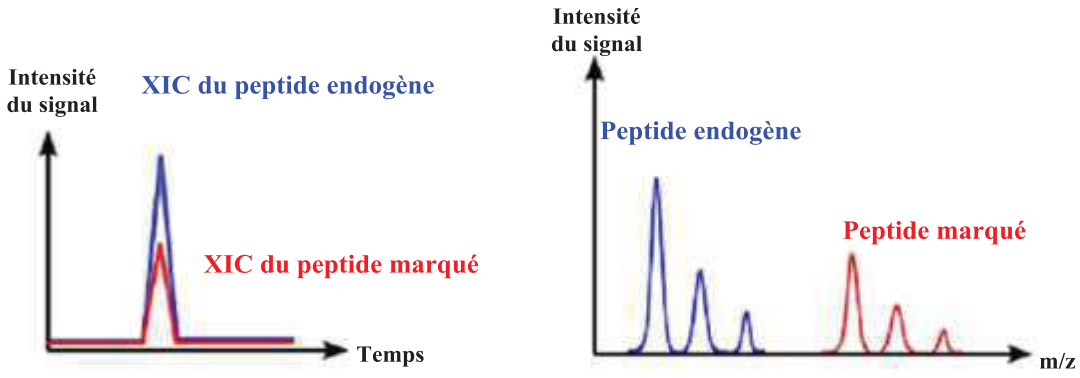


Figure 34 : Elution chromatographique (à gauche) avec les courants d'ions extraits en bleu et rouge respectivement d'un peptide natif et de son analogue marqué par un isotope et analyse MS de la fraction de coélution (à droite) discriminant les deux peptides

Dans ces expériences de quantification, l'analyse d'un seul composé à la fois peut entraîner des durées conséquentes pour l'acquisition des données. Ainsi, le multiplexage a permis de grandement réduire les temps d'analyse en permettant l'acquisition de données simultanément pour plusieurs expériences. Cela correspond à l'analyse simultanée, en l'occurrence, de couples peptide natif/peptide marqué.[154] A l'inverse des méthodes de détection et de quantification basées sur l'utilisation d'anticorps qui nécessitent une production hautement spécifique ainsi qu'une lente optimisation pour chaque espèce biologique ciblée, l'analyse par spectrométrie de masse offre cet avantage du multiplexage. Dans ce cas des méthodes génériques développées pour une cible chimique donnée peuvent être appliquées à un grand nombre de cibles biologiques comme des méthodes ciblant des cystéines ou des lysines largement représentées au sein des peptides. La

[153] G. Zhang, *Mol. Cell. Proteomics* **2005**, *5*, 401–411
[154] J. Stahl-Zeng, V. Lange, R. Ossola, K. Eckhardt, W. Krek, R. Aebersold, B. Domon, *Mol. Cell. Proteomics* **2007**, *6*, 1809–1817

sensibilité et la gamme dynamique d'une telle expérience de quantification basée sur le principe de la SID dépendra fortement de la méthode de quantification (MS ou MS/MS) associée à la complexité de l'échantillon.

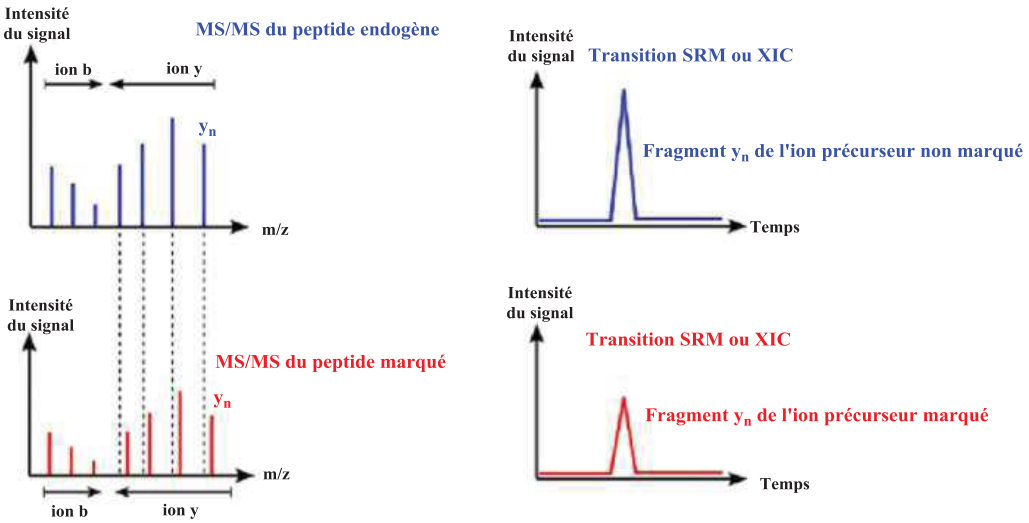


Figure 35 : Quantification par LC-SRM sur triple quadripôle d'un peptide marqué en C-terminal. Les transitions les plus caractéristiques et intenses sont déterminées pour un peptide protéotypique donné, dans un premier temps. Les versions natives et marquées par un isotope du peptide ayant une formule brute identique, aux isotopes près, on observe le déplacement de certains fragments dû au marquage isotopique. La quantification est effectuée en suivant la transition déterminée pour chacun des peptides (endogène/marqué) et en comparant les signaux des courants ioniques extraits (XIC pour « eXtracted Ionic Current ») liés aux transitions correspondantes

Enfin, les expériences SRM (pour « Selected Reaction Monitoring ») qui exploitent toutes les capacités du triple quadripôle en ce qui concerne la sélectivité pour des couples ions parents/fragments sont particulièrement adaptées pour la quantification. Ces expériences consistent en un suivi de signaux spécifiques de certaines transitions spécifiques, c'est-à-dire de paires ion précurseur/fragment particulières à une séquence donnée (voir Figure 35 ci-dessus) ; ceci permettant d'atteindre un excellent rapport signal/bruit, une sensibilité accrue et une gamme dynamique élargie.[155]

	Avantage	Inconvénient
MS	Obtention rapide des résultats Comparaison d'intensités relatives	Nombre plus ou moins important d'isotopes lourds à incorporer pour éviter les problèmes de recouvrement de massifs isotopiques Dilution du signal avec les composés multichargés
MS/MS	Accès à la séquence peptidique Vérification de la séquence analysée Davantage de points de comparaisons possibles (fragments)	Temps d'analyse accru pour l'acquisition des spectres de fragmentation

Tableau 9 : Avantages et inconvénients de la quantification en mode MS et MS/MS

[155] V. Lange, P. Picotti, B. Domon, R. Aebersold, *Mol. Syst. Biol.* **2008**, *4*, 222

I.C. La validation des méthodologies

Dans ces deux paragraphes, nous allons d'une part aborder la validation des méthodologies analytiques et de quantification, par extension, d'autre part la validation du point de l'application en recherche clinique, objectif final de ces travaux de développement.

I.C.1. Première étape : l'aspect analytique

L'étape de validation d'une méthode analytique est un passage obligé et crucial pour tout développement méthodologique. En effet cela permet d'attester de la qualité, de la versatilité, de la robustesse de la méthodologie étudiée et de sa capacité à être popularisée. Dans cette optique-là il existe des guides et des méthodes établies à suivre pour la validation d'une méthodologie analytique et un certain contrôle qualité.

Une méthode globale de validation a été publiée et proposée par Gonzales et Herrador en 2007.[156] Celle-ci se décompose en quatre points essentiels :

1. L'applicabilité, l'adéquation à l'objectif fixé et les limites d'acceptabilité.
2. La spécificité et la sélectivité.
3. L'étude pour l'étalonnage qui inclue la concordance du modèle mathématique avec l'étalonnage, la gamme dynamique de concentration et la description des effets de matrice.
4. L'étude de justesse incluant l'exactitude, la précision et la robustesse des mesures ainsi que leur incertitude et le profil de leur justesse, c'est-à-dire le comportement des mesures en fonction de la concentration étudiée.

Cette méthode est une approche holistique (voir Figure 36 ci-dessous), c'est-à-dire considérant le phénomène de façon globale, pour valider des méthodes analytiques qui prend en compte la mesure des incertitudes et les profils de justesse. Le premier point à soulever est le champ d'investigation d'une méthode analytique en prenant en compte la possibilité de l'appliquer pour en dessiner les limites, la concordance avec le but recherché et les limites d'acceptabilité imposées. Ce dernier point est extrêmement important puisque le concept de limite d'acceptabilité permet d'introduire et d'estimer les β-ETI (pour « β-Expected Tolerance Interval ») et les profils de justesse.

Les questions de spécificité et de sélectivité ont tout autant leur place dans les problématiques de validation étant donné que les méthodes analytiques de routine sont sélectionnées sur la base de cet aspect. L'étape d'étalonnage peut être considérée à part en raison de son importance centrale dans la validation de méthodes. A ce moment de la validation, il faut également considérer l'adéquation entre le modèle mathématique d'étalonnage et les mesures expérimentales, la linéarité des mesures ainsi que la gamme sur laquelle s'étend cette linéarité, la

[156] A. Gustavo González, M. Ángeles Herrador, *TrAC Trends Anal. Chem.* **2007**, *26*, 227–238

limite de détection et la limite de quantification. En outre, les effets de matrice sont à prendre en compte tant ils peuvent être à l'origine de biais. L'étape d'étalonnage est particulièrement adaptée à la prise en compte de ces effets dans le but de corriger la fonction d'étalonnage de façon appropriée pour une application directe en routine, au cours de laquelle les mêmes effets de matrice seront ressentis. L'étude de justesse fait aussi partie des éléments essentiels d'une validation en ce sens qu'elle représente une perspective holistique qui recouvre à la fois l'étude de la précision, de robustesse, d'estimation des incertitudes, des β-ETI et des profils de justesse.

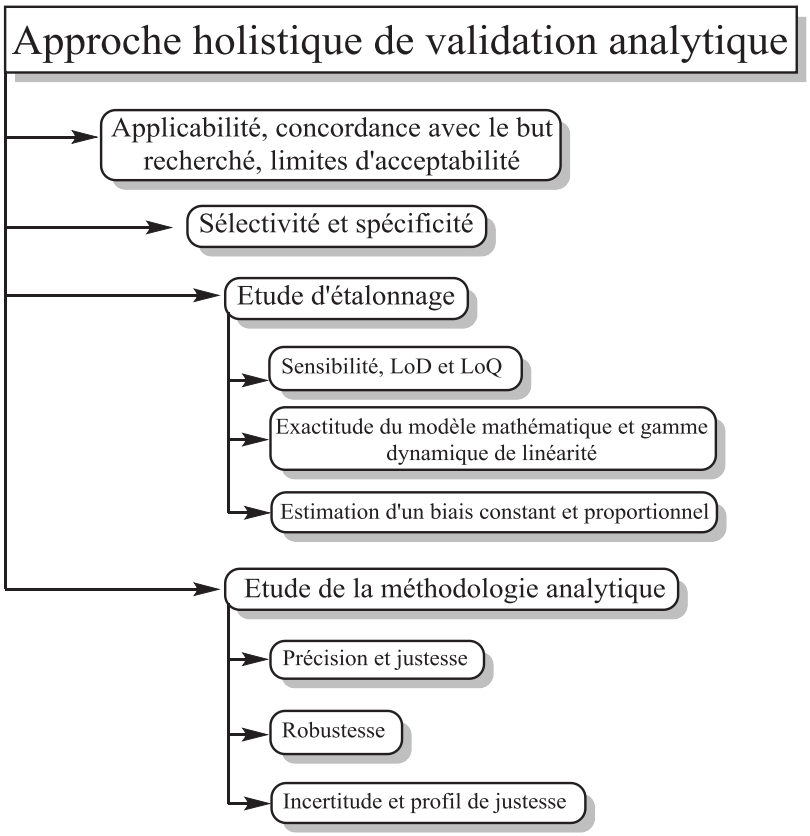


Figure 36 : Représentation des grandes étapes à suivre pour une approche holistique en vue de la validation d'une méthodologie analytique

La FDA a mis en place des tests pour valider les méthodes analytiques qui peuvent ensuite être appliqués à des contrôles qualité ou des analyses cliniques par exemple dans le cadre de quantification de protéines. Certains d'entre eux, typiquement, se servent de spectromètres de masse, dans le cas de suivi de drogues et de métabolites en clinique. En revanche, très peu d'instruments de spectrométrie de masse répandus ont été approuvés par la FDA pour un usage en laboratoire clinique.[157] En effet, les instruments n'étaient pas conçus selon les bonnes pratiques de fabrication et n'étaient donc pas en accord avec le système de contrôle qualité de la FDA requis pour

[157] PART 820 QUALITY SYSTEM REGULATION in TITLE 21--FOOD AND DRUGS CHAPTER I--FOOD AND DRUG ADMINISTRATION DEPARTMENT OF HEALTH AND HUMAN SERVICES SUBCHAPTER H--MEDICAL DEVICES in DA. CFR - Code of Federal Regulations. Title 21—Food and drugs. Vol. 8., https://www.accessdata.fda.gov/scripts/cdrh/cfdocs/cfCFR/CFRSearch.cfm?CFRPart=820

les diagnostics en clinique. Heureusement c'est un point qui ne sera plus un obstacle maintenant que les constructeurs développent désormais des instruments en suivant un cahier des charges en accord avec les pré requis de la FDA.

Au sein des méthodologies de quantification en revanche, il faut reconnaître que l'ajout d'une étape de digestion enzymatique augmente la complexité en comparaison des tests immunologiques. C'est la raison pour laquelle un niveau supplémentaire de standardisation du processus est crucial tout autant qu'un processus de contrôle qualité pour assurer la maîtrise totale du procédé. En conséquence de quoi, le développement d'approches visant à comprendre et maîtriser les variations de l'étape en question sera de plus en plus nécessaire.

Un aspect particulier à prendre en compte pour les expérimentations sur peptides et protéines par spectrométrie de masse est leur capacité à surmonter quelques limitations caractéristiques des tests immunologiques tout en apportant leur lot de questions. A titre d'exemple, la possibilité en spectrométrie de masse en tandem d'atteindre un très haut niveau de spécificité structurale en analyse de peptides et donc la possibilité de reconnaître et rejeter certaines interférences pendant l'analyse elle-même. Cette capacité est un réel avantage car elle permet d'éliminer la nécessité d'évaluer composé par composé les potentiels éléments pouvant créer des interférences, point extrêmement complexe à mettre en place dans le cadre de criblages à haut débit typiquement. Etant donné que l'élimination de telles interférences est cruciale, les études qui vont démontrer l'absence d'interférences pour une méthode particulière sont d'un intérêt de premier ordre. Cela mérite toutefois d'être nuancé du fait de la perte d'information à propos d'une protéine lorsque celle-ci fait l'objet d'une digestion enzymatique comme sa conformation, son repliement dans l'espace qui sont autant de caractéristiques perdues lors d'analyses en MS^2 par des stratégies « bottom-up » ou encore « middle-down ».

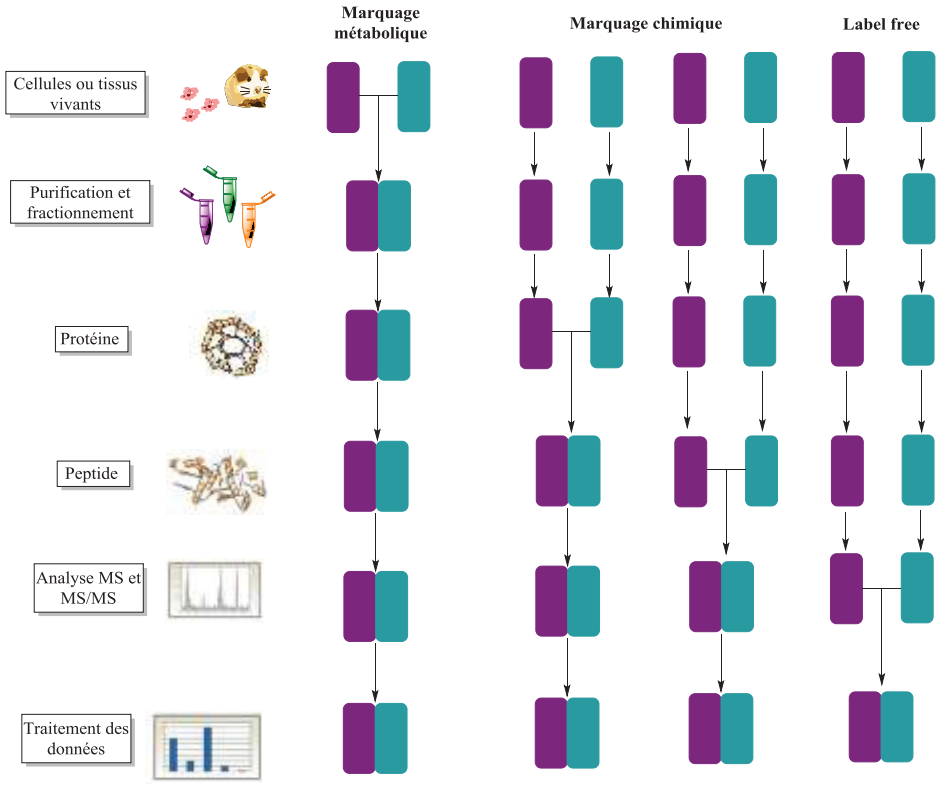


Figure 37 : Protocoles usuels en spectrométrie de masse quantitative. Les rectangles pourpres et turquoises représentent deux conditions expérimentales (échantillon contrôle, échantillon perturbé). Les lignes horizontales représentent l'étape de rassemblement des échantillons

Le potentiel de la spectrométrie de masse pour détecter spécifiquement des structures de peptide a été la clé pour développer des étalons internes pour la quantification. Les différentes méthodes de marquage ainsi que l'étape lors de laquelle ce dernier est introduit permettent de les contrôler toutes séparément et d'améliorer la fiabilité de ces dernières (voir Figure 37 ci-dessus). Bien que l'idée dépasse le cadre direct de contrôle de la FDA notamment, des bénéfices pourraient être obtenus à partir d'une méthodologie commune et potentiellement une instrumentation commune, comme le coût et la reproductibilité et qui pourrait être utilisée pour, simultanément, la recherche de biomarqueurs et les diagnostics en laboratoire. Dans cette optique, les analyses par spectrométrie de masse en laboratoire qui utilisent des étalons internes (marqués aux isotopes stables notamment) sont de plus en plus mises à l'épreuve dans l'estimation de leur robustesse inter laboratoire et de leur transposabilité.

Un point important à retenir de ce procédé est bien le fait que n'importe quelle soumission à la FDA doit être portée par une très forte base scientifique et analytique (voir Figure 38 ci-dessus). La conception pour les études cliniques doit également être en parfaite adéquation avec l'application prévue en clinique car le contrôle des procédures par la FDA se fait aussi sur l'utilisation déclarée d'une méthodologie donnée qui doit être parfaitement compréhensible et définie. Cela permet à la FDA de définir les risques potentiels et de déterminer les étapes nécessaires à une mise sur le marché. Le contrôle se fait aussi sur les résultats des performances des études analytiques et

cliniques qui doivent être conçues pour démontrer la sécurité et l'efficacité d'un nouveau test. C'est la raison pour laquelle il est important, même dans les toutes premières phases de développement de méthodes analytiques de se renseigner à propos des pré requis en termes de qualité et de validation auprès des autorités compétentes dans le but d'optimiser le développement en prévision de cette étape de validation.

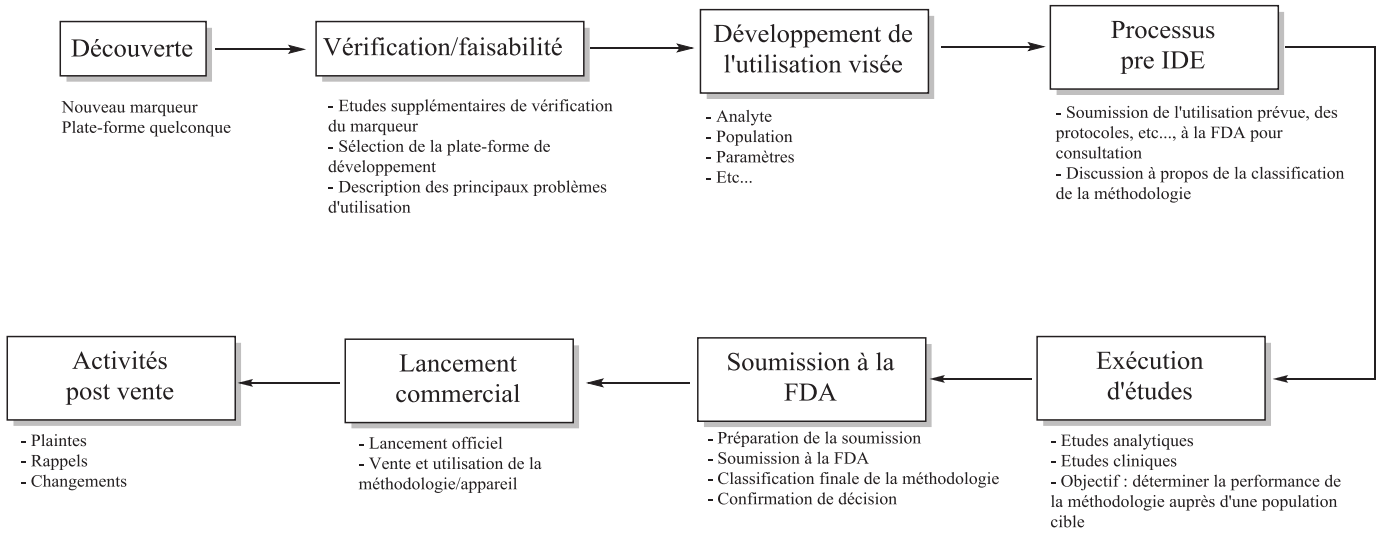


Figure 38 : Description schématique du processus qui amène de la découverte d'un biomarqueur à un test de diagnostic approuvé par la FDA. Les études de qualité peuvent démarrer dès le passage de la première étape (suite à la découverte)

Enfin, au-delà de l'utilisation déclarée de la méthodologie en développement, le type d'études pré clinique demandées pour l'évaluation de la performance méthodologique dépendra de la technologie mise en œuvre et donc du type de résultat recherché (quantitatif, qualitatif ou semi quantitatif). A titre d'exemple, un test de diagnostic requérant des résultats quantitatifs nécessitera une étude de linéarité tandis qu'un test qualitatif avec deux résultats possibles (i.e : positif ou négatif) ne la nécessitera pas.

La conception d'un grand nombre d'études analytiques, comme l'étude de la précision, dépend fortement de l'identification des sources principales de variation et de la capacité de la méthodologie analytique à les minimiser et les rendre reproductibles par une étude multi variables (différents jours d'analyse, lots de réactifs, appareils, lieux d'analyse, manipulateur …). Cette problématique doit, là aussi, refléter ce qui sera la zone d'activité de la méthodologie pour pouvoir être validée par la FDA par exemple.

Au final, la validation d'une méthodologie analytique doit obligatoirement passer par :

- Une sélectivité (pour l'analyte recherché).
- L'évaluation des effets de matrice éventuels pour qu'ils puissent être identifiés et pris en compte.
- La sélection d'un modèle mathématique de courbe d'étalonnage.

- Une conception expérimentale cohérente : nombre de séries × nombre de réplicats × nombre de composés étalons.
- L'évaluation de la linéarité de la méthodologie.
- L'évaluation de l'exactitude des mesures via le calcul des biais relatifs.
- La mesure de la précision des mesures à travers les coefficients de variation.
- La détermination de profils de justesse qui permettent de savoir si la méthode est cohérente avec le but fixé.
- Le tracé de profils d'incertitude qui permet de prédire le comportement des mesures en fonction des points de prise de mesure.
- L'application à des échantillons issus d'études cliniques avant de pouvoir passer à l'évaluation clinique de la méthodologie.

I.C.2. Seconde étape : le point de vue clinique

Des méthodes de validation en clinique existent aussi avec des procédures en huit étapes dans le but de pouvoir répondre face à des audits systématiques d'essais cliniques. Cette procédure a été mise au point à partir de recommandations et de principes qui proviennent du CCH (pour « Cochrane Collaboration Handbook ») et du GRADE (pour « Grading of Recommandations Assessment, Development, and Evaluation »).[158,159,160,161,162] Voici un aperçu des différentes étapes proposées.

La première étape consiste en une méta-analyse, autrement dit l'étude de l'intervalle de confiance à 95 % et la « P-value ». Dans une méta-analyse des grandeurs statistiques sont calculées pour chaque essai, ce qui permet de décrire l'effet d'intervention qui n'est autre que le simple fait d'exécuter une expérimentation. Cette dernière correspond à la probabilité d'obtenir la différence observée, lors de plusieurs essais, voire une plus grande différence provenant de l'effet d'intervention ; ceci en partant du principe que l'hypothèse nulle est vraie, c'est-à-dire qu'il n'y a pas de différence significative entre deux expérimentations comparées.[163] Tandis que l'intervalle de confiance à 95 % permet de déterminer un intervalle dans lequel 95 % des valeurs sont comprises,

[158] J. P. Higgins, S. Green, *Cochrane Handbook for Systematic Reviews of Interventions*, The Cochrane Collaboration, **2011**. Available from http://handbook.cochrane.org/
[159] T. Agoritsas, G. H. Guyatt, *Can. J. Neurol. Sci.* **2013**, *40*, 448–449
[160] G. Guyatt, A. D. Oxman, E. A. Akl, R. Kunz, G. Vist, J. Brozek, S. Norris, Y. Falck-Ytter, P. Glasziou, H. deBeer, *J. Clin. Epidemiol.* **2011**, *64*, 383–394
[161] G. Guyatt, A. D. Oxman, S. Sultan, J. Brozek, P. Glasziou, P. Alonso-Coello, D. Atkins, R. Kunz, V. Montori, R. Jaeschke, D. Rind, P. Dahm, E. A. Akl, J. Meerpohl, G. Vist, E. Berliner, S. Norris, Y. Falck-Ytter, H. J. Schünemann,, *J. Clin. Epidemiol.* **2013**, *66*, 151–157
[162] G. H. Guyatt, K. Thorlund, A. D. Oxman, S. D. Walter, D. Patrick, T. A. Furukawa, B. C. Johnston, P. Karanicolas, E. A. Akl, G. Vist, R. Kunz, J. Brozek, L. L. Kupper, S. L. Martin, J. J. Meerpohl, P. Alonso-Coello, R. Christensen, H. J. Schunemann, *J. Clin. Epidemiol.* **2013**, *66*, 173–183
[163] J. Jakobsen, J. Wetterslev, P. Winkel, T. Lange, C. Gluud, *BMC Medical Research Methodology* **2014**, *14*, 120

compte-tenu des seuils choisis pour la méthodologie testée, donnant ainsi une idée de l'incertitude. Il existe deux types de méta-analyse : la méta-analyse à effets fixes et la méta-analyse à effets aléatoires. Dans le premier cas, cela signifie que l'effet d'intervention est identique pour tous les essais pris en compte. Ce qui revient à dire que les différences observées entre plusieurs essais sont dues à des erreurs aléatoires. Dans le cas de la méta-analyse à effets aléatoires, le postulat de base affirme que les essais exécutés estiment des effets d'interventions différents, ce qui revient à dire que les estimations des effets d'intervention pour chaque essai pris individuellement peuvent être représentés par une distribution normale (au sens mathématique du terme) ou logarithmique/normale. Cependant, pour un plan d'expériences donné, une intervention pourra avoir différents effets sur chaque essai individuellement considéré qui dépendront de la forme que prendra cette intervention (variation de pression, de température, de débit etc…), de la mesure de sortie, des manipulateurs etc… Dans ce cadre-là, le modèle à effets aléatoires est plus adéquat. En revanche, lorsqu'il n'y a pas d'hétérogénéité statistique, qui correspond à une variance inter essais proche de zéro, le model à effets fixes sera plus réaliste pour le traitement ultérieur des données.

La deuxième étape concerne l'investigation statistique de la méthodologie étudiée et l'hétérogénéité statistique qui se fait grâce aux diagrammes de Forest (voir Figure 39 p.75) qui permettent de comparer les résultats issus de différentes études abordant la même problématique en effectuant une méta-analyse des données médicales (on parle alors d'hétérogénéité clinique) ; sachant que l'hétérogénéité statistique augmentera à mesure que davantage d'essais à échantillons de grande taille seront intégrés. En somme, des variations dans les effets d'intervention minimes et cliniquement sans intérêt (dans le cadre du développement de méthodologies appliquées au domaine clinique) vont accroître l'hétérogénéité statistique. Dans les diagrammes de Forest, les différentes études cliniques portant sur un sujet particulier sont regroupées et présentées avec les groupes traités et contrôle, le risque relatif (RR) qui représente le risque de survenue d'un évènement dans un groupe par rapport à un autre. La donnée la plus importante est la méta-analyse globale des différentes études qui va démontrer un effet en faveur du groupe contrôle ou du groupe traité. Souvent cette donnée est représentée par un losange qui, s'il recoupe l'une de ses deux extrémités la ligne verticale de non-effet, signifie qu'aucune différence n'existe entre le traitement méta-analysé et l'absence d'effet compte-tenu de l'intervalle de confiance fixé (95 % dans le cas de la Figure 39).

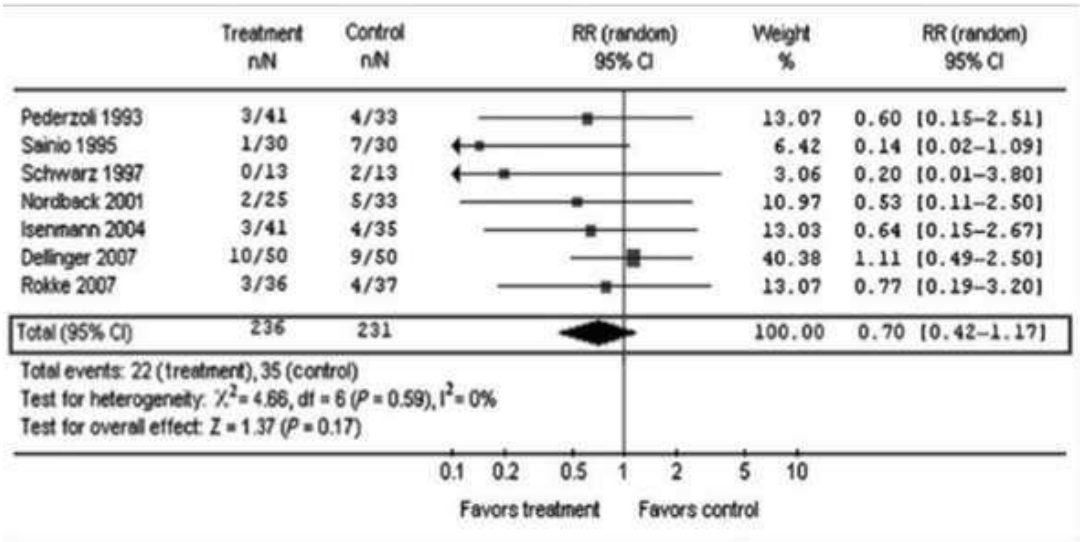


Figure 39 : Exemple de diagramme de Forest à propos de l'étude des effets de la prophylaxie antibiotique sur la mortalité. « RR » correspond au risque relatif, n correspond aux sujets d'études sans effet et N au nombre total de sujets d'étude

La troisième étape concerne la résolution des problèmes de multiplicité due aux différents résultats possibles (moyenne, erreur sur la moyenne, coefficient de variation, écart-type etc…) parmi lesquels une partie sera mise en avant au détriment des autres, ce qui tend à augmenter le risque de présentation biaisée. Pour éviter cela, il est recommandé de décrire la méthodologie statistique en détails en incluant les différentes vagues de résultats ainsi que les résultats exploratoires.

La quatrième étape concerne l'analyse séquentielle d'essais. Lors de cette étape, le point crucial est la taille de l'échantillon, ou quantité d'essais prévus. En effet, pour qu'une méta-analyse statistique puisse fournir des résultats significatifs, l'intervalle de confiance, l'estimation de l'effet d'intervention et la « P-value » doivent être associée à une quantité d'essais suffisante. Dans le cas où celle-ci n'est pas suffisamment conséquente, la méta-analyse ne comportera pas assez d'informations pour accepter ou rejeter l'hypothèse nulle. L'hypothèse nulle est la position par défaut, le point de vue de base par opposition à une hypothèse qui doit être démontrée pour, *in fine*, accepter ou rejeter l'hypothèse nulle. Cependant, la significativité à elle seule ne suffit pas et doit être associée à un intervalle de confiance, une estimation de l'effet d'intervention et une taille d'échantillon.

La cinquième étape est dédiée au facteur de Bayes. Ce facteur permet de statuer sur le fait qu'une différence significative entre deux lots de résultats est bien réelle plutôt qu'anticipée ; autrement dit, cela permet de vérifier si des résultats obtenus par une étude ont été anticipés et que cette anticipation se ressent dans les valeurs obtenues ou bien qu'ils exempt de toute intervention de la part du manipulateur. En règle générale, un facteur de Bayes inférieur à 0,1 peut être utilisé comme seuil pour attester d'une différence significative entre deux essais pour peu que le nombre de mesures soit approprié.

La sixième étape concerne l'impact potentiel sur les résultats des erreurs systématiques, ou biais, ainsi que l'incertitude causée par le manque de données exploitables. Ce contrôle des erreurs systématiques se fait par des analyses de sous-groupe pour caractériser le biais en question. Il a été montré de manière empirique que des essais à haut risque de biais avaient tendance à surestimer les bénéfices et à sous-estimer les nuisances.[164,165] Quant à l'incertitude liée au manque de données exploitables, elle se mesure en concevant deux scénarii : le premier conçoit l'hypothèse que, dans le cas d'une étude de l'effet d'un candidat médicament, toutes les personnes du groupe contrôle ont subi l'effet délétère de la maladie étudiée et toutes les personnes du groupe soigné ont eu une issue positive (guérison, rémission complète etc...) ; le second scénario consiste en l'hypothèse inverse, c'est-à-dire des effets délétères dans le groupe soigné et une issue bénéfique pour le groupe contrôle.

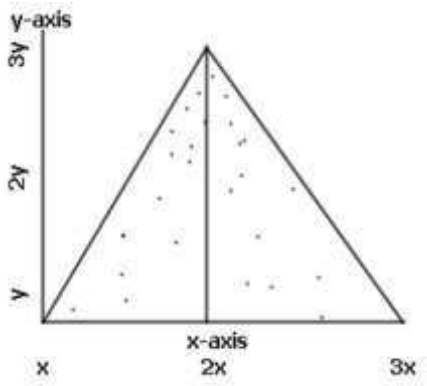


Figure 40 : Exemple de diagramme de Funnel qui montre l'absence de biais de publication. Chaque point représente une étude, c'est-à-dire la mesure de l'effet d'un candidat médicament par exemple, l'axe des y représente la taille de l'étude (le nombre de sujets d'étude) tandis que l'axe des x montre les résultats de l'étude (la mesure de l'effet moyen du candidat médicament)

La septième étape concerne la publication de biais. Ceux-ci sont contrôlés grâce un diagramme de Funnel (voir Figure 40 p.76) qui permet de vérifier l'existence de biais dans la publication des résultats. En effet, il est possible que certains résultats parmi plusieurs essais ne soient pas publiés pour diverses raisons ce qui, *in fine*, créé un biais dans l'ensemble des résultats publié et dans les conclusions à tirer. Ce type de diagramme est intéressant uniquement pour estimer le risque de biais.

Enfin, la huitième étape se focalise sur la significativité clinique des résultats. Elle vient après les sept précédentes qui permettent d'obtenir les informations nécessaires à l'estimation de la significativité statistique des différents essais (taille des essais suffisante, intervalle de confiance, vérification d'hypothèseetc…). Une fois cela effectué, il est alors possible d'interpréter les données sur le plan clinique. A titre d'exemple, une fois une méthode de quantification de biomarqueurs de

[164] K. F. Schulz, *JAMA* **1995**, *273*, 408
[165] D. Moher, D. J. Cook, S. Eastwood, I. Olkin, D. Rennie, D. F. Stroup, *The Lancet* **1999**, *354*, 1896–1900

la maladie d'Alzheimer validée sur le plan statistique, les résultats concernant un patient particulier pourront être jugés sur le plan clinique : possède-t-il les biomarqueurs de la maladie ? En quelle quantité par rapport aux seuils de déclaration de la maladie ? Montre-t-il des symptômes cliniques de la maladie ? A quel stade de l'évolution de celle-ci se trouve-t-il ? Quel est le meilleur traitement à administrer dans ce cas ?

II. Introduction à la quantification de peptides par dilution isotopique en spectrométrie de masse

Dans ce paragraphe nous allons nous intéresser à ce qui fait tout l'intérêt de la spectrométrie de masse appliqué à la mesure quantitative de biomolécules ainsi qu'au principe de la dilution isotopique.

II.A. Le principe de la dilution isotopique pour la quantification de peptides et protéines

Le concept de dilution isotopique est reconnu depuis des décennies comme approche de référence pour la quantification de petites molécules par spectrométrie de masse. Il a également été appliqué à la quantification absolue de protéines dans des échantillons biologiques malgré les difficultés liées à ces molécules comme les multiples états de charge de celles-ci.[166] Ces méthodologies reposent sur l'addition de quantités connues d'étalons marqués par un ou plusieurs isotopes stables qui montrent des comportements chromatographiques identiques aux composés natifs (à l'exception des étalons deutérés) mais discriminables grâce à leur incrément de masse. Un étalon marqué par un isotope stable est un composé de structure identique à la molécule à mesurer dans lequel un ou plusieurs atomes ou plus ont été remplacés par du ^{13}C, du ^{15}N, une combinaison de ces deux derniers ou du ^{2}H. Plus la masse de la molécule à marquer est importante et plus le massif isotopique sera étendu, ce qui signifie augmenter le nombre d'isotopes lourds à incorporer pour obtenir un déplacement du massif isotopique suffisamment important pour ne pas risquer de recouvrements (voir Figure 41 p.78). Ils sont communément utilisés en chimie analytique pour les mesures de ces petites molécules comme certaines drogues ou encore les hormones.[167,168] Ces méthodes de dilution isotopique sont la plupart du temps ciblées, c'est-à-dire concentrées sur un ensemble restreint de peptides et de protéines. Néanmoins, des projets ambitieux cherchent à construire d'importantes banques de données d'étalons internes, ce qui pourrait bien augmenter le nombre d'analytes quantifiables.[169,170,171]

[166] S. M. Schermann, D. A. Simmons, L. Konermann, *Expert Rev. Proteomics* **2005**, *2*, 475–485
[167] M. Huerta-Fontela, M. T. Galceran, F. Ventura, *Anal. Chem.* **2007**, *79*, 3821–3829
[168] S. S.-C. Tai, M. J. Welch, *Anal. Chem.* **2004**, *76*, 1008–1014
[169] R. J. Beynon, M. K. Doherty, J. M. Pratt, S. J. Gaskell, *Nat. Methods* **2005**, *2*, 587–589
[170] V. Brun, A. Dupuis, A. Adrait, M. Marcellin, D. Thomas, M. Court, F. Vandenesch, J. Garin, *Mol. Cell. Proteomics* **2007**, *6*, 2139–2149

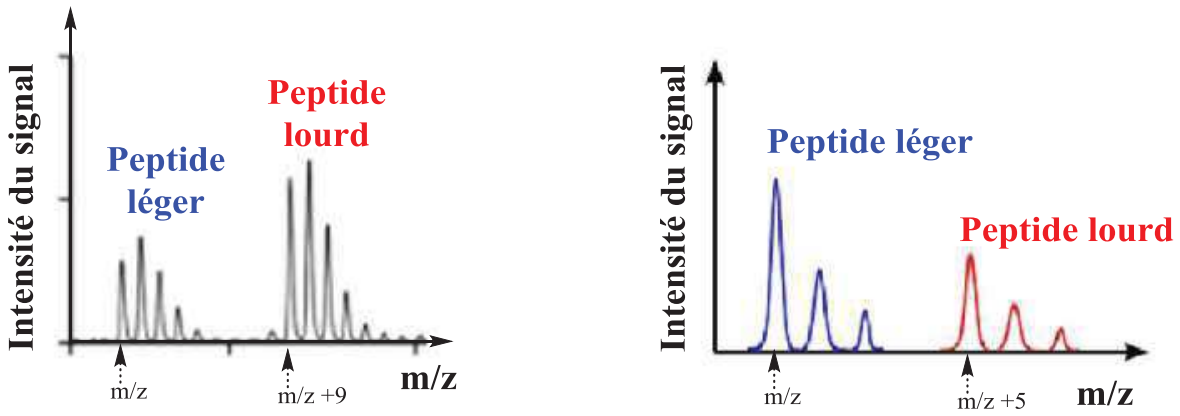


Figure 41 : Spectres de masses de deux familles de peptides à forte masse (supérieur à 4 000 Th, à gauche) qui nécessite un nombre important d'isotopes lourds incorporés pour éviter le recouvrement spectral et un seconde famille de peptides de plus faible masse (≈ 1 000 Th ; à droite) qui nécessite un plus faible nombre d'isotopes lourds

Selon les guides de bioanalyse, les procédés analytiques fins requièrent des étalons internes et des contrôles qualité. Ceux-ci sont ajoutés à l'échantillon à doser avant toute étape de manipulation de l'analyte contrairement aux étalons externes qui sont ajoutés juste avant l'analyse prévue. Au regard des analyses par spectrométrie de masse de peptides, la dilution isotopique a été reconnue comme méthode de référence pour l'étalonnage interne. En revanche, les méthodologies de quantification de protéines qui reposent sur le principe de la dilution isotopique n'ont été introduites en protéomique que récemment. En ce qui concerne ces dernières approches, l'échantillon est introduit avec une quantité connue d'analogue de peptide(s) protéolytique(s) marqué(s) par un isotope ou de protéine(s). Les techniques qui se servent de la dilution isotopique sont excellentes pour identifier des peptides ou des fragments parmi un mélange en se servant de l'incrémentation de masse créée par les marqueurs comprenant des isotopes stables. Le protocole général consiste tout d'abord à marquer un peptide ou une protéine avec un réactif qui, pour un premier lot, contiendra les isotopes légers et pour le second lot, les isotopes lourds. Les deux échantillons marqués sont par la suite analysés et quantifiés par spectrométrie de masse quasi exclusivement sur des appareils de type triple quadripôle après mélange et fractionnement dans le cas de mélanges complexes. Les signaux obtenus dans les spectres de masse conduisent à des rapports entre les deux isotopes sus-cités qui sont alors utilisés pour estimer les abondances relatives de peptides ou protéines. Le rapport entre la réponse de l'analyte natif et marqué obtenue par LC-MS/MS ou LC-MS peut, par la suite, être reporté sur une courbe d'étalonnage afin de calculer la quantité relative d'analyte natif dans un échantillon donné.

[171] N. L. Anderson, N. G. Anderson, T. W. Pearson, C. H. Borchers, A. G. Paulovich, S. D. Patterson, M. Gillette, R. Aebersold, S. A. Carr, *Mol. Cell. Proteomics* **2009**, *8*, 883–886.

II.B. La spectrométrie de masse, plate-forme incontournable de caractérisation de biomolécules complexes

La spectrométrie de masse est devenue, en protéomique notamment, un outil incontournable et complémentaire de l'analyse moléculaire et de la biologie cellulaire.[172] Par analyse de protéines, il est question de l'identification des séquences jusqu'à l'analyse de PTM (pour « Post Translational Modifications ») en passant par les interactions protéine-protéine ou encore la quantification relative de cibles protéiques. Typiquement, après avoir identifié une protéine, il est tout à fait intéressant de déterminer la quantité de celle-ci dans un échantillon que ce soit en valeur absolue ou relative pour peu qu'une référence existe et permette une comparaison pertinente. Dans ce cadre, l'objectif que poursuit la protéomique quantitative est la recherche d'évolutions entre des échantillons de contrôle et des conditions expérimentales particulières (défaut d'expression d'une protéine, une mutation entraînant une modification d'une protéine, effet d'un candidat médicament sur l'activité d'une protéine etc…). De tels changements peuvent être liés à des maladies ou des mécanismes pathologiques d'infection et permettre d'identifier des biomarqueurs de ces affections, puis d'en faire des cibles pour le développement de médicaments. La plupart du temps, ces protéines évoluent en termes de quantité entre un état sain d'un organisme et un état malade, voir même disparaissent. D'où le besoin de méthodologies sensibles, spécifiques, précises et justes pour la mesure de ces changements.[173] A cette nécessité s'est très vite ajouté le besoin d'identifier et de quantifier simultanément plusieurs protéines pour la recherche de biomarqueurs par exemple ou encore pour augmenter le nombre d'échantillons pouvant être analysés en une seule fois. Ceci a alors eu pour conséquence d'augmenter le débit d'analyse grâce à ce multiplexage qui a été un des objectifs des différentes techniques développées. A cela, s'ajoute la combinaison des techniques séparatives par chromatographie avec la spectrométrie de masse qui a engendré la possibilité de détecter de façon très spécifique et sensible différentes cibles dans des échantillons biologiques initialement complexes et désormais fractionnés, simplifiés.

Actuellement, la majorité des processus qui ont été utilisés et validés pour la quantification de biomolécules sont basés sur des méthodologies immunologiques. Bien que ces techniques qui nécessitent la production d'anticorps fassent preuve d'une redoutable sensibilité de l'ordre du pg/mL, l'important temps dédié au développement, la variabilité et les problèmes d'inter réactivité ont stimulé l'intérêt porté à des méthodologies proposant une sensibilité équivalente tout en affichant une meilleur sélectivité et un meilleur contrôle. La SID apparaît alors en spectrométrie de masse comme une solution très séduisante au vu des limites associées à la détection basée sur les anticorps malgré le fait que la mesure de peptides et de protéines par SID ne soulève quelques défis.

[172] B. Domon, *Science* **2006**, *312*, 212–217
[173] S.-E. Ong, M. Mann, *Nat. Chem. Biol.* **2005**, *1*, 252–262

Le champ d'investigation tend de plus en plus à atteindre les plus basses limites de quantification caractéristiques de ce qui est proposé dans les expérimentations de liaison de ligands comme les tests ELISA (0,2 – 140 ng/mL).[174,175,176]

Un certain nombre d'avantages caractérisent la SID en spectrométrie de masse comparée aux méthodes immunologiques. La détection de l'analyte est structurellement sans ambiguïté comme l'ont noté Carr et Anderson, ce qui permet une sélectivité absolue.[177] Même lorsque la sélectivité est compromise, par exemple dans une expérience de LC-MS/MS pour laquelle un composé co-éluant avec la molécule d'intérêt est isobare à cette dernière, ce type d'interférence est souvent identifiable. De plus la méthode de séparation et d'analyse en MS peut être très rapidement modifiée pour prendre en compte ce type d'évènement. Un second avantage de la SID en spectrométrie de masse est la capacité à analyser de multiples peptides en une seule expérience de LC-MS/MS (le multiplexage) qui n'est pas possible pour les expérimentations immunologiques. Un nombre conséquent d'expériences SID réalisées en spectrométrie de masse ont montré la possibilité de quantifier plusieurs peptides reliés à de multiples protéines en un seul jet.[178,179] Un tel multiplexage permet d'augmenter de manière significative la vitesse de criblage des expérimentations, point crucial pour amener l'utilisation de la SID-MS jusqu'en en recherche clinique, domaine au sein duquel la diversité des biomarqueurs est déjà une réalité.[180]

Au contraire des expérimentations immunologiques qui reposent sur l'interaction de deux macromolécules, la détection en LC-MS, que ce soit par approche « top-down » ou « bottom-up », est directe et ne dépend que de la nature chimique de l'analyte. Cette caractéristique de la SID-MS implique souvent une excellente linéarité sur plusieurs ordres de grandeur, tandis que les expériences de liaison sont souvent limitées en gamme dynamique avec des réponses démontrant peu fréquemment une bonne linéarité.[181] Or, la capacité à conduire des analyses validées de biomarqueurs est d'une importance critique dans l'optique d'établir la sensibilité et la sélectivité du biomarqueur en question en vue de percevoir une évolution du protéome et d'identifier une maladie particulière par exemple. L'utilisation de la méthodologie de la dilution isotopique combinée à la LC-

[174] T. Oe, B. L. Ackermann, K. Inoue, M. J. Berna, C. O. Garner, V. Gelfanova, R. A. Dean, E. R. Siemers, D. M. Holtzman, M. R. Farlow, I. A. Blair, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **2006**, *20*, 3723–3735
[175] G. R. Nicol, M. Han, J. Kim, C. E. Birse, E. Brand, A. Nguyen, M. Mesri, W. FitzHugh, P. Kaminker, P. A. Moore, S. M. Ruben, T. He, *Mol. Cell. Proteomics* **2008**, *7*, 1974–1982
[176] H. Keshishian, T. Addona, M. Burgess, D. R. Mani, X. Shi, E. Kuhn, M. S. Sabatine, R. E. Gerszten, S. A. Carr, *Mol. Cell. Proteomics* **2009**, *8*, 2339–2349
[177] S. A. Carr, L. Anderson, *Clin. Chem.* **2008**, *54*, 1749–1752
[178] E. Kuhn, T. Addona, H. Keshishian, M. Burgess, D. R. Mani, R. T. Lee, M. S. Sabatine, R. E. Gerszten, S. A. Carr, *Clin. Chem.* **2009**, *55*, 1108–1117
[179] L. Anderson, *Mol. Cell. Proteomics* **2005**, *5*, 573–588
[180] J. W. Lee, M. Hall, *J. Chromatogr. B* **2009**, *877*, 1259–1271
[181] C. T. Viswanathan, S. Bansal, B. Booth, A. J. DeStefano, M. J. Rose, J. Sailstad, V. P. Shah, J. P. Skelly, P. G. Swann, R. Weiner, *Pharm. Res.* **2007**, *24*, 1962–1973

MS/MS fournissant la plus haute spécificité possible pour la quantification, cette méthodologie est maintenant largement utilisée pour la découverte et la validation de biomarqueurs. L'utilité de la SID-MS à tous les niveaux de développement de ces derniers allant de l'identification à l'application clinique en passant par la validation analytique a démontré le rôle central qu'avait cette technique dans la recherche de biomarqueurs.[182,183,184,185] Cependant, ce qui fait la force de la spectrométrie de masse dans l'identification des protéines notamment, de leurs isoformes ou encore de PTM, à savoir la sélectivité et la spécificité de l'analyse, sont aussi son talon d'Achille en perdant des informations structurales caractéristiques de celles-ci comme leur orientation dans l'espace, leur repliement via des interactions intramoléculaires ou encore des PTM sensibles aux digestions enzymatiques. La spectrométrie de masse ne pouvant pas accéder à ces informations, l'utilisation de l'immunoprécipitation et de sa capacité de reconnaissance de forme en association avec les analyses par MS^1 et MS^2 permet de caractériser finement et de manière complémentaire une protéine donnée.

Ainsi, un nombre important de méthodologies de quantification relative en spectrométrie de masse sont dédiées à la comparaison des niveaux d'expression de protéines. Ce type de performance est crucial pour des applications très particulières comme l'évaluation des biomarqueurs candidats en clinique. En outre, la spectrométrie de masse en tandem permet d'accéder à des informations de séquence et à la discrimination d'isoformes grâce à une spécificité de détection sans précédent.[186,187,188] Des méthodologies de quantification par marquage chimique, métabolique ou par des approches label-free ont été développées pour explorer la dynamique de protéomes entiers. Généralement ces méthodologies fournissent une comparaison relative de l'abondance de protéines entre quelques échantillons. En revanche, les méthodologies de quantification absolue qui permettent de mesurer des concentrations de protéines dans des échantillons biologiques, sont la plupart du temps limitées à un petit nombre défini de protéines. En fonction de la méthodologie analytique choisie, les approches par quantification absolue fournissent des estimations précises et justes. Elles sont aussi un bon moyen de déterminer des concentrations de protéines dans des échantillons biologiques pour la comparaison de données entre laboratoires, étape nécessaire à la reconnaissance d'une méthodologie au niveau clinique et à sa validation par les plus hautes autorités de contrôle (FDA pour « Food and Drug Administration », EMA pour « European Medicine Agency »,

[182] D. R. Barnidge, M. K. Goodmanson, G. G. Klee, D. C. Muddiman, *J. Proteome Res.* **2004**, *3*, 644–652
[183] E. Kuhn, J. Wu, J. Karl, H. Liao, W. Zolg, B. Guild, *PROTEOMICS* **2004**, *4*, 1175–1186
[184] N. Rifai, M. A. Gillette, S. A. Carr, *Nat. Biotechnol.* **2006**, *24*, 971–983
[185] V. Kulasingam, E. P. Diamandis, *Nat. Clin. Pract. Oncol.* **2008**, *5*, 588–599
[186] M. Stastna, J. E. Van Eyk, *PROTEOMICS* **2012**, *12*, 2937–2948
[187] L. Bai, E. V. Romanova, J. V. Sweedler, *Analytical Chemistry* **2011**, *83*, 2794–2800
[188] J. Wu, P. Pungaliya, E. Kraynov, B. Bates, *Biomarkers* **2012**, *17*, 125–133

ANSM « Agence Nationale de Sécurité du médicament et des produits de santé » etc…) pour une exploitation généralisée. Cependant, et afin d'atteindre systématiquement cet objectif, une validation de la justesse et de la précision des méthodes de quantification est requise. Ceci dans le but de démontrer que les données estimées sont aussi proches que possible des concentrations réelles des protéines par exemple.[189]

Dans ce domaine de la quantification de biomolécules, la majorité des méthodes de spectrométrie de masse sont dédiées au suivi des ions moléculaires ou de leurs fragments générés par les sources MALDI et ESI, par exemple. Cependant, une méthode alternative basée sur la détection élémentaire par ICP-MS (pour « Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry ») mérite d'être citée. Cette approche exploite les capacités de l'ICP-MS à cibler les hétéroélements comme les métaux, les semi-métaux, ou les non métaux tels que l'iode, le phosphore, le souffre ou le sélénium. L'ICP-MS permet également de quantifier des protéines et des peptides marqués par des hétéroatomes comme les métalloprotéines (e.g : hémoglobine).[190] La quantification absolue peut être accomplie grâce à différents étalons en vue de la dilution isotopique : des hétéroatomes avec des abondances relatives singulières, des peptides ou des protéines marqués par des isotopes d'hétéroéléments.[191,192,193]

II.C. La réduction de la complexité des échantillons issus de fluides biologiques au service de la « shotgun proteomic »

La quantification de certaines protéines, typiquement celles présentes en faible abondance dans des fluides biologiques complexes comme le sérum et le plasma est un enjeu majeur en « shotgun proteomic ». Cette approche se sert des avantages de la combinaison de la chromatographie multidimensionnelle à la spectrométrie en tandem à haute résolution. Sachant que la gamme dynamique d'abondance des protéines peut s'étendre sur 11 ordres de grandeur, il est alors critique d'employer des méthodes de préparation d'échantillons pour, soit enrichir ce dernier en une protéine donnée, soit réduire les interférences créées par des protéines très abondantes par immunoélimination par exemple (« immunodepletion » en anglais).[194,195] Récemment, Keshishian et al. sont parvenus à quantifier des biomarqueurs présents en très faibles quantités relativement aux

[189] S. M. Schermann, D. A. Simmons, L. Konermann, *Expert Rev. Proteomics* **2005**, *2*, 475–485
[190] E. Cordeau, C. Arnaudguilhem, B. Bouyssiere, A. Hagège, J. Martinez, G. Subra, S. Cantel, C. Enjalbal, *PLOS ONE* **2016**, *11*, e0157943
[191] C. N. Ferrarello, J. Ruiz Encinar, G. Centineo, J. I. García Alonso, M. R. Fernández de la Campa, A. Sanz-Medel, *J Anal Spectrom* **2002**, *17*, 1024–1029
[192] M. E. del Castillo Busto, M. Montes-Bayón, A. Sanz-Medel, *Anal. Chem.* **2006**, *78*, 8218–8226
[193] Polatajko A,Encinar J, Schaumloffel D, Szpunar J., *Chem Anal (Warsaw)*, **2005**, *50*, 265–78
[194] D. Immler, S. Greven, P. Reinemer, *PROTEOMICS* **2006**, *6*, 2947–2958
[195] H. Keshishian, T. Addona, M. Burgess, E. Kuhn, S. A. Carr, *Mol. Cell. Proteomics* **2007**, *6*, 2212–2229

autres protéines dans du sérum.[196] Dans cette optique, la technique SCX (pour « Strong Cation eXchange ») a été employée. Celle-ci a déjà été utilisée pour augmenter le recouvrement de séquence en protéomique.[197] Ici, elle a plutôt été employée pour fractionner les différents peptides, réduire le bruit de fond et augmenter le signal grâce à une plus grande quantité d'analyte qui peut être ensuite éluée en LC-MS/MS. Et l'équipe a pu constater une augmentation du rapport S/N de 10 à 40 fois selon les sujets d'étude.

Un second moyen pour réduire la complexité au niveau peptidique est la technique SISCAPA (pour « Stable Isotope Standards and Capture by Anti-Peptide Antibody ») présentée par Anderson et al. en 2004 et exemplifiée par plusieurs études.[198,199,200] Parmi celles-ci, l'étude de Kuhn et al. en 2009 établît la possibilité de multiplexage de SISCAPA par la quantification de peptides protéotypiques de la troponine 1 (cTn1) et de l'interleukine 33 (IL-33), des marqueurs liés à des affections cardiaques. [201] Leur expérimentation a permis d'atteindre des limites de quantification respectivement de 3 ng/mL et de 5 ng/mL, tout en affichant une très bonne corrélation avec les résultats obtenus par des tests commerciaux d'immunologie.

Bien que les étapes de pré fractionnement soit très intéressantes pour séparer les différentes protéines, les analyser une par une et donc diminuer la complexité des échantillons, l'immunoprécipitation en amont de la SID-MS offre toujours une excellente sensibilité.[202] A titre d'exemple, Berna et al. ont mesuré un marqueur de l'insuffisance cardiaque (NTproBNP pour « N-terminal probrain natriuretic peptide »)[203] par immunoprécipitation suivie d'une digestion trypsique. Les résultats des analyses SID-MS après optimisation ont affiché une limite de quantification de 0,1 ng/mL avec un coefficient de variation de moins de 16 %. En revanche, la technique possède également ses limites illustrées notamment par le fait que seuls 63 % de la protéine NTproBNP étaient récoltés après analyses, montrant ainsi que la méthode dans son ensemble était également limitée par la digestion enzymatique et l'efficacité de l'immunoprécipitation.

[196] H. Keshishian, T. Addona, M. Burgess, D. R. Mani, X. Shi, E. Kuhn, M. S. Sabatine, R. E. Gerszten, S. A. Carr, *Mol. Cell. Proteomics* **2009**, *8*, 2339–2349
[197] R. J. C. Slebos, J. W. C. Brock, N. F. Winters, S. R. Stuart, M. A. Martinez, M. Li, M. C. Chambers, L. J. Zimmerman, A. J. Ham, D. L. Tabb, D.C. Liebler, *J. Proteome Res.* **2008**, *7*, 5286–5294
[198] N. L. Anderson, N. G. Anderson, L. R. Haines, D. B. Hardie, R. W. Olafson, T. W. Pearson, *Journal of Proteome Research* **2004**, *3*, 235–244
[199] A. N. Hoofnagle, J. O. Becker, M. H. Wener, J. W. Heinecke, *Clin. Chem.* **2008**, *54*, 1796–1804
[200] G. R. Nicol, M. Han, J. Kim, C. E. Birse, E. Brand, A. Nguyen, M. Mesri, W. FitzHugh, P. Kaminker, P. A. Moore, S.M. Ruben, T. He, *Mol. Cell. Proteomics* **2008**, *7*, 1974–1982
[201] E. Kuhn, T. Addona, H. Keshishian, M. Burgess, D. R. Mani, R. T. Lee, M. S. Sabatine, R. E. Gerszten, S. A. Carr, *Clin. Chem.* **2009**, *55*, 1108–1117
[202] Ackermann BL, Berna MJ., *Expert. Rev. Proteomics.*, **2007**, *4*(2),175–186
[203] M. Berna, L. Ott, S. Engle, D. Watson, P. Solter, B. Ackermann, *Anal. Chem.* **2008**, *80*, 561–566

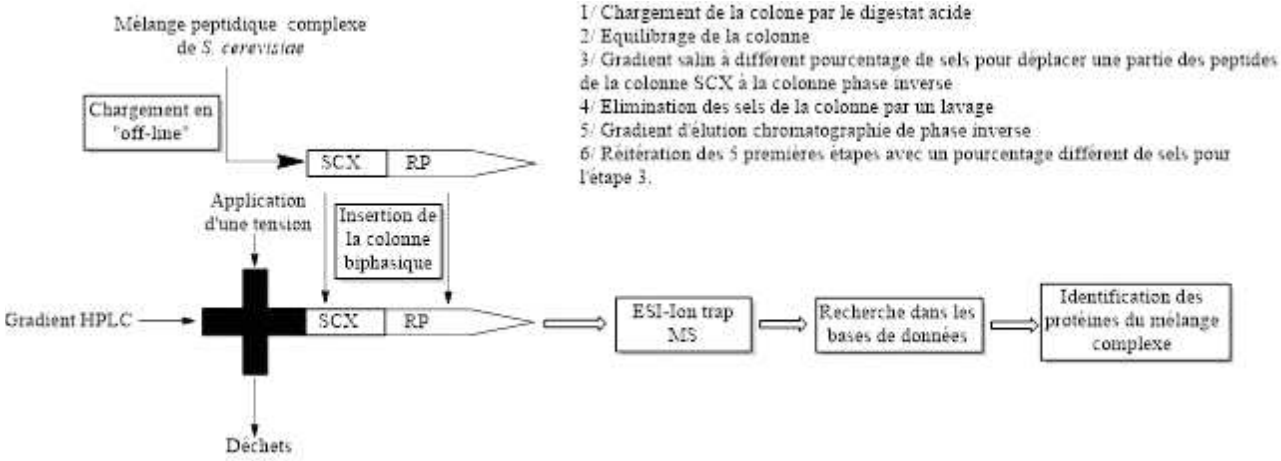


Figure 42 : Schéma descriptif de l'étape MudPIT illustrant le principe de « shotgun proteomic ». Dans un premier temps, un mélange complexe de peptides protéolytiques est chargé sur une colonne biphasique SCX/RP (pour « Strong Cation eXchange » et « Reversed Phase »), en l'occurrence un mélange complexe issu d'un digestat trypsique de protéome de *S. cerevisiae*. Par la suite, la colonne est mise en place dans le système d'élution. Après un équilibrage de la colonne, un gradient salin contenant du NH_4Ac à 250 mM qui est utilisé à différents pourcentages (de 10, 15, 20, 30, 40 …., 100 %) permet de déplacer une partie des peptides de la zone SCX à la zone RP. Enfin, après une étape de lavage de la colonne pour éliminer les sels, l'élution chromatographique est opérée et les peptides analysés par MS/MS[204]

Dans la plupart des cas et notamment l'étude de PTMs,[205,206] le fractionnement de mélanges complexes de protéines est obligatoire pour détecter des peptides de relativement faible abondance à partir d'un protéome entier qui, s'il devait être analysé par MS, pourrait provoquer la saturation du spectromètre. Dans cette optique-ci, la technique d'identification de protéine multidimensionnelle (MudPIT pour « Multidimensional Protein Identification Technique »)[207,208] a été utilisée pour l'analyse de protéomes entiers en off-line ou même directement couplée à un spectromètre de masse (voir Figure 42 p.84).[209,210] Celle-ci est très utilisée en protéomique quantitative. Elle permet le multiplexage de nombreux échantillons provenant, par exemple, de différentes étapes d'évolution d'un cancer à comparer entre elles de façon simultanée et quantitative. La méthode est très avantageuse notamment grâce au multiplexage qui réduit l'impact de l'erreur expérimentale, à l'accroissement de l'efficacité de l'ionisation ESI et à une meilleure sensibilité. Il a également été démontré une nette amélioration de la gamme dynamique (jusqu'à 12 ordres de grandeur en deçà de la protéine la plus abondante) pour l'analyse de protéines dans un mélange complexe.[211] Grâce à l'amélioration du pouvoir résolutif, la technique MudPIT est capable de distinguer des isoformes de

[204] M. P. Washburn, D. Wolters, J. R. Yates, *Nat. Biotechnol.* **2001**, *19*, 242–247
[205] J. Huang, F. Wang, M. Ye, H. Zou, *J. Chromatogr. A* **2014**, *1372*, 1–17
[206] A. M. N. Silva, R. Vitorino, M. R. M. Domingues, C. M. Spickett, P. Domingues, *Free Radic. Biol. Med.* **2013**, *65*, 925–941
[207] A. J. Link, J. Eng, D. M. Schieltz, E. Carmack, G. J. Mize, D. R. Morris, B. M. Garvik, J. R. Yates, *Nat. Biotechnol.* **1999**, *17*, 676–682
[208] D. A. Wolters, M. P. Washburn, J. R. Yates, *Anal. Chem.* **2001**, *73*, 5683–5690
[209] C. M. Delahunty, J. R. Yates, *BioTechniques* **2007**, *43*, 563, 565, 567
[210] C.-J. Yu, C.-L. Wang, C.-I. Wang, C.-D. Chen, Y.-M. Dan, C.-C. Wu, Y.-C. Wu, I.-N. Lee, Y.-H. Tsai, Y.-S. Chang, J-S Yu, *J. Proteome Res.* **2011**, *10*, 4671–4682
[211] S. D. Garbis, T. I. Roumeliotis, S. I. Tyritzis, K. M. Zorpas, K. Pavlakis, C. A. Constantinides, *Anal. Chem.* **2011**, *83*, 708–718

protéines et des différences d'expression entre elles. L'équipe de Papachristou et al. a, grâce cette méthode en « shotgun proteomic », pu analyser des protéines de papillomavirus humain (HPV) avec leur état de phosphorylation, malgré l'utilisation de l'ionisation ESI en mode positif et sans étape d'enrichissement préalable.[212] Le système a fourni d'excellentes sélectivités et spécificités ainsi que la sensibilité nécessaire à la détection de ces phosphorylations et isoformes.

D'autres techniques de séparation comme la chromatographie d'affinité ou encore la chromatographie d'exclusion peuvent être utilisées pour diminuer la complexité du mélange en « shotgun proteomic ».[213] A titre d'exemple, une méthode d'enrichissement a été appliquée spécialement aux peptides phosphorylés en 2007 par Jensen (IMAC pour « Immobilised Metal Affinity Chromatography »)[214 ,215] impliquant des ions métalliques comme le fer, le galium et l'aluminium et associée à la spectrométrie de masse en collaboration avec Thingholm en 2009.[216] Cependant, même après deux élutions, il arrive que seulement 10 à 20 % du protéome étudié ne soit révélé avec des protocoles et des instruments standards.[217,218] Malgré tout, si certaines protéines ciblées par une étude sont faiblement abondantes, une étape d'enrichissement ou d'immunoélimination de protéines prédominantes est obligatoire pour atteindre les objectifs de l'étude.

III. Les techniques de marquage chimique pour la quantification de peptides par SID

Nous allons discuter tout au long de ce paragraphe des différentes méthodes de marquage mises au point en commençant par le marquage photoaffin qui est apparu il y a un demi-siècle. Puis nous aborderons les premières méthodes de marquage isotopique sélectives de fonctions chimiques (approches de type « X-CAT ») développées en tirant parti de méthodes de séparation par affinité, avant de discuter du développement des marqueurs isobares et de leur versatilité. Enfin nous aborderons brièvement l'ICP-MS et l'ionisation plasma pour terminer par une méthodologie tirant parti des 3 sources d'ionisations majeures en spectrométrie de masse (ESI, MALDI et ICP)

III.A. La pêche aux protéines, ou Photoaffinity labelling

Le marquage par photoaffinité ou PAL pour « Photo Affinity Labelling » correspond à la création d'une liaison covalente entre un ligand et une protéine par irradiation UV. A l'origine, cette

[212] E. K. Papachristou, T. I. Roumeliotis, A. Chrysagi, C. Trigoni, E. Charvalos, P. A. Townsend, K. Pavlakis, S. D. Garbis, *J. Proteome Res.* **2013**, *12*, 2078–2089
[213] A.-C. Gingras, M. Gstaiger, B. Raught, R. Aebersold, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2007**, *8*, 645–654
[214] J. Porath, J. Carlsson, I. Olsson, G. Belfrage, *Nature* **1975**, *258*, 598–599
[215] E. Sulkowski, *Trends in Biotechnology* **1985**, *3*, 1–7
[216] T. E. Thingholm, O. N. Jensen, *Methods Mol. Biol. Clifton NJ* **2009**, *527*, 47–56, xi
[217] H. R. Fuller, N. T. Man, L. T. Lam, V. A. Shamanin, E. J. Androphy, G. E. Morris, *J. Proteome Res.* **2010**, *9*, 4228–4233
[218] W. K. Cho, X.-Y. Chen, Y. Rim, H. Chu, S. Kim, S.-W. Kim, Z.-Y. Park, J.-Y. Kim, *J. Plant Physiol.* **2010**, *167*, 771–778

technique est née en 1962 et a connu depuis bien des améliorations.[219,220] Celle-ci a été développée petit à petit grâce à des marquages qui ont été effectués avec une bonne fiabilité et une bonne reproductibilité avec des phénylazides,[221] diazirines[222] et des photophores de type benzophénone (voir Figure 43 p.86).[223]

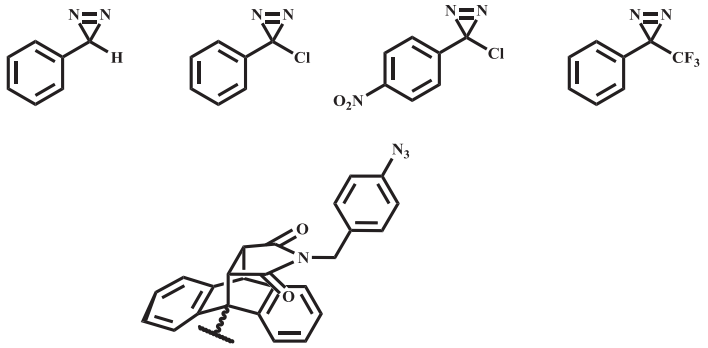


Figure 43 : Structure chimiques d'éléments utilisés pour le marquage photoaffin de protéines. En haut différentes diazirines, en bas une structure de phénylazide qui vont se lier par photoréaction à un site de protéine piégée par affinité envers le site réactif du marqueur PAL

Un nouveau marqueur a récemment été présenté, le TIP pour « Target Identification Probe » (voir Figure 44 ci-dessous),[224] et utilisé avec succès pour identifier l'interface entre la cyclosporine A (CsA), une drogue, et sa cible protéique la cyclophiline A (CypA) en présence de trois autres protéines non liantes. La stratégie consistait en un couplage du TIP marqué par 11 deutériums et sa version hydrogénée en mélange 1:1 sur le ligand CsA. Par la suite, la molécule résultante a été incubée avec le mélange de protéines sus-cité et la photoréaction enclenchée. La conséquence a alors été la réaction de liaison croisée avec la protéine CypA interagissant de façon spécifique avec CsA. Puis, une chromatographie d'affinité a été effectuée sur des billes de streptavidine pour purifier l'entité protéine-ligand créée avant de passer à l'étape de digestion enzymatique usuelle par action de la trypsine.

[219] A. Singh, E. R. Thornton, F. H. Westheimer, *J. Biol. Chem.* **1962**, *237*, PC3006-PC3008
[220] T. Tomohiro, M. Hashimoto, Y. Hatanaka, *Chem. Rec.* **2005**, *5*, 385–395
[221] R. Wombacher, A. Jäschke, *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 8594–8595
[222] L. Dubinsky, B. P. Krom, M. M. Meijler, *Bioorg. Med. Chem.* **2012**, *20*, 554–570
[223] J. Brunner, *Annu. Rev. Biochem.* **1993**, *62*, 483–514
[224] S. M. Lamos, C. J. Krusemark, C. J. McGee, M. Scalf, L. M. Smith, P. J. Belshaw, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2006**, *45*, 4329–4333

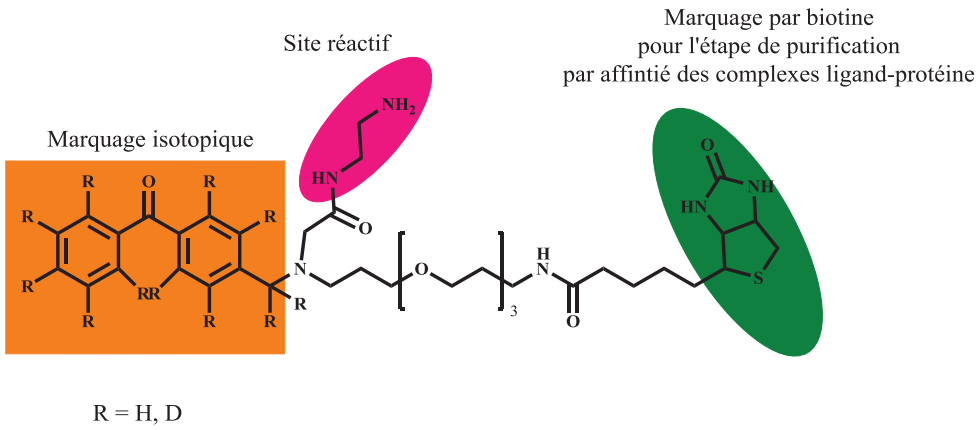


Figure 44 : Structure du réactif photoaffin marqué isotopiquement : TIP pour Target Identification Probe

Vient ensuite le temps de l'analyse des peptides formés qui peut se faire par ionisation ESI ou MALDI suivie d'expériences de MS/MS dans le but d'obtenir des informations de séquence à propos des peptides protéolytiques d'une part, et pour identifier les peptides modifiés par la photoliaison du TIP d'autre part. De telles identifications sont facilitées grâce au motif isotopique caractéristique des peptides modifiés et à l'incrément de masse créé par le TIP qui présente 11 sites deutérés. Cela permet également d'identifier les séquences peptidiques de la région de liaison de la protéine cible. En effet, l'étape de liaison croisée, du fait de la faible distance entre le site réactif et le photomarqueur, ne se fera que sur les groupements à proximité du site de liaison de la protéine, tandis que les peptides non modifiés permettent, après la digestion, d'identifier la protéine qui a été pêchée dans le milieu biologique grâce au marqueur qui agit alors comme un appât.

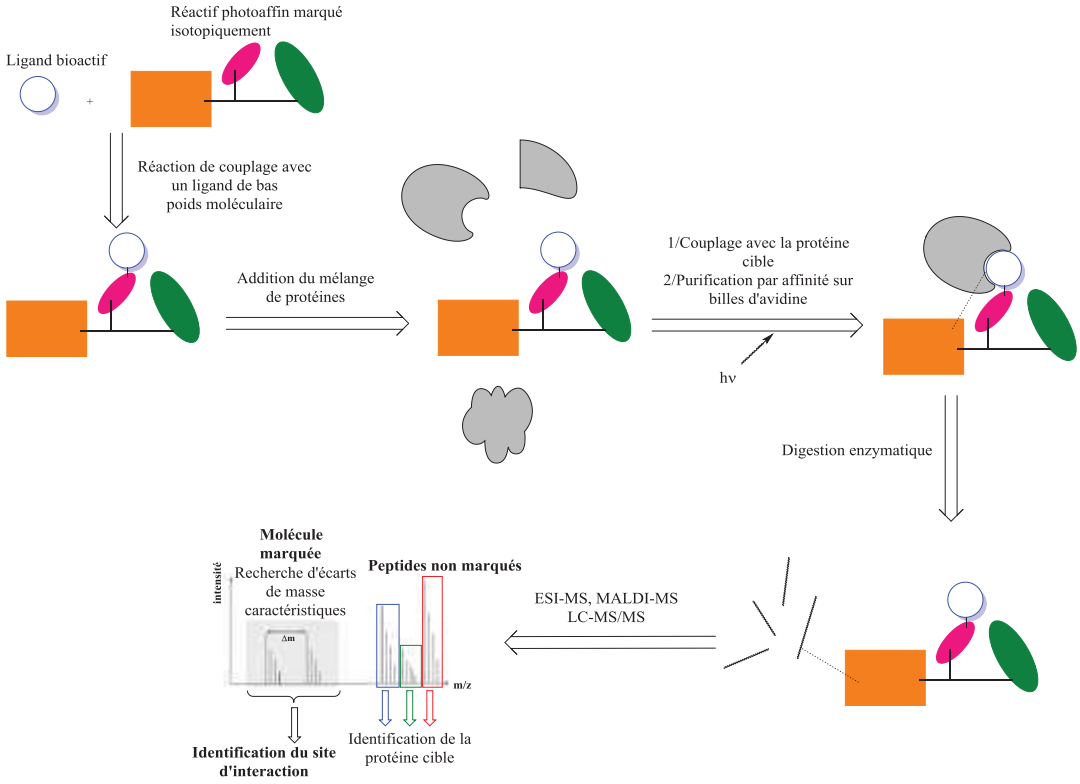


Figure 45 : Stratégie pour l'analyse d'interactions protéine-ligand via un marquage photoaffin par un mélange 1:1 de marqueur D_0 et D_{11} pour l'étude de l'interaction CypA-CsA (cyclosporine A et cyclophiline A)

Le lent développement de cette technique, de 1962 à 2006, montre les problèmes rencontrés tout particulièrement du point de vue de la complexité des échantillons. En effet, à un stade précoce de développement, cette problématique n'est pas du tout à l'ordre du jour étant donné que la priorité est de parvenir à créer un système et des conditions d'analyse dans un cas idéal, autrement dit à partir d'une molécule seule. C'est ensuite que vient l'étape de complexification de la technique analytique qui va de pair avec l'utilisation d'échantillons biologiques complexes. Le développement de la technique PAL s'est alors heurté au besoin de séparer les différents composants de ces échantillons biologiques pour mener à terme le développement de cette approche. Or c'est également dans les années 1960, en 1964 plus précisément, que la première mention d'une affinité entre la biotine et l'avidine a été citée.[225] Et c'est bien après que la possibilité de développer une méthode de purification d'échantillons biologiques complexes est apparue par nécessité, en 1968 et 1976 avec la démonstration de la technique de chromatographie d'affinité.[226,227] En revanche, ce n'est que bien plus tard que cette technique de séparation a été transférée aux études par spectrométrie de masse de biomolécules comme en témoignent les nombreux développement de méthodes analytiques qui seront abordées tout au long de ce chapitre.

III.B. Les techniques de marquage conçues pour une purification par affinité : les méthodes X-CAT

III.B.1. La première approche de marquage isotopique combinée à une purification par affinité : ICAT

La première de ces diverses techniques est dénommée ICAT (pour « Isotope Coded Affinity Tag »). C'est une méthode de marquage isotopique utilisée en protéomique quantitative qui se sert de réactifs chimiques. Ces sondes chimiques sont composées de trois éléments :

- Un groupe réactif pour le marquage d'acides aminés sur leur chaîne latérale (e.g : groupe iodoacétamide pour le marquage des cystéines).
- Un groupe espaceur marqué par un ou plusieurs isotopes stables.
- Un marqueur pour l'isolation par affinité (e.g : la biotine) des peptides ou protéines marquées.

[225] R. D. Wei, L. D. Wright, *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* **1964**, *117*, 341–344
[226] CUATRECA.P, M. WILCHEK, *BIOCHEMICAL AND BIOPHYSICAL RESEARCH COMMUNICATIONS* **1968**, *33*, 235
[227] A. LANDMAN, N. LANDMAN, *JOURNAL OF CHEMICAL EDUCATION* **1976**, *53*, 591–592

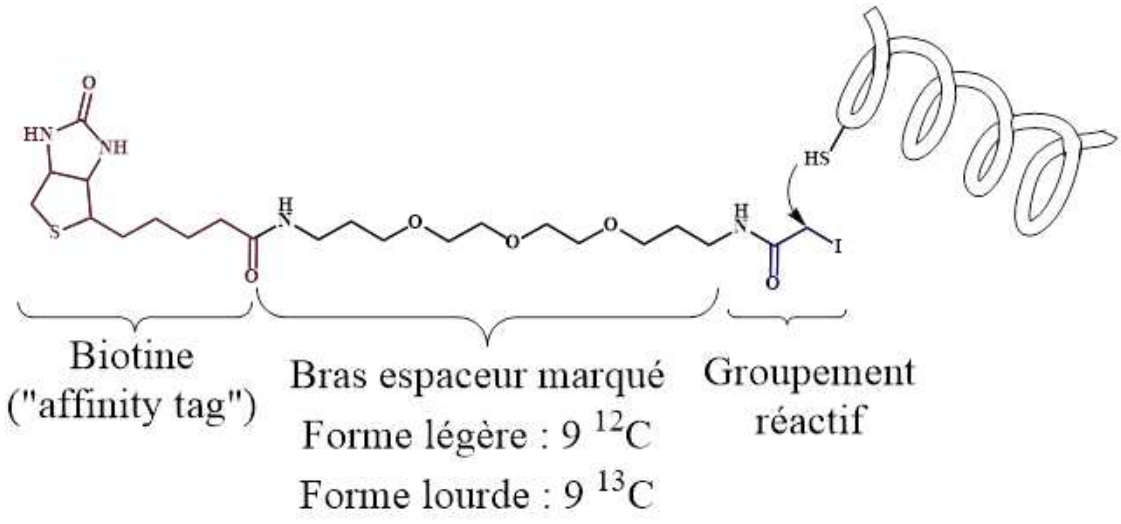


Figure 46 : Structure et réactivité d'un réactif ICAT

Les premiers marqueurs ont été développés et introduits avec du deutérium par Gygi et al. en 1999 (voir Figure 46 p.89).[228] Puis, plus tard le ^{13}C a remplacé le deutérium. Dans l'optique de comparer deux protéines, un échantillon est marqué avec une version isotopiquement légère de la sonde et l'autre avec une variante lourde. Par la suite, et pour minimiser toute erreur, les échantillons sont mélangés, digérés par une protéase comme la trypsine et isolés par chromatographie d'affinité (sur bille d'avidine par exemple). Les peptides sont ensuite analysés par LC-MS et la comparaison des intensités de leurs signaux permet de remonter aux niveaux relatifs de protéines entre les deux échantillons, typiquement un échantillon issu d'un sujet sain (contrôle) et d'un malade (différentiel à mesurer).

Ces marqueurs sont les premiers du genre à être commercialisés pour la quantification relative de niveaux d'expression de protéines. Ceux-ci ont un fragment biotine et iodoacétamide couplés de manière covalente pour, d'une part l'étape de purification des protéines et d'autre part pour le marquage des résidus type cystéine. Quant au marquage isotopique, celui-ci est porté par le bras espaceur (dans sa version isotopiquement lourde) notamment composé d'éthylèneglycol (PEG, voir Figure 46 p.89) faisant également office de lien entre le groupement réactif vis-à-vis des cystéines et le fragment biotine ; ce dernier étant crucial pour l'étape de purification grâce à l'affinité entre la biotine et les billes de streptavidine qui compose le système de purification pour isoler la protéine marquée et ainsi diminuer la complexité de l'échantillon tout autant que la quantité de molécules introduites par la suite dans le spectromètre de masse (voir Figure 47 p.90). Le système de marquage ICAT permet ainsi de marquer deux échantillons à comparer qui seront ensuite mélangés entre eux, protéolysés et analysés par mesure relative des intensités des ions.[229] La différence de

[228] S. P. Gygi, B. Rist, S. A. Gerber, F. Turecek, M. H. Gelb, R. Aebersold, *Nat. Biotechnol.* **1999**, *17*, 994–999
[229] B. A. Petriz, C. P. Gomes, L. A. O. Rocha, T. M. B. Rezende, O. L. Franco, *J. Cell. Physiol.* **2012**, *227*, 885–898

masse choisie (+ 9 Th) permet d'éviter les interférences dues à deux résidus cystéines marqués par ICAT (ΔM = 16,100 Th) et l'oxydation des méthionines (ΔM = 15,995 Th).

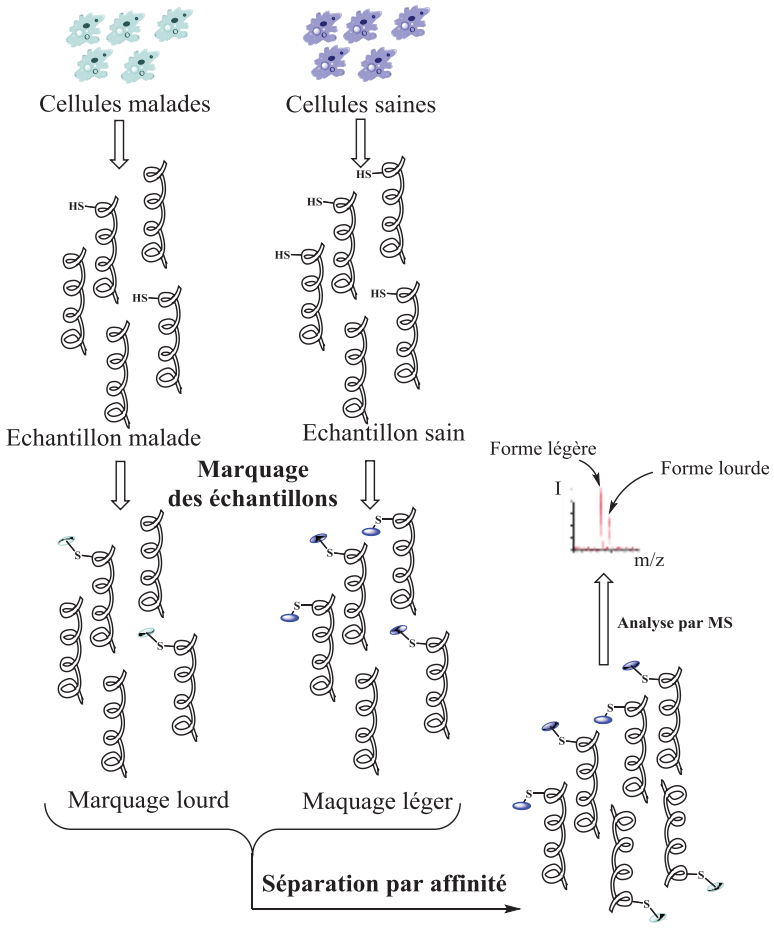


Figure 47 : Protocole opératoire type pour la méthodologie ICAT

L'inconvénient des premières générations de marqueurs ICAT réside dans la substitution d'atomes d'hydrogène par du deutérium. En effet, cela mène souvent à des différences de temps de rétention en RP-HPLC (pour « Reversed-phase High Pressure Liquid Chromatography ») entre la forme hydrogénée et deutérée du peptide marqué qui peut même aller jusqu'à une séparation au niveau de la ligne de base. Ce constat a été dressé par l'équipe de Zhang et al. en 2001 et 2002 ;[230,231] problème rapidement contourné par l'introduction de ^{13}C en remplacement du deutérium dans la version isotopiquement lourde du marqueur ICAT pour éliminer les problèmes de modification de temps de rétention en chromatographie liquide dûs aux interactions entre le deutérium et la phase stationnaire de la colonne.[232] Un autre problème recontré avec cette méthodologie provient du fragment biotine qui a tendance à interférer en spectrométrie de masse avec les recherches au sein de bases de données à cause de l'incrément de masse dû à cette molécule et au bras espaceur. Ce

[230] R. Zhang, C. S. Sioma, S. Wang, F. E. Regnier, *Anal. Chem.* **2001**, *73*, 5142–5149
[231] R. Zhang, C. S. Sioma, R. A. Thompson, L. Xiong, F. E. Regnier, *Anal. Chem.* **2002**, *74*, 3662–3669
[232] E. C. Yi, X.-J. Li, K. Cooke, H. Lee, B. Raught, A. Page, V. Aneliunas, P. Hieter, D. R. Goodlett, R. Aebersold, *Proteomics* **2005**, *5*, 380–387

groupement, compte-tenu de son hydrophobicité, engendre une élution des peptides marquées dans une fenêtre relativement étroite.

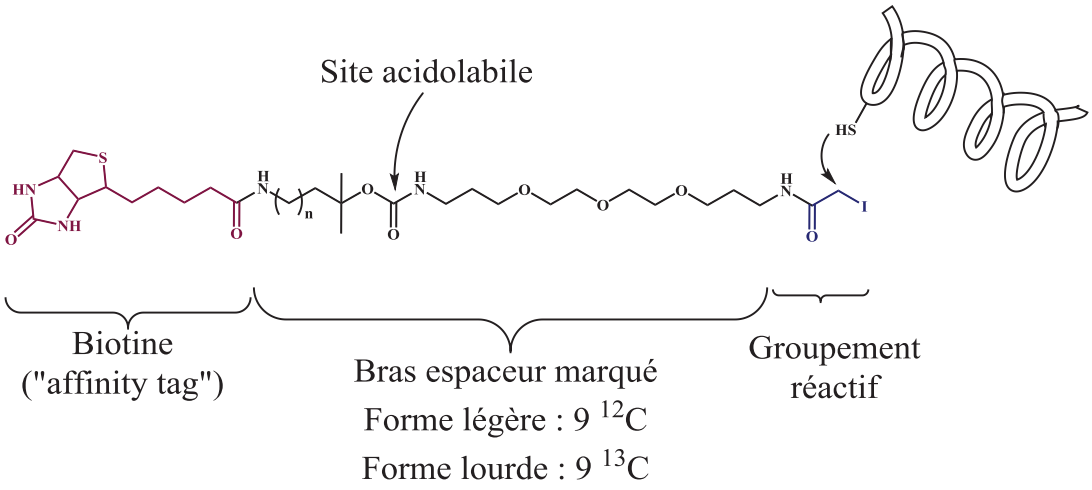
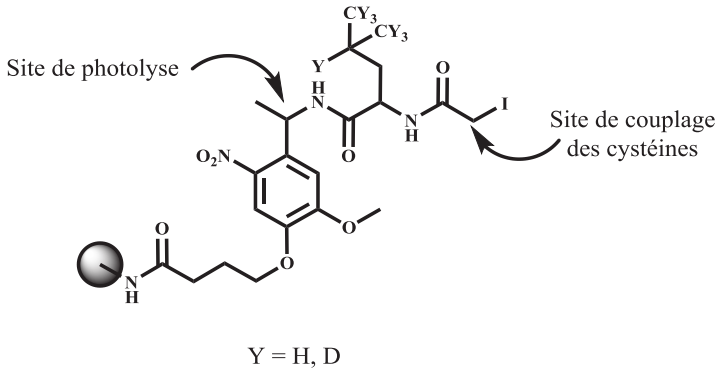


Figure 48 : Structure du marqueur cICAT avec lien acidolabile[233,234]

La solution est simple dans ce cas : retirer le groupement biotine après purification des protéines et avant l'analyse en spectrométrie de masse. C'est précisément ce qui a été proposé par les groupes de Wu et al. et Steen et al. en 2001 et 2002 respectivement grâce à qui l'introduction d'un groupement biotine éliminable par traitement acide a créé les marqueurs cICAT (pour « clivable Isotope Coded Affinity Tag », voir Figure 48 p.91)[235,236], évitant ainsi les problématiques d'interférence de la biotine. De nombreuses publications font état d'améliorations apportées par ce type de marquage.[237,238,239,240,241] Le groupe d'Aebersold, notamment, a proposé une autre approche dénommée SPICAT pour « Solid Phase Isotope-Coded Affinity Tag » que l'on pourrait même écrire SP_2ICAT (pour « Solid Phase Photocleavable Isotope-Coded Affinity Tag ») . Celle-ci est basée sur l'utilisation d'un marqueur éliminable par photolyse (voir Figure 49 p.92) qui résout le problème de la biotine en remplaçant celle-ci par un ancrage sur support solide.[242] Cette caractéristique permet, *in fine* et après couplage du marqueur sur une cystéine, de libérer les protéines accrochées au support

[233] Y. Oda, T. Owa, T. Sato, B. Boucher, S. Daniels, H. Yamanaka, Y. Shinohara, A. Yokoi, J. Kuromitsu, T. Nagasu, *Anal. Chem.* **2003**, *75*, 2159–2165
[234] A. H. Fauq, R. Kache, M. A. Khan, I. E. Vega, *Bioconjug. Chem.* **2006**, *17*, 248–254
[235] J. Li, *Mol. Cell. Proteomics* **2003**, *2*, 1198–1204
[236] J. Wu, Q. Lin, T. K. Lim, T. Liu, C.-L. Hew, *J. Virol.* **2007**, *81*, 11681–11689
[237] K. C. Hansen, *Mol. Cell. Proteomics* **2003**, DOI 10.1074/mcp.M300021-MCP200
[238] E. C. Yi, X.-J. Li, K. Cooke, H. Lee, B. Raught, A. Page, V. Aneliunas, P. Hieter, D. R. Goodlett, R. Aebersold, *Proteomics* **2005**, *5*, 380–387
[239] W. W. Wu, G. Wang, S. J. Baek, R.-F. Shen, *J. Proteome Res.* **2006**, *5*, 651–658
[240] J. Qu, W. J. Jusko, R. M. Straubinger, *Anal. Chem.* **2006**, *78*, 4543–4552
[241] J. Qu, R. M. Straubinger, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **2005**, *19*, 2857–2864
[242] H. Zhou, J. A. Ranish, J. D. Watts, R. Aebersold, *Nat. Biotechnol.* **2002**, *20*, 512–515

solide par irradiation. Ce marqueur sur support solide a fait l'objet d'une nouvelle synthèse proposée par Szychowski et al. en 2010.[243]



Photolyse :
Illumination à 10 cm filtrée par une solution de $CuSO_4$, de l'échantillon avec une lampe UV à grande longueur d'onde

Figure 49 : Structure chimique du marqueur SP_2ICAT (pour « solide phase photocleavable Isotope-Coded Affinity Tag ») et conditions de photolyse. Ce marqueur a été fixé sur un support solide pour ensuite être couplé aux cystéines. Le marqueur comprend une leucine sous forme isotopiquement légère ou lourde pour la quantification par SID

Cependant, et malgré les nouvelles générations de marqueurs ICAT qui présentent moins de fragmentations parasites du marqueur et donc une meilleure qualité de spectres MS/MS et une meilleure fiabilité, le coût des marqueurs pourrait être un frein à la démocratisation de l'approche ICAT. Il faut ajouter à cela le fait que la chromatographie d'affinité avec accroche par la biotine ne donne pas de relarguage quantitatif des peptides en faible abondance.[244] Ceci n'étant pas l'inconvénient le plus handicapant, comme l'est l'impossibilité de marquer et donc de quantifier les protéines qui ne contiennent pas de cystéine.

III.B.2. L'introduction d'hétéroéléments : les approches ECAT et MeCAT

La technique ECAT (pour « Elemental-Coded Affinity Tag ») diffère de l'ICAT en ce sens qu'elle utilise un marquage élémentaire grâce à un lanthanide et non plus à des isotopes comme le ^{13}C ou le ^{2}H qui va cibler les groupements thiol. Elle a été introduite par Zhang et al. lors de l'étude de la TSH (pour « Thyroid-Stimulating Hormone ») avec un marquage à l'europium et une détection par ICP-MS.[245] L'avantage de cette technique est la possibilité d'utiliser différents lanthanides dont la détection est spécifique par ICP-MS et donc d'envisager du multiplexage avec des kits de marquage pour plusieurs protéines.[246]

La technique MeCAT (pour « Metal-Coded Affinity Taf »),[247,248] quant à elle, diffère légèrement par sa structure chimique (voir Figure 50 p.93) qui lui donne l'avantage de faciliter la

[243] J. Szychowski, A. Mahdavi, J. J. L. Hodas, J. D. Bagert, J. T. Ngo, P. Landgraf, D. C. Dieterich, E. M. Schuman, D. A. Tirrell, *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132*, 18351–18360
[244] A. Fares, C. Nespoulous, M. Rossignol, J.-B. Peltier, *Methods Mol. Biol. Clifton NJ* **2014**, *1072*, 609–620
[245] C. Zhang, F. Wu, Y. Zhang, X. Wang, X. Zhang, *J. Anal. At. Spectrom.* **2001**, *16*, 1393–1396
[246] Z. A. Quinn, V. I. Baranov, S. D. Tanner, J. L. Wrana, *J. Anal. At. Spectrom.* **2002**, *17*, 892–896
[247] R. Ahrends, S. Pieper, A. Kuhn, H. Weisshoff, M. Hamester, T. Lindemann, C. Scheler, K. Lehmann, K. Taubner, M. W. Linscheid, *Mol. Cell. Proteomics* **2007**, *6*, 1907–1916
[248] R. Ahrends, S. Pieper, B. Neumann, C. Scheler, M. W. Linscheid, *Anal. Chem.* **2009**, *81*, 2176–2184

purification par chromatographie d'affinité par introduction d'un résidu biotine en vue d'un isolement exploitant l'affinité biotine-streptavidine. Cela permet également de purifier et d'enrichir sélectivement différentes protéines dans des mélanges complexes.[249,250,251,252]

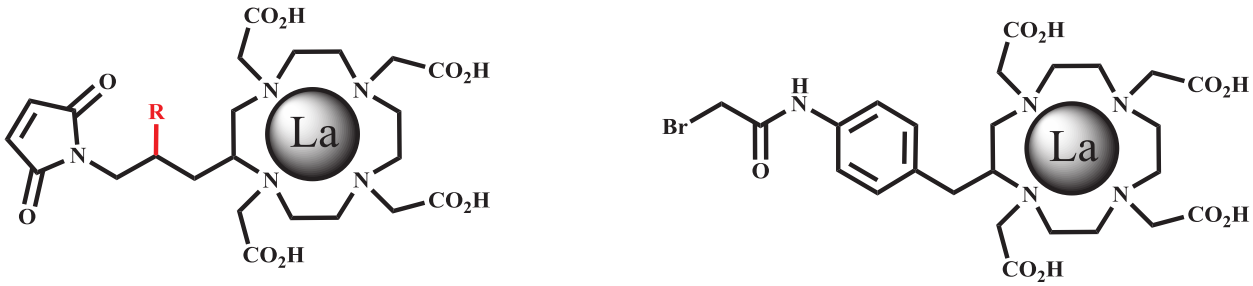


Figure 50 : Structure des marqueurs MeCAT (à gauche) pouvant accueillir un bras espaceur et un fragment biotine dans le groupe « R » et ECAT (à droite). Ceux-ci se couplent aux peptides protéolytiques sur leur chaîne latérale par leur groupement maléimide ou α-halogéné. Les substitutions possibles sur le marqueur MeCAT lui permettent des modifications supplémentaires pour faciliter la purification par affinité

III.B.3. Une approche originale sans marquage isotopique : la technique MCAT

Cette approche a été introduite par Cagney et Emili en 2002 en tant que stratégie complémentaire des méthodes de quantification par dilution isotopique existantes étant donné que celle-ci ne se sert pas d'isotopes mais d'un codage en masse.[253]

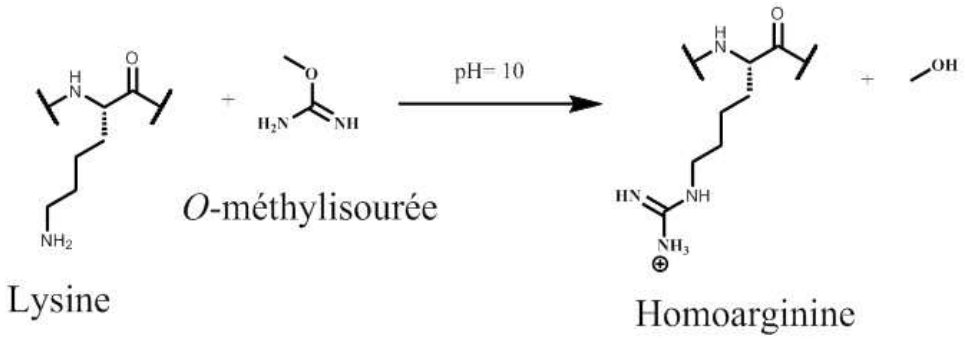


Figure 51 : Réaction de guanidination d'un résidu lysine. La guanidination permet de convertir de façon sélective les résidus lysine les convertissant en homoarginine

La technique MCAT (pour « Mass-Coded Abundance Tagging ») fournit une méthode utilisable simultanément en séquençage *de novo* et en séquençage de protéines présentes en faibles quantités dans des mélanges biologiques complexes et pour différents états cellulaires. L'idée étant d'avoir à disposition une stratégie de profilage de protéines pour faciliter la caractérisation d'états physiologiques et pathologiques de cellules ou d'organismes. Le principe est, de manière similaire aux autres stratégies de marquage, de procéder à une dérivation de résidus d'acides aminés au sein

[249] G. Schwarz, S. Beck, M. G. Weller, M. W. Linscheid, *Anal. Bioanal. Chem.* **2011**, *401*, 1203–1209
[250] A. H. El-Khatib, D. Esteban-Fernández, M. W. Linscheid, *Anal. Chem.* **2014**, *86*, 1943–1948
[251] D. Esteban-Fernández, C. Scheler, M. W. Linscheid, *Anal. Bioanal. Chem.* **2011**, *401*, 657–666
[252] U. Bergmann, R. Ahrends, B. Neumann, C. Scheler, M. W. Linscheid, *Anal. Chem.* **2012**, *84*, 5268–5275
[253] G. Cagney, A. Emili, *Nat Biotech* **2002**, *20*, 163–170

de peptides protéolytiques. Seulement, dans le cas de la technique MCAT, il s'agit d'une guanidination sélective et totale des chaînes latérales des Lysines au sein de peptides trypsiques (voir Figure 51 p.93). Cela entraîne dans les spectres MS une différence de masse de 21 sur l'ion dichargé entre les échantillons marqués et non marqués (voir Figure 52 p.94).

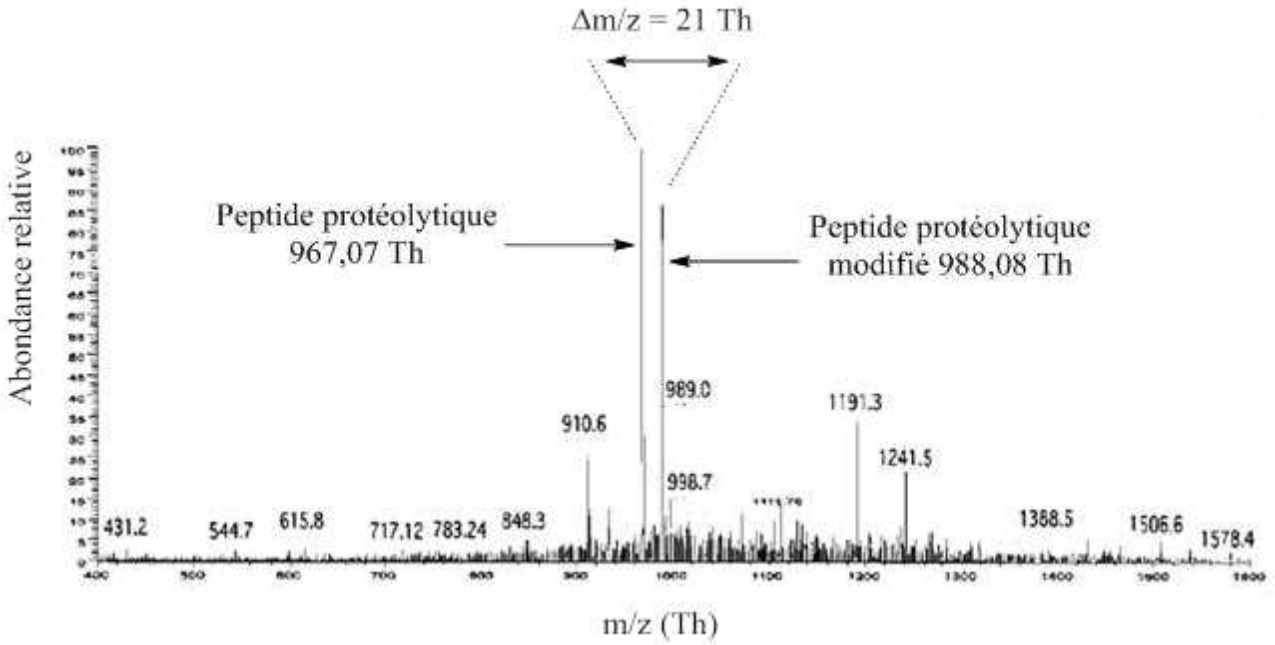


Figure 52 : Différences de masses observées entre le peptide marqué et non marqué : 42 Th sur l'ion monochargé et 21 Th sur l'ion dichargé

MCAT est utilisée pour identifier des protéines ainsi que des variations polymorphiques à partir de mélanges complexes et permet de quantifier la variation dans leur niveau d'expression à partir de différents types de cellules.

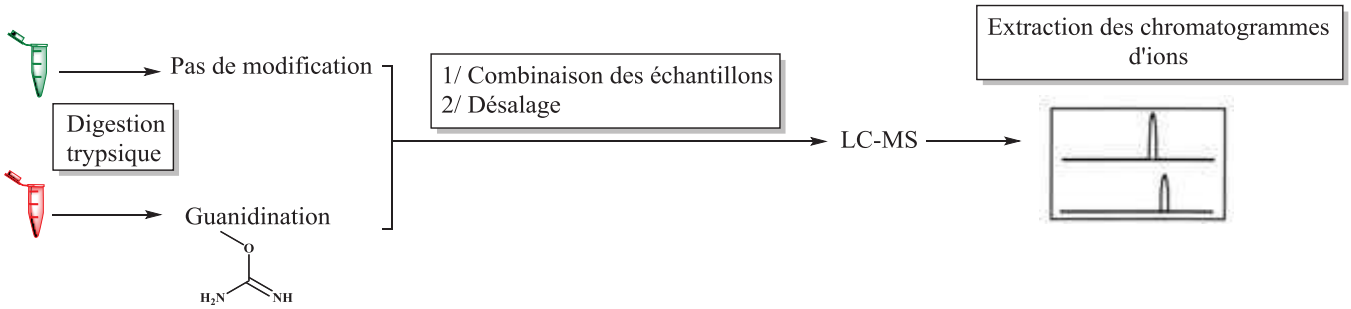


Figure 53 : Protocole de comparaison d'échantillons. Celui-ci démarre par la digestion trypsique des deux échantillons suivit de la dérivation de l'un des deux par l'*O*-méthylurée. Les fractions sont combinées et dessalées avant d'être éluées et analysées par LC-MS

La quantification MCAT est basée sur deux principes. Premièrement, des paires de peptides modifiés et non modifiés sont discriminés sur la base de leur différence de masse. En mode MS (voir Figure 53 ci-dessus), les rapports d'intensité du signal de ces paires d'ions fournissent une mesure directe de l'abondance relative de la protéine correspondante présente dans l'échantillon initial.

Deuxièmement, l'identité des peptides peut être obtenue par MS/MS au cours de la même expérimentation (voir Figure 54 p.95).

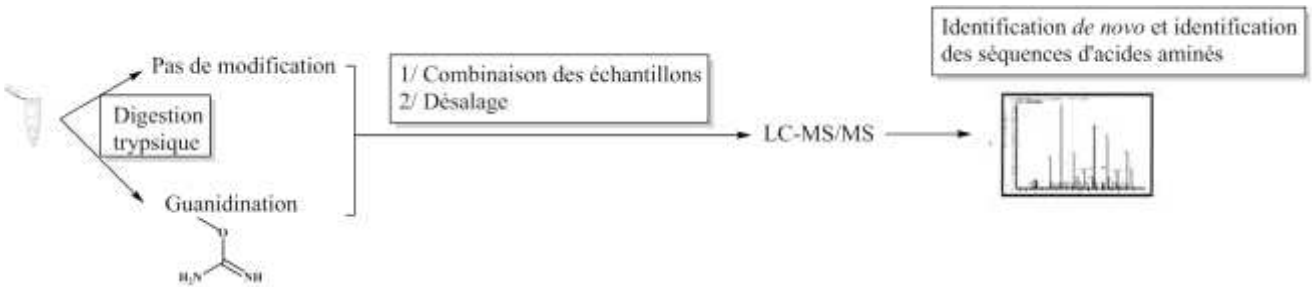


Figure 54 : Les protéines sont dans un premier temps digérées par la trypsine pour générer des peptides avec une lysine ou une arginine en N-terminal. Les peptides protéolytiques présentant une lysine sont par la suite, pour un aliquot, guanidinés avant élution chromatographique. Les deux fractions sont ensuite rassemblées avant d'être éluées et analysées en MS/MS par CID. Cela permet de caractériser la séquence peptidique en repérant les paires d'ions avec un incrément de masse parmi la série d'ions y dans les deux fractions chromatographiques séparées

La méthode a été validée en effectuant le suivi de l'abondance de protéines à partir d'une protéine exogène de levure sans différence significative entre l'échantillon contrôle et l'échantillon test (voir Figure 55 p.95). De plus il est tout à fait possible de coupler cette méthode à des étapes d'enrichissement comme la chromatographie d'affinité tout en la combinant avec des techniques de séparations multidimensionnelles pour améliorer davantage le recouvrement d'un protéome donné.[254,255]

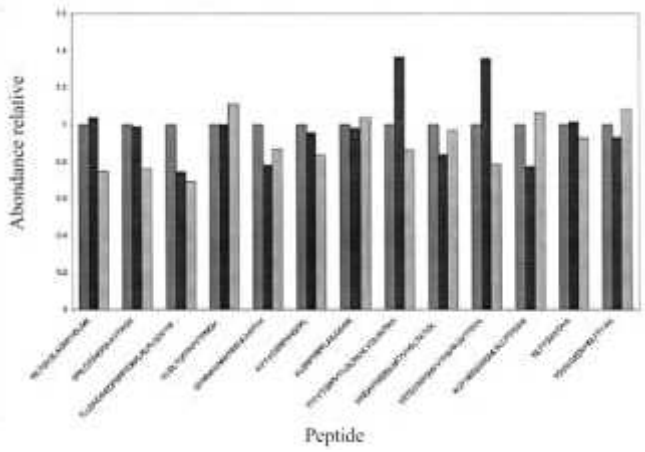


Figure 55 : Démonstration de la reproductibilité de la technique MCAT. Des extraits de levure digérés par action de la trypsine ont été caractérisés selon le protocole établi en triplica (chaque bâtonnet représentant une mesure)

Cette stratégie de quantification et de caractérisation s'est construite à partir de techniques bien établies et de principes ajustables pour des projets à grande échelle. C'est typiquement le cas pour des projets qui visent à classifier les fonctions de gènes connus et même inconnus en caractérisant les métabolismes et les différentes voies d'expression des protéines. Cela permet

[254] A. J. Link, J. Eng, D. M. Schieltz, E. Carmack, G. J. Mize, D. R. Morris, B. M. Garvik, J. R. Yates, *Nat. Biotechnol.* **1999**, *17*, 676–682
[255] M. P. Washburn, D. Wolters, J. R. Yates, *Nat. Biotechnol.* **2001**, *19*, 242–247

d'identifier des protéines en tant que cibles de médicaments dans le cadre de la recherche pharmaceutique.

III.B.4. Un second souffle pour les marqueurs ICAT : l'approche oxICAT

Cette technique a été publiée par Leichert et al en 2008.[256] Elle est une évolution de l'approche ICAT en ce sens qu'en se basant sur la capacité d'un marqueur ICAT à cibler des cystéines, il est possible de mesurer l'état d'oxydation de ces résidus. En effet, l'oxydation réversible des cystéines en pont disulfure ou encore acide sulfènique et nitroso (R-S-NO) est dans de très nombreux cas considéré comme une marque de PTM régulant l'action des différentes protéines dans les processus intracellulaires. Malgré tout, le rôle de ces transformations est encore soumis à débat. Il est donc nécessaire de systématiquement déterminer l'état des cystéines oxydées. C'est le but que poursuit le domaine de la « protéomique redox » (également appelée analyse redox) : établir les conséquences physiologiques des oxydations des cystéines. C'est un domaine particulièrement sujet aux défis techniques dûs au manque d'outils pour détecter les résidus oxydés et qui plus est, de les différencier de leurs formes réduites comme les cystéines par exemple.[257,258,259]

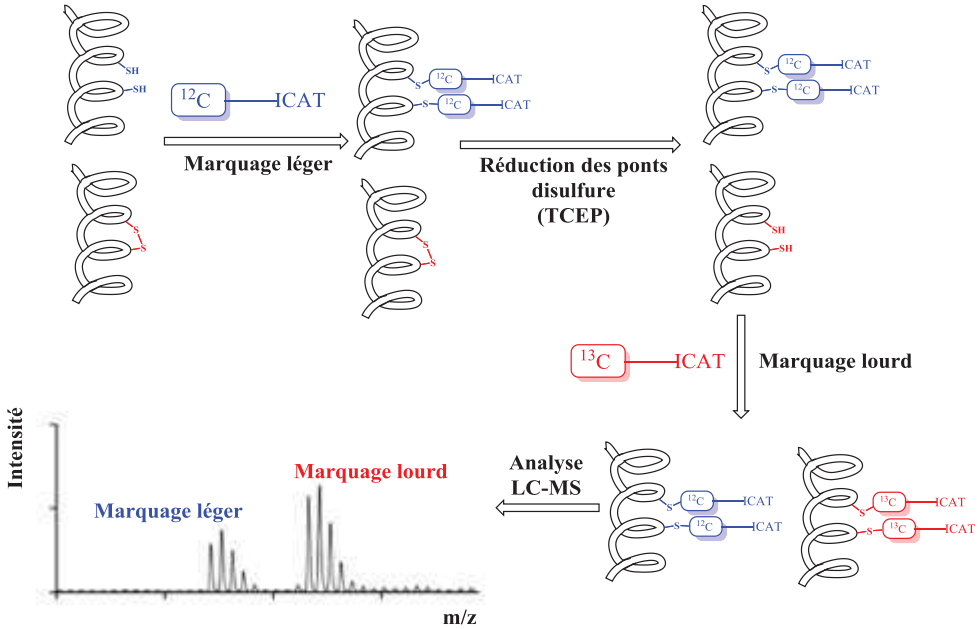


Figure 56 : Evaluation de l'état d'oxydation de protéines contenant des thiols avec un marqueur ICAT (méthodologie OxICAT)

C'est à ce moment qu'interviennent les marqueurs ICAT et l'analyse par spectrométrie de masse combinée avec des réactions de marquage par la forme isotopiquement légère et lourde des

[256] L. I. Leichert, F. Gehrke, H. V. Gudiseva, T. Blackwell, M. Ilbert, A. K. Walker, J. R. Strahler, P. C. Andrews, U. Jakob, *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2008**, *105*, 8197–8202
[257] G. Chiappetta, S. Ndiaye, A. Igbaria, C. Kumar, J. Vinh, M. B. Toledano, *Methods Enzymol.* **2010**, *473*, 199–216
[258] N. Brandes, D. Reichmann, H. Tienson, L. I. Leichert, U. Jakob, *J. Biol. Chem.* **2011**, *286*, 41893–41903
[259] P. Liu, H. Zhang, H. Wang, Y. Xia, *PROTEOMICS* **2014**, *14*, 750–762

ICAT. La première étape consiste en la dénaturation des protéines pour avoir accès aux cystéines réduites. De cette manière elles peuvent être marquées par la forme légère des ICAT, ce qui permet par la suite de réduire les ponts disulfures. Les cystéines ainsi libérées sont marquées par la forme lourde des ICAT permettant d'obtenir deux familles de protéines chimiquement identiques et qui ne diffèrent que de 9 Th (voir Figure 56 p.96). Ceci évite toute interférence entre l'oxydation des méthionine et les cystéines (voir Paragraphe III.B.1). Il est aussi possible de réduire la complexité des analyses en procédant à une digestion trypsique des protéines suivie d'une purification par chromatographie d'affinité avant de passer à l'étape d'analyse par MS et MS/MS pour l'identification des peptides. Cette méthode n'est en revanche pas capable d'identifier les plus hauts états d'oxydations des cystéines comme l'acide sulfénique ou l'acide sulfonique.

III.C. Une approche à large champ d'application : la technique MECT

Cette approche a été développée récemment par Liu et al. en 2006.[260] Par opposition aux méthodes MeCAT et MCAT, l'approche MECT (pour « Metal Element Chelate Tag ») est basée sur le marquage d'amines primaires de peptides.

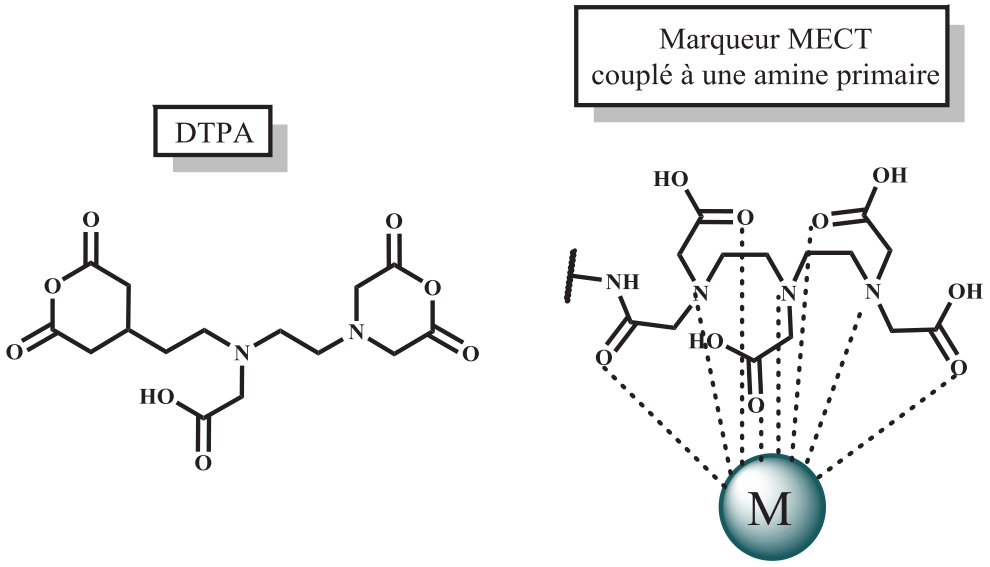
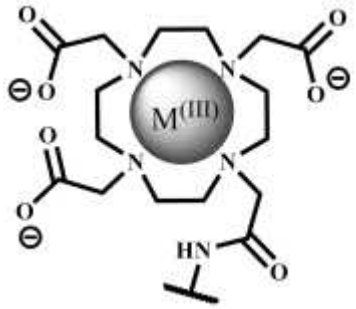


Figure 57 : Représentation du fragment DTPA couplé à un peptide par une liaison amide et chélaté à une terre rare de la famille des lanthanides. Lorsque l'yttrium (Y) et de le terbium (Tb) sont utilisés en 2plex, la différence de masse atteint 70 Th

Le but étant d'incorporer une terre rare pour la détection/quantification ultérieure, la chélation se fait grâce à un pentaacide introduit sous forme d'anhydride (l'anhydride bicyclique d'acide diéthylènetriamine-N,N,N',N'',N''-pentaacétique ou DTPA) qui est lié de manière covalente à une amine primaire du peptide par une liaison peptidique (voir Figure 57 ci-dessus). Un avantage de cette méthode est le faible coût de l'anhydride choisi et son utilisation usuelle en radiopharmacology pour la modification de protéines, peptides et anticorps. Le fait que cette molécule soit déjà

[260] H. Liu, Y. Zhang, J. Wang, D. Wang, C. Zhou, Y. Cai, X. Qian, *Analytical Chemistry* **2006**, *78*, 6614–6621

couramment utilisée est un point important en vue d'étapes de validation et de contrôle qualité ultérieures. L'autre avantage du DTPA est la possibilité de le coupler sur n'importe quel peptide généré par digestion enzymatique, car présentant soit une amine libre terminale, soit une lysine terminale. Enfin, les peptides modifiés par le marquage MECT produisent des spectres de fragmentation bien définis grâce notamment à des séries d'ions y majoritaires pour une meilleure fiabilité dans l'identification de la protéine, car ne subissant pas de variations dues au comportement de la terre rare face à l'ionisation.



$Tb^{(III)}$-DOTA : 542,082 Th
$Ho^{(III)}$-DOTA : 548,087 Th
$Tm^{(III)}$-DOTA : 552,091 Th
$Lu^{(III)}$-DOTA : 558,099 Th

Figure 58 : Représentation du marqueur MECT dans sa version 4plex publiée par Wang et al. en 2012 avec des différences de 6, 10, et 16 Th par rapport au terbium

La méthode a été améliorée en 2010 par Kerr et al. en une version duplexée, puis en 2012 par Wang et al. en une version tétraplexée avec l'utilisation du groupement DOTA pour « 1,4,7,10-tetra-azacyclododecane-N,N',N'',N'''-tetraacetic acid » et l'utilisation du MALDI-ToF-MS pour la quantification relative.[261] Les mesures obtenues ont montré une excellente corrélation par rapport aux valeurs théoriques et une très bonne justesse (C.V $<$ 20 %) compte-tenu de l'utilisation du MALDI.

III.D. Les marqueurs isobares appliqués en spectrométrie de masse en tandem

III.D.1. Une approche conçue pour la spectrométrie de masse en tandem : les marqueurs TMT

Cette technique a été introduite par Thompson et al. en 2003.[262] Les marqueurs TMT (pour « Tandem Mass Tag ») sont composés d'un groupe destiné à augmenter la sensibilité de détection, d'un groupe destiné à améliorer la fragmentation (pour la seconde génération de marqueurs) et d'un groupe destiné à normaliser le rapport m/z entre la version isotopiquement légère et lourde du marqueur. La technique repose sur la fragmentation par collision (CID) ce qui permet d'améliorer les signaux obtenus en ne faisant fonctionner l'instrument utilisé qu'en mode MS/MS. De plus cela permet de passer outre les molécules non marquées et donc d'améliorer la qualité des données obtenues. L'inconvénient de la première génération de marqueur résidait dans le fait qu'à basse

[261] X. Wang, Y. Zhang, X. Wang, H. Lin, W. Qin, X. Qian, *Analytical Methods* **2012**, *4*, 1629
[262] A. Thompson, J. Schäfer, K. Kuhn, S. Kienle, J. Schwarz, G. Schmidt, T. Neumann, C. Hamon, *Anal. Chem.* **2003**, *75*, 1895–1904

énergie (30 eV) et malgré l'obtention d'ions de séquence, des ions parasites attribués à la perte d'ammoniac venaient polluer le spectre en fluctuant selon le peptide marqué. En revanche, en CID haute énergie (70 eV) les ions de séquence étaient extrêmement faibles empêchant toute identification tout en assurant l'obtention des fragments TMT. La seconde génération de marqueurs TMT a démontré une capacité à se fragmenter à basse énergie grâce à l'introduction du résidu proline en tant qu'exhausteur d'ionisation, permettant l'obtention du fragment TMT attendu dès 35-40 eV.

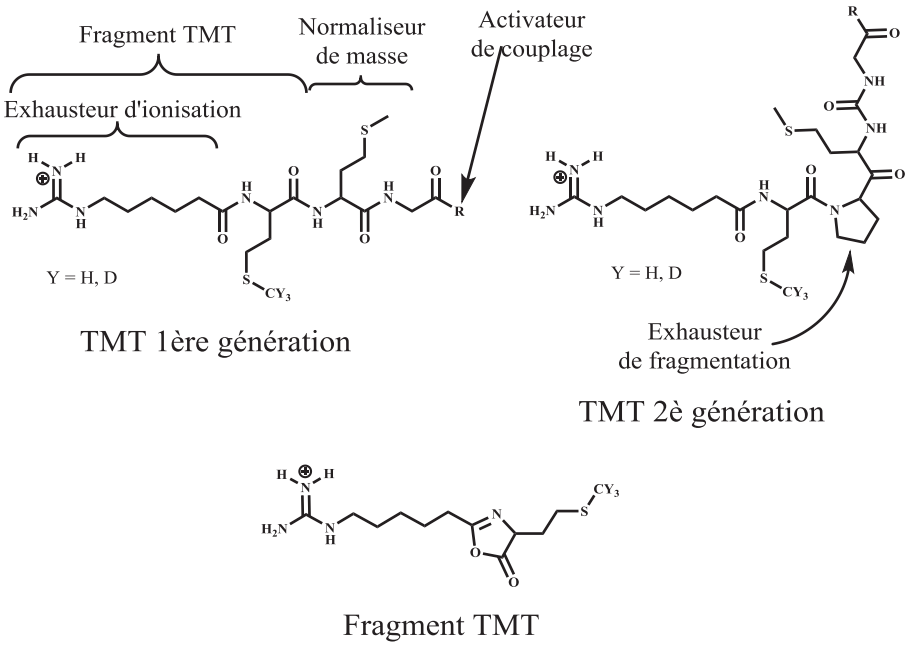
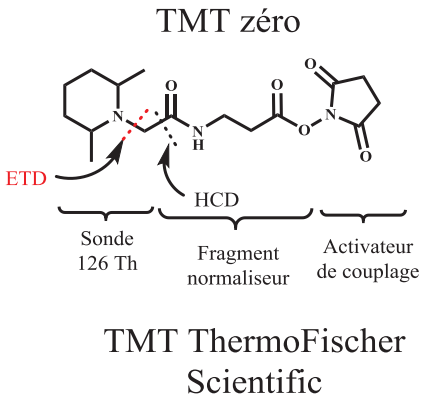


Figure 59 : Structures des TMT de 1ère et 2è génération développés par Thompson et al. Ceux-ci présentent deux (1ère génération) ou trois (2è génération) zones distinctes. Les fragments obtenus sont représentés par la structure en bas

Par la suite, la société ThermoFischer Scientific a développé et commercialisé plusieurs groupes de marqueurs TMT basés sur le même principe que les marqueurs iTRAQ mais avec des structures différentes pour effectuer des analyses multiplexées avec 2 à 10 échantillons pour permettre des mesures rapides et rentables allant du développement méthodologique (comparaisons d'échantillons, évaluation de l'effet dose-réponse) jusqu'à la quantification à haut débit de protéines. L'avantage de cette technique est la structure similaire des différents marqueurs qui évite d'avoir à modifier les conditions d'ionisation. Cependant les interférences isotopiques sont également, à l'instar de la technique iTRAQ, aussi un facteur d'erreur. En effet, étant donné que certains ions isobares sont co-isolés en mode MS et co-fragmentés par la suite avec la cible, cela a pour conséquence la perturbation des abondances des fragments.[263,264,265] Une solution proposée par Ting et al. a été de recourir à la MS^3 pour contourner le problème.[266]

[263] M. Bantscheff, M. Boesche, D. Eberhard, T. Matthieson, G. Sweetman, B. Kuster, *Mol. Cell. Proteomics* **2008**, *7*, 1702–1713



	Sonde		Normaliseur	
	m/z (Th)	Formule brute	m/z (Th)	Formule brute
TMT-0	126	$C_8H_{16}N$	99	$C_4H_5NO_2$
TMT duplex	126	$C_8H_{16}N$	100	$^{13}CC_3H_5NO_2$
	127	$^{13}CC_7H_{16}N$	99	$C_4H_5NO_2$
TMT sixplex	126	$C_8H_{16}N$	104	$^{13}C_4H_5{}^{15}NO_2$
	127	$C_8H_{16}{}^{15}N$	103	$^{13}C_4H_5NO_2$
	128	$^{13}C_2C_6H_{16}N$	102	$^{13}C_2C_2H_5{}^{15}NO_2$
	129	$^{13}C_2C_6H_{16}{}^{15}N$	101	$^{13}C_2C_2H_5NO_2$
	130	$^{13}C_4C_4H_{16}N$	100	$^{13}CC_2H_5NO_2$
	131	$^{13}C_4C_4H_{16}{}^{15}N$	99	$C_4H_5NO_2$
TMT 10plex	126	$C_8H_{16}N$	104	$^{13}C_4H_5{}^{15}NO_2$
	127-N	$C_8H_{16}{}^{15}N$	103	$^{13}C_4H_5NO_2$
	128-N	$^{13}CC_7H_{16}{}^{15}N$	102	$^{13}C_3CH_5NO_2$
	129-N	$^{13}C_2C_6H_{16}{}^{15}N$	101	$^{13}C_2C_2H_5NO_2$
	130-N	$^{13}C_3C_4H_{16}{}^{15}N$	100	$^{13}CC_3H_5NO_2$
TMT 10plex	127-C	$^{15}CC_7H_{16}N$	103	$^{13}C_3C_1H_5NO_2$
	128-C	$^{13}C_2C_6H_{16}N$	102	$^{13}C_2C_2H_5{}^{15}NO_2$
	129-C	$^{13}C_3C_5H_{16}N$	101	$^{13}CC_3H_5{}^{15}NO_2$
	130-C	$^{13}C_4C_4H_{16}N$	100	$C_4H_5{}^{15}NO_2$
	131	$^{13}C_4C_3H_{16}{}^{15}N$	99	$C_4H_5NO_2$

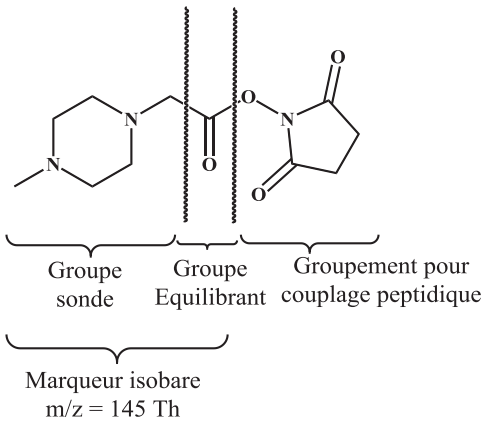
Figure 60 : Structure légendée des TMT commercialisés par ThermoFischer Scientific avec les liaisons cassées. Les TMT10plex sont distinguables par des analyseurs de haute résolution entre les marquages isobares au ^{13}C et à ^{15}N

Compte-tenu de la structure des marqueurs TMT, la substitution des ^{13}C par des ^{15}N pourrait permettre d'atteindre des capacités de multiplexage à 18 éléments. Cependant il sera nécessaire de valider l'absence d'interférences avec des fragments qui pourraient mener à une diminution des attributions. Cette méthodologie a insipiré l'approche iTRAQ détaillée au paragraphe ci-dessous.

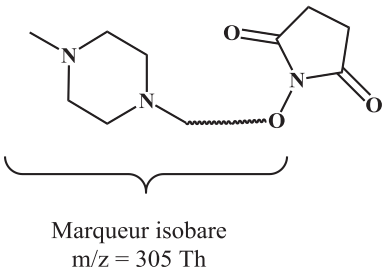
III.D.2. Une deuxième approche multiplexée pour la MS^2 : les marqueurs iTRAQ

La plupart des techniques actuelles de marquage chimique le font en N-terminal des peptides, sur l'amine ε de la chaîne latérale de la lysine ou sur des cystéines. De plus, les marqueurs isobares sont très populaires dans ce domaine grâce à une différence de masse entre les différentes formes marquées qui apparaîtra plutôt sur les ions fragments que sur les ions parent, simplifiant ainsi les spectres de masse. De tels réactifs ont fait l'objet de plusieurs articles de revues. [267,268] L'équipe de Ross et al. a, dans ce sens, démontré les capacités de multiplexage et l'utilité de la technique iTRAQ (pour « isobaric Tags for Relative and Absolute Quantification »).[269] Cette méthodologie permet de suivre les changements d'abondance de protéines et de PTMs via l'incorporation d'isotopes stables au sein de systèmes biologiques perturbés. L'intérêt de technique réside dans le fait qu'elle facilite l'analyse comparative de peptides et protéines dans un grand nombre de situations y compris la comparaison d'états normal/malade/drogué.

[264] N. A. Karp, W. Huber, P. G. Sadowski, P. D. Charles, S. V. Hester, K. S. Lilley, *Mol. Cell. Proteomics* **2010**, *9*, 1885–1897
[265] S. L. Shirran, C. H. Botting, *J. Proteomics* **2010**, *73*, 1391–1403
[266] L. Ting, R. Rad, S. P. Gygi, W. Haas, *Nat. Methods* **2011**, *8*, 937–940
[267] A. Nita-Lazar, H. Saito-Benz, F. M. White, *PROTEOMICS* **2008**, *8*, 4433–4443
[268] M. Bantscheff, M. Schirle, G. Sweetman, J. Rick, B. Kuster, *Anal. Bioanal. Chem.* **2007**, *389*, 1017–1031
[269] P. L. Ross, *Molecular & Cellular Proteomics* **2004**, *3*, 1154–1169



m/z (Th)	Sonde: Formule brute	Groupe équilibrant: Formule brute	Sonde + contrepoids: m/z (Th)
114	$C_5{}^{13}CH_{13}N_2$	$^{15}C^{18}O$	145
115	$C_4{}^{13}C_2H_{13}N_2$	$C^{18}O$	145
116	$C_4{}^{13}C_2H_{13}{}^{15}NN$	^{13}CO	145
117	$C_3{}^{13}C_3H_{13}{}^{15}NN$	CO	145



m/z (Th)	Sonde: Formule brute	Sonde + contrepoids: m/z (Th)
113	$C_6H_{13}N_2$	305
114	$C_5{}^{13}CH_{13}N_2$	305
115	$C_4{}^{13}C_2H_{13}N_2$	305
116	$C_4{}^{13}C_2H_{13}{}^{15}NN$	305
117	$C_3{}^{13}C_3H_{13}{}^{15}NN$	305
118	$C_2{}^{13}C_3H_{13}{}^{15}N_2$	305
119	$C_2{}^{13}C_4H_{13}{}^{15}N_2$	305
121	$^{13}C_6H_{13}{}^{15}N_2$	305

Figure 61 : Structure des marqueurs isobares pour la technique iTRAQ : iTRAQ4plex en haut et iTRAQ8plex en bas

L'intérêt de la technologie iTRAQ réside dans l'utilisation de réactifs isobares qui visent des amines primaires de peptides et de protéines. Les marqueurs sont composés d'un groupement « sonde » (e.g : m/z = 114, 115, 116, 117 Th) marqué par un ^{13}C, deux ^{13}C, deux ^{13}C et un ^{15}N ou bien 3 ^{13}C et d'un groupe « équilibrant » (e.g : m/z = 31, 30, 29 ou 28 Th ; voir Figure 61 ci-dessus) marqué par un ^{13}C, un ^{18}O, un ^{18}O et un ^{13}C ou aucun isotope pour un m/z total de 145 Th. Ces deux-derniers sont commercialisés couplés à un ester de N-hydroxysuccinimide pour l'étape de couplage. Il existe également un kit pour un multiplexage à 8 éléments différents (voir Figure 61 ci-dessus). Le groupe équilibrant a pour fonction de rendre tous les marqueurs isobares tout en facilitant la quantification grâce à la rupture de celui-ci permettant alors la quantification de chaque sonde séparément et sans ambiguïté. Les marqueurs ont été développés de telle sorte qu'ils apparaissent dans une région du spectre MS/MS exempte de bruit de fond et d'interférences comme l'immonium de la phénylalanine à 120 Th.[270,271] Cette technique possède quelques qualités incontestables comme la possibilité d'être utilisée pour n'importe quel système biologique étant donné que l'étalon est introduit après la lyse du système étudié. En outre, le multiplexage jusqu'à 4 ou 8 échantillons différents est possible grâce aux isobares disponibles depuis 2007.[272] Malheureusement, le passage de iTRAQ4plex à iTRAQ8plex a conduit à une diminution du nombre de correspondances à cause, notamment, d'interférences avec

[270] D. Bylund, R. Danielsson, G. Malmquist, K. E. Markides, *J. Chromatogr. A* **2002**, *961*, 237–244
[271] J.-H. Lee, J.-Y. Cho, *BMB Rep.* **2014**, *47*, 141–148
[272] L. Choe, M. D'Ascenzo, N. R. Relkin, D. Pappin, P. Ross, B. Williamson, S. Guertin, P. Pribil, K. H. Lee, *PROTEOMICS* **2007**, *7*, 3651–3660

certains fragments.[273,274,275] La méthodologie iTRAQ est mise en œuvre selon le protocole décrit par la Figure 62 p.102. A noter qu'un test pour estimer la concentration de protéines de chaque échantillon est effectué avant de passer à la digestion enzymatique. Puis la quantification relative d'un peptide parmi le mélange est effectuée en corrélant le signal de sa sonde par comparaison des intensités relatives simultanément à la caractérisation ou à l'identification (expérience *de novo*) des peptides grâce à leurs ions de séquence. Les peptides ayant la même masse avec des propriétés physico-chimiques identiques vis-à-vis de l'étape de séparation, ils sont élués sous le même pic chromatographique et le même pic en MS. Cela permet notamment de réduire la densité de données à retraiter par la suite.

Une limitation de cette technique vient du fait de l'introduction post extraction du marqueur qui requiert alors une extrême vigilance pour éviter toute contamination pendant le traitement des échantillons. De plus, comme explicité pour le marquage TMT, des résultats numériques abérrants peuvent apparaître si un ion contaminant est co isolé avec un peptide d'intérêt.[276]

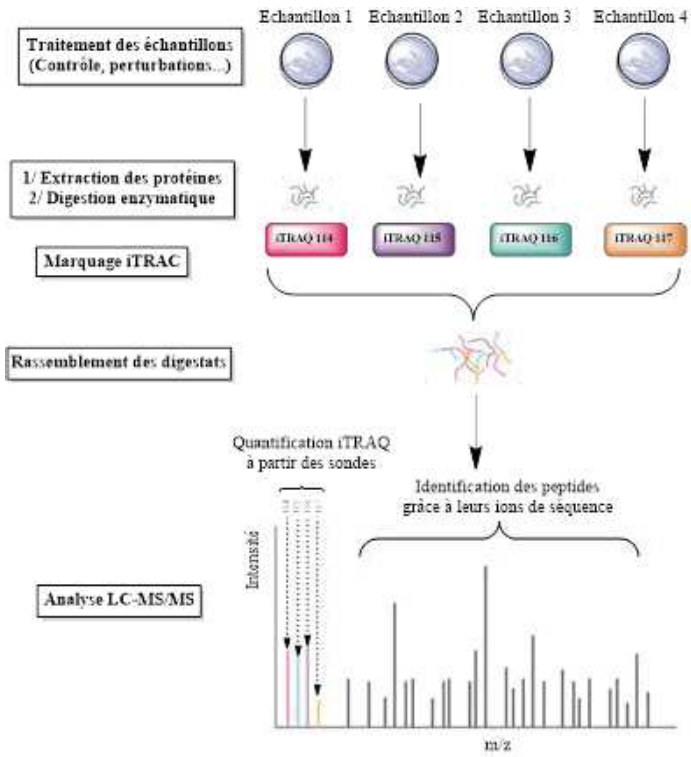


Figure 62 : Etapes clés de la stratégie iTRAQ. Les 4 marqueurs isobares sont couplés sur leur système avant analyse par fragmentation pour d'une part, identifier les peptides grâce à leurs ions de séquence et les quantifier grâce aux quatre sondes des marqueurs d'autre part

[273] P. Pichler, T. Köcher, J. Holzmann, M. Mazanek, T. Taus, G. Ammerer, K. Mechtler, *Anal. Chem.* **2010**, *82*, 6549–6558
[274] G. C. McAlister, E. L. Huttlin, W. Haas, L. Ting, M. P. Jedrychowski, J. C. Rogers, K. Kuhn, I. Pike, R. A. Grothe, J. D. Blethrow, S. P. Gygi, *Anal. Chem.* **2012**, *84*, 7469–7478
[275] T. Werner, I. Becher, G. Sweetman, C. Doce, M. M. Savitski, M. Bantscheff, *Anal. Chem.* **2012**, *84*, 7188–7194
[276] S. Y. Ow, M. Salim, J. Noirel, C. Evans, I. Rehman, P. C. Wright, *J. Proteome Res.* **2009**, *8*, 5347–5355

III.D.3. Un double marquage pour des peptides isobares : l'approche IPTL

Cette approche, dénommée IPTL pour « Isobaric Peptide Termini Labelling », a été introduite en 2009 par Koehler et al. dans le but d'identifier et de quantifier deux peptides protéolytiques marqués par deux molécules et transformés en composés isobares.[277] Le principe est d'appliquer deux marquages successifs sur des peptides protéolytiques côté N-terminal avec de l'anhydride succinique (hydrogéné ou deutéré) et côté C-terminal avec de la MDHI (pour « 2-Methoxy-4,5-DiHydro-1H-Imidazole ») hydrogénée ou tétradeutérée (voir Figure 63 ci-dessous).

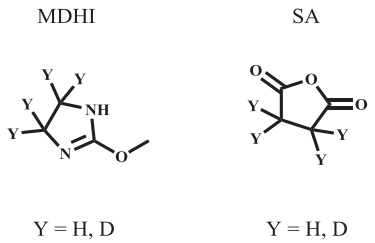


Figure 63 : Structure de la 2-Methoxy-4,5-DiHydro-1*H*-Imidazole (MDHI) utilisée pour marquer le côté C-terminal de peptides protéolytiques et de l'anhydride succinique (SA) utilisé en N-terminal

Le but étant d'obtenir des paires de peptides isobares en marquant, pour chaque peptide, chacune de ses extrêmités avec les versions hydrogénées ou deutérées de ces deux molécules. De cette manière l'augmentation de masse due au deutérium d'un côté est compensée par la présence du marqueur hydrogéné de l'autre côté. Heureusement, et à l'inverse des techniques de marquage non-isobares, la technique IPTL n'entraîne pas de complexification des spectres de masse étant donné que pour tous les peptides de masse identique marqués par un fragment léger/lourd d'une part, et par un fragment lourd/léger d'autre part sur leurs positions N-terminale/C-terminale, un seul pic apparaîtra en mode MS^1 ; cela permettant de visualiser une différence de 4 Th entre la série d'ions b marqués par un fragment léger et lourd. Ce phénomène permet d'obtenir une meilleure sensibilité et un recouvrement de séquence amélioré. Le grand avantage de cette technique par rapport à d'autres plus reconnues et déjà commerciales, comme iTRAQ et TMT qui relarguent une sonde dans les zones de basse masse pour chaque état biologique impliqué dans la comparaison, est l'existence de « signatures » pour tous les ions de séquences (b et y) dans les spectres MS/MS fournissant ainsi de nombreux points de quantification pour chaque peptide (voir Figure 64 p.104). C'est cet aspect qui rend l'approche IPTL viable pour les spectromètres de masse présentant des capacités réduites pour la détection/quantification aux basses masses. De plus, le fait d'avoir autant de points de quantifications possibles (les paires d'ions b et y séparés de 4 Th) pour chaque spectre de MS/MS améliore la robustesse des mesures.

[277] C. J. Koehler, M. Strozynski, F. Kozielski, A. Treumann, B. Thiede, *J. Proteome Res.* **2009**, *8*, 4333–4341

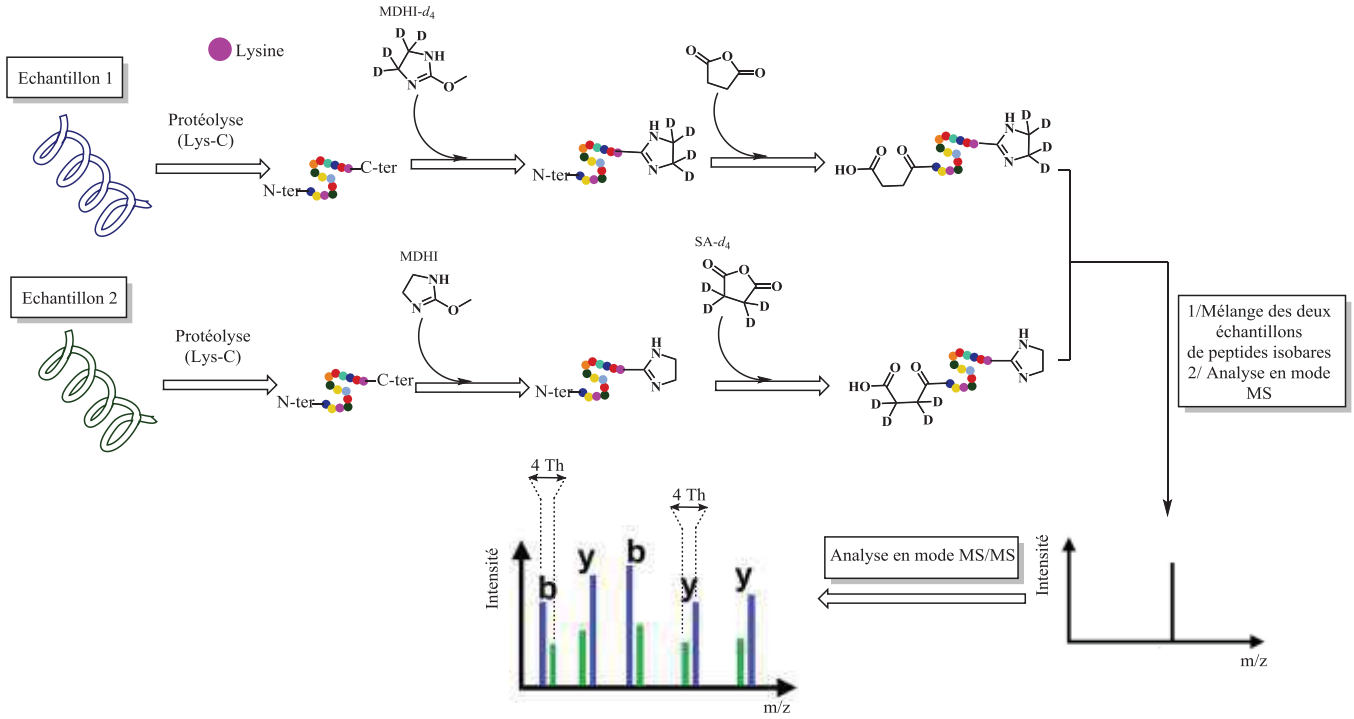


Figure 64 : Protocole pour l'application de la technique IPTL dans lequel deux protéines provenant de deux échantillons à comparer sont digérées par Lys-C produisant des peptides protéolytiques avec une lysine en C-terminal. Par la suite les peptides sont marqués par MDHI (ou sa version deutérée). La génération des peptides isobares se fait par dérivation croisée de l'acide succinique hydrogéné ou deutéré avec, respectivement, la MDHI deutérée ou hydrogénée. Les peptides isobares sont détectés en MS et quantifiés en mode MS/MS grâce aux séries d'ions b et y séparés de 4 Th

L'efficacité de l'approche IPTL pour l'analyse de protéomes complexes a pu être vérifiée en étudiant les variations des protéines mises en jeu dans le mécanisme d'apoptose lors de l'introduction d'un agent anti-mitotique (la 5-trityl-L-cystéine) sur des cellules de type HeLa traitées par un inhibiteur. La technique IPTL a permis d'identifier les protéines d'intérêt tout en mettant en lumière les différences d'expression entre les deux états comparés, confirmant le fait que la technique IPTL soit appropriée à l'analyse de protéomes complexes.[278,279] Un protocole amélioré a même été mis au point par Koehler et al. en 2011 pour être efficace et rapide avec un double marquage effectué en moins de 15 minutes dans un unique contenant sans besoin de micropurification entre les deux étapes, permettant ainsi de gagner en rapidité et en intérêt.[280]

Cette technique offre également la possibilité de multiplexer les analyses à trois éléments pour comparer trois états (ou échantillons) différents. Une telle démonstration a été développée par Koehler et al. en 2013 dans laquelle le marquage a été effectué en N-terminal par diméthylation suivie par une diméthylation des résidus lysine avec différentes formes isotopiquement stables de formaldéhyde et de cyanoborohydrure (voir Figure 65 ci-dessous).[281]

[278] C. J. Koehler, M. Strozynski, F. Kozielski, A. Treumann, B. Thiede, *J. Proteome Res.* **2009**, *8*, 4333–4341
[279] M. O. Arntzen, C. J. Koehler, A. Treumann, B. Thiede, *Methods Mol. Biol* **2011**, *753*, 65–76
[280] C. J. Koehler, M. Ø. Arntzen, M. Strozynski, A. Treumann, B. Thiede, *Anal. Chem.* **2011**, *83*, 4775–4781
[281] C. J. Koehler, M. Ø. Arntzen, G. A. de Souza, B. Thiede, *Anal. Chem.* **2013**, *85*, 2478–2485

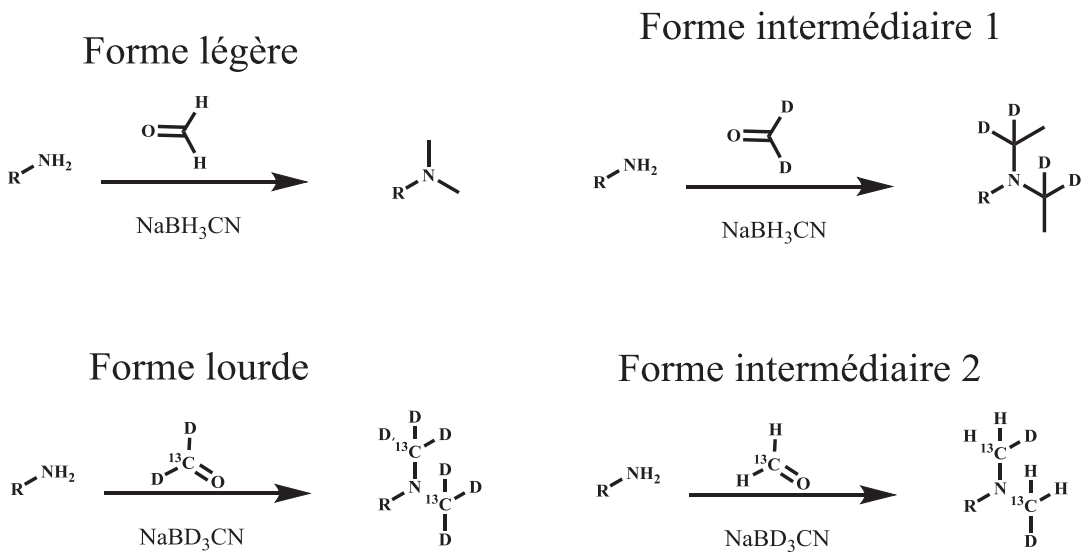


Figure 65 : Réaction de formation diméthylation des chaînes latérales de lysine pour obtenir en C-ter et N-ter d'un peptide les combinaisons Léger/lourd, intermédiaire/intermédiaire, lourd/léger

Suite à l'analyse LC-MS/MS, la combinaison des échantillons a montré trois séries de fragments reflétant exactement et de façon quantitative les rapports du peptide dans les trois échantillons mis en comparaison. Ce protocole de multiplexage est devenu très puissant une fois combiné à un logiciel de traitement de données statistiques et de visualisation graphique (IsobariQ). En effet, celui-ci s'est montré très efficace dans le suivi au cours du temps du profil protéique de cellules de type HeLa incubées avec un inhibiteur mitotique.

III.E. La versatilité des marqueurs isobares et les développements autour de la technique iTRAQ

III.E.1. L'approche mTRAQ®, ou comment tirer avantage des capacités de la MRM

Cette approche a été développée par Applied Biosciences (aujourd'hui ABSciex) en 2010 et repose sur la MRM en ciblant les peptides tryptiques d'une protéine d'intérêt dans le but d'obtenir une détection optimale.[282] Les marqueurs utilisés sont non isobares et offrent la possibilité de quantifier spécifiquement chaque version d'un peptide (i.e : marqué avec différentes formes isotopiques du marqueur).

[282] http://sciex.com/products/standards-and-reagents/mtraq-reagent, ABSciex, consulté le 2 Juin 2016

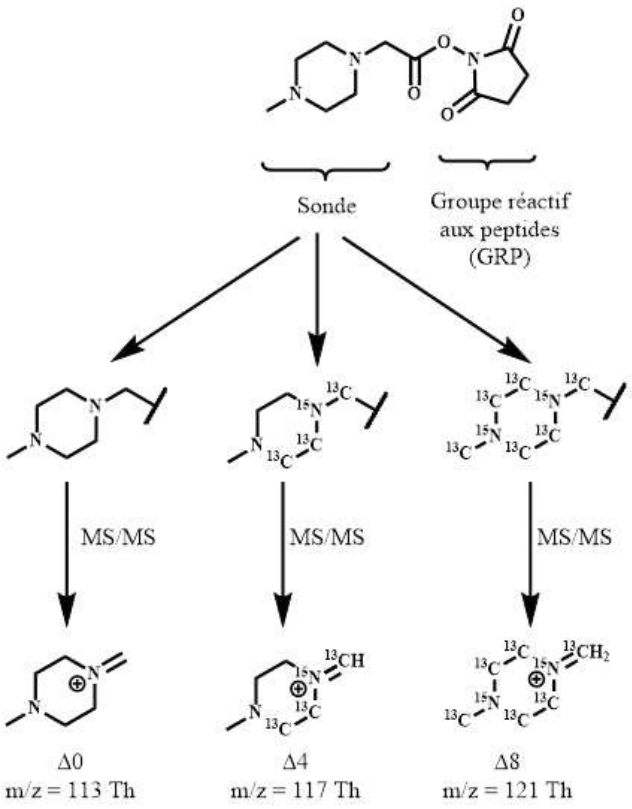


Figure 66 : Structure chimiques des marqeurs mTRAQ® et fragments obtenus en mode MS/MS

Cela permet de vérifier les rapports obtenus par MRM en inversant les marqueurs entre deux échantillons par exemple. Ces marqueurs mTRAQ® (pour « MRM-based Tag for Relative and Absolute Quantification ») non isobares ciblent directement les amines primaires terminales des peptides grâce à un groupe réactif aux peptides (GRP), l'N-hydroxysuccinimide. Ils sont une extension de la technologie des marqueurs iTRAQ mis à part le marquage isotopique (voir Figure 66 p.106) et conservent un temps de rétention identiques, une fois couplé à un peptide, ainsi qu'un comportement identique face à l'ionisation. Le recours au suivi MRM permet d'identifier et de caractériser les séquences ainsi que l'obtention de multiples points de comparaison parmi les ions de séquence (voir Figure 67 p.107). Cela augmente la spécificité de la quantification tout en permettant de remonter aux concentrations en protéines initiales et fait de cette approche une méthode puissante de comparaison de multiples échantillons.

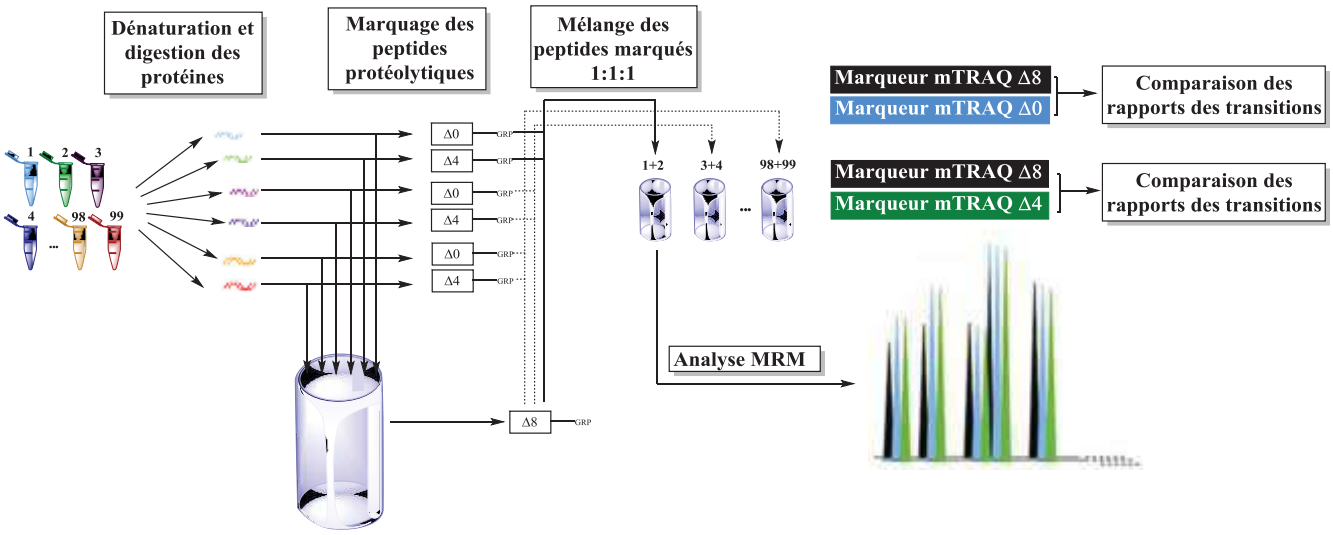


Figure 67 : Protocole général mTRAQ®. Les échantillons biologiques sont préparés et digérés en parallèle. Puis un aliquot de chaque échantillon est prélevé pour être mélangés avec les autres. Le marqueur mTRAQ® Δ8 est ensuite couplé aux peptides contenus dans ce mélange tandis que les différents échantillons sont marqués avec les molécules mTRAQ® Δ0 et Δ4. Enfin, un échantillon de Δ0, de Δ4 et du mélange Δ8 sont rassemblés avec un rapport 1:1:1 avant d'être analysés par MRM. Par la suite les transitions peuvent être comparées à l'étalon interne en Δ8 et entre eux grâce à ce dernier, commun à toutes les analyses

III.E.2. L'approche aTRAQ® , ou comment quantifier un acide aminé

L'approche aTRAQ® développée en 2011 (pour « amino acid Tagging for Relative and Absolute Quantification »),[283] quant à elle, bien qu'identique à mTRAQ® en ce qui concerne la structure des marqueurs (Δ0 et Δ8), affirme sa différence dans le procédé utilisé et l'application du marquage isotopique. En effet, celui-ci possédant l'N-hydroxysuccinimide, il ciblera les amines primaires non pas de peptides mais d'acides aminés dans le cas de cette méthodologie. Grâce à cela il est possible de marquer un échantillon d'un peptide quelconque avec un des deux marqueurs aTRAQ® et un échantillon de ce même peptide en tant que référence avec le second. Le mécanisme de dérivation des acides aminés (voir Figure 68 p.107) consiste simplement à intégrer le marqueur aTRAQ® grâce à l'N-hydroxysuccinimide qui cible les amines primaires ou secondaires des acides aminés dans une solution tamponnée à pH basique.

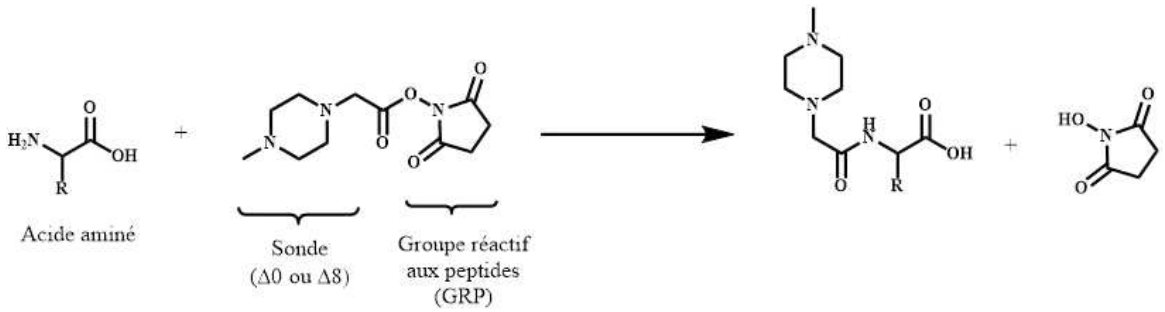


Figure 68 : Dans le cadre d'une expérience aTRAQ®, l'échantillon peptidique doit d'abord être purifié de toute protéine en ajoutant une solution d'acide sulfosalicylique qui permet de faire précipiter ces dernières avant de les marquer avec les deux molécules aTRAQ®. Un mélange des deux échantillons doit être effectué avant analyse par LC-MS/MS pour pouvoir comparer les intensités des fragments sur un triple quadripôle ou un Qtrap en mode MRM

[283] P. K. Held, L. White, M. Pasquali, *J. Chromatogr. B* **2011**, *879*, 2695–2703

Après mélange de l'échantillon et de l'analyte, ceux-ci sont injectés sur un système LC-MS/MS (triple quadripôle ou Qtrap en mode MRM) avec séparation chromatographique sur colonne C18 thermostatée à 50 °C. Un point important à noter est la capacité à multiplexer de telles analyses jusqu'à 45 acides aminés ou structures similaires (voir Figure 69 p.108) grâce à l'utilisation d'un algorithme pour faire de la « Scheduled MRM » afin de maximiser le « dwell time » pour chaque transition tout en en suivant un grand nombre, ceci ayant pour conséquence une qualité optimale des données. Le « dwell time » se définit comme étant le temps pendant lequel un système donné va rester dans un état donné, en l'occurrence cela correspond au temps au cours duquel l'analyseur conservera ses paramètres pour le suivi de plusieurs transitions données avant de les changer pour passer à un autre ensemble de paramètres.

En utilisant cette méthode, deux acides aminés marqués par les deux formes isotopiques des marqueurs aTRAQ® possèderont le même temps de rétention sans pouvoir être donc différenciés. Et c'est bien l'analyse par MRM des transitions qui permet de caractériser les paires légères/lourdes d'acides aminés (voir Figure 70 p.109).

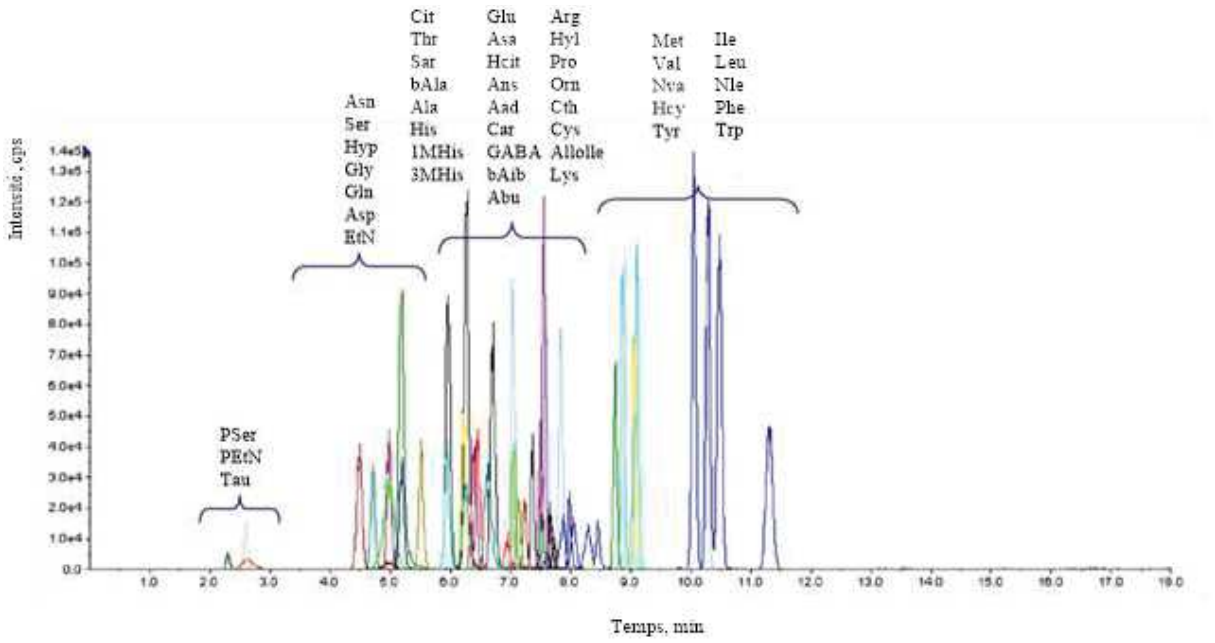


Figure 69 : Chromatogramme illustrant la capacité d'analyse avec des réactifs aTRAQ sur 44 acides aminés, petites molécules et protéines en LC-MS/MS mode MRM sur une élution de 18 minutes

L'approche aTRAQ® permet, comme les autres techniques de type X-TRAQ, de former des fragments qui apparaissent dans les régions de basses masses et qui ne présentent que très peu d'interférences et donc de risque d'obtenir des mesures biaisées. La précision et la justesse des mesures sont optimales grâce à l'utilisation d'étalons internes tandis que la comparaison des temps de rétention et des poids moléculaires de chaque acide aminé permet d'obtenir une confirmation supplémentaire.

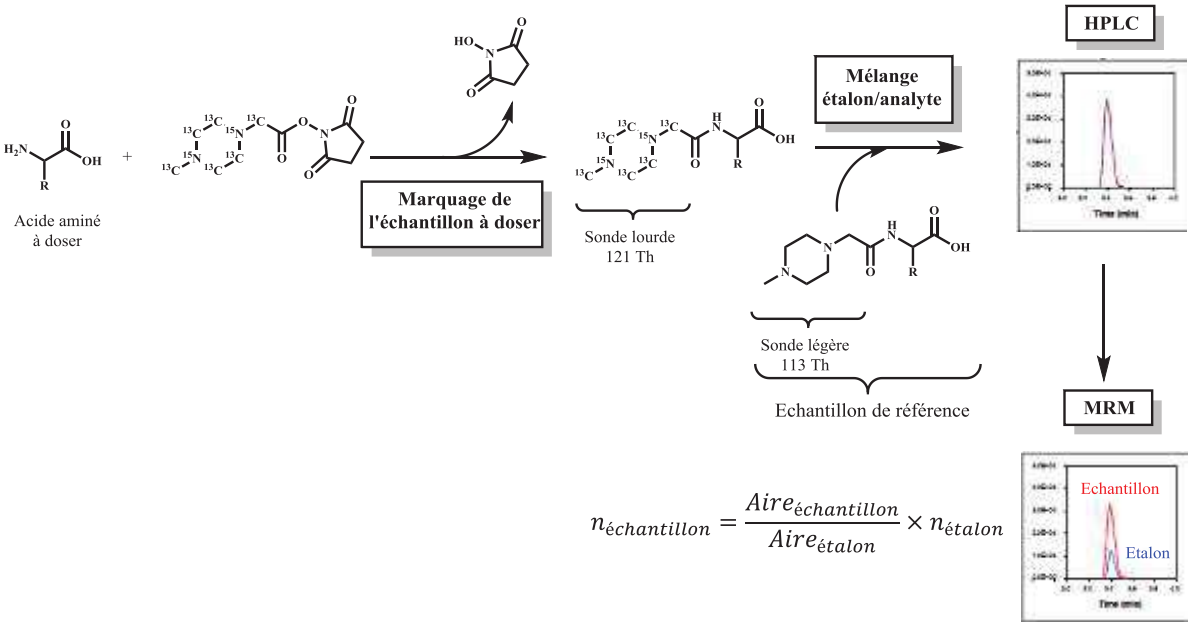


Figure 70 : Protocole générique pour l'analyse d'acides aminés (AAA) se servant des marqueurs aTRAQ®

En résumé, cette méthode est extrêmement puissante pour effectuer des analyses de type AAA pour « Analyse d'Acide Aminé » grâce au suivi spécifique des transitions acide aminé marqué/fragment de la sonde.

III.F. La mise en jeu de peptides protéotypiques : la technique AQUA

L'approche AQUA (pour « Absolute Quantification ») consiste en l'introduction d'un peptide protéotypique marqué avec des peptides étalons après l'étape de digestion enzymatique de la protéine et avant analyse LC-MS/MS. La technique AQUA a été développée par Gygi et al. en 2003 (voir Figure 71 p.110),[284] acronyme désormais répandu pour décrire la technique de quantification absolue à base de peptides marqués auprès de la communauté de protéomique. L'équipe a utilisée dans son étude un phospholipide marqué par un isotope en tant qu'étalon dans le but de quantifier la protéine endogène phosphorylée. Cette avancée a permis par la suite d'accéder à de nombreux biomarqueurs de protéines en lien étroit avec l'activité des kinases.[285] Le grand intérêt de cette technique réside également dans le couplage avec la séparation par gel SDS-PAGE qui propose ainsi un moyen très séduisant, bien établi et largement applicable à tout type d'échantillon protéique afin d'en diminuer la complexité, faisant de cette technique une méthode de choix pour la validation de biomarqueurs de protéines.[286]

Malgré ces points à prendre en compte, de récentes études ont tout de même pu démontrer la robustesse de la SID-MS avec utilisation d'étalons peptidiques pour la quantification de

[284] S. A. Gerber, J. Rush, O. Stemman, M. W. Kirschner, S. P. Gygi, *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2003**, *100*, 6940–6945
[285] K. E. Krueger, S. Srivastava, *Mol. Cell. Proteomics* **2006**, *5*, 1799–1810
[286] N. Rifai, M. A. Gillette, S. A. Carr, *Nat. Biotechnol.* **2006**, *24*, 971–983

protéines.[287,288] Typiquement, Arsene et al. ont eu recours à des protocoles modifiés et optimisés de digestion enzymatique qui se sont révélés très efficaces pour améliorer non seulement le taux de digestion mais également réduire le temps de cette étape. Cela a permis d'atteindre *in fine* une incertitude de 4%. L'étude d'Addona et al. vient également pointer du doigt les sources de variation communément rencontrées comme la possibilité de retrouver des interférences dans le suivi des transitions en LC-MS/MS, problématique qui peut être aisément contournée en ayant recours à des suivis de plusieurs transitions pour, d'une part augmenter la spécificité de la détection, et d'autre part diminuer l'impact d'une interférence pour une transition parmi l'ensemble suivi. Malgré tout, l'étude démontre la robustesse de la technique AQUA qui peut se transposer d'un laboratoire à un autre avec un déploiement méthodologique rapide pour arriver à des mesures robustes et reproductibles. Ceci étant un point crucial pour le développement à grande échelle et la démocratisation de toute nouvelle technique de SID-MS.

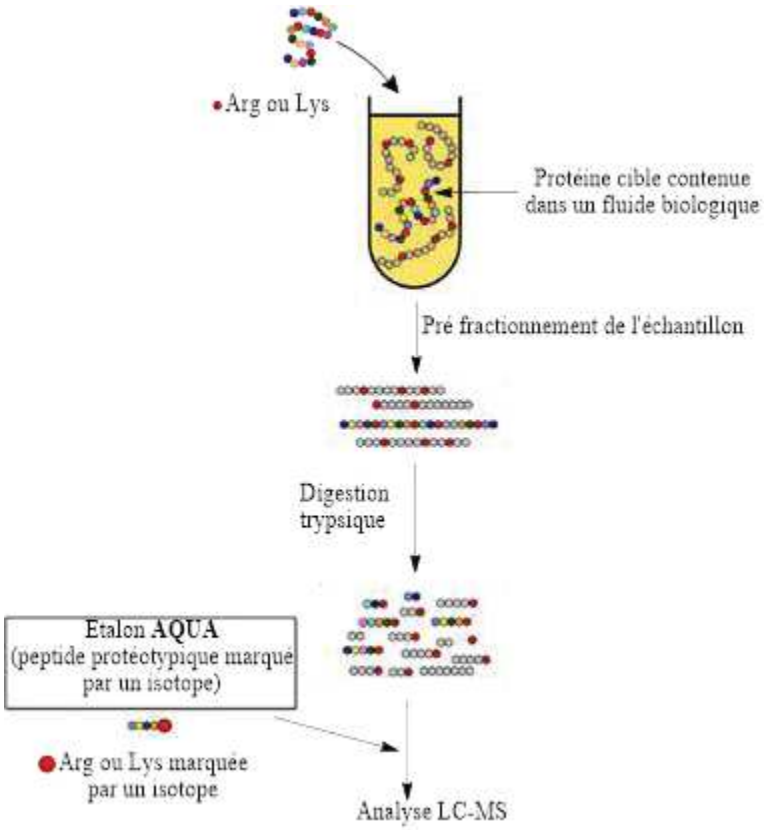


Figure 71 : Les peptides AQUA pour « Absolute Quantification » sont des copies de peptides protéotypiques de la protéine cible qui sont synthétisés et marqués par un isotope. Ils sont ajoutés à l'échantillon avant l'analyse LC-MS

Cette méthode est très attractive pour la recherche puisqu'elle requiert l'utilisation de peptides qui sont disponibles à la vente et simples à utiliser. Les différents revendeurs proposent

[287] C. G. Arsene, R. Ohlendorf, W. Burkitt, C. Pritchard, A. Henrion, D. M. Bunk, B. Güttler, *Anal. Chem.* **2008**, *80*, 4154–4160
[288] T. A. Addona, et al., *Nat. Biotechnol.* **2009**, *27*, 633–641

même une grande variété de séquences et la possibilité de synthétiser des séquences particulières. Le revers de la médaille étant le fait que les peptides AQUA soient limités en termes de taille de peptide qui doit être inférieure à 15 acides aminés tout en évitant certains acides aminés connus pour se dégrader ou s'oxyder comme le tryptophane.[289,290] D'autres acides aminés sont également proscrits lorsqu'ils sont combinés entre eux et risquent de créer des réactions secondaires pour des analyses ultérieures comme la glutamine en N-terminal qui peut se transformer en pyroglutamate ou encore les association Asp-Leu, Asn-Pro et Asp-Pro.[291,292] Même en mettant cet aspect de côté et des coûts de production qui diminuent, la stratégie AQUA peut vite devenir chère surtout lorsque l'on parle de plusieurs peptides à synthétiser, purifier et quantifier précisément et un par un. La solution est alors de se limiter à un seul peptide AQUA. Or même si celui-ci est protéotypique, il y a toujours un risque que celui-ci corresponde à plusieurs formes de la protéine.

Le peptide étalon étant introduit tardivement dans le protocole de manipulation de l'échantillon, la méthode AQUA est peu compatible avec les techniques de pré fractionnement comme la SDS-PAGE qui peut affecter de façon non négligeable la justesse de la méthode AQUA.[293] De plus, étant donné que les peptides AQUA sont des analogues de molécules issues de digestions enzymatiques complètes, il est nécessaire de vérifier si celle-ci est effectivement totale lorsqu'effectuée sur une protéine cible.

Il est à noter deux améliorations de la technique publiées en 2004 et 2006 par Anderson et al. et Mayya et al. respectivement.[294] La première, baptisée SISCAPA pour « Stable Isotope Standards and Capture by Anti-Peptide Antibody », consiste en l'ajout d'une étape de sélection par immunoaffinité du peptide protéotypique et de son analogue marqué aux isotopes après la digestion enzymatique et avant l'analyse LC-MS. Cela permet une manipulation commune du peptide naturel et de son analogue en ne laissant alors qu'une seule étape sujette à un contrôle approfondi : la digestion enzymatique. L'autre amélioration apportée à cette technique est la possibilité de l'étude des mécanismes de phosphorylation de protéines grâce à l'incorporation de ces mêmes phosphorylations sur les peptides étalon.[295] C'est l'équipe de Mayya et al. qui, en 2006, a réussi à effectuer le suivi de la phosphorylation des protéines CDK (pour « Cycle Dependent Kinases ») sur plusieurs résidus. Pour y parvenir, l'équipe a utilisé des peptides synthétisés qui comprennent les sites de régulation de la protéine CDK, à savoir les résidus T^{14} et Y^{15} de la séquence trypsique IGEG T^{14}

[289] T. Simat, K. Meyer, H. Steinhart, *Journal of Chromatography A* **1994**, *661*, 93–99
[290] M. van de Weert, F. M. Lagerwerf, J. Haverkamp, W. Heerma, *J. Mass Spectrom.* **1998**, *33*, 884–891
[291] Piszkiewicz D., Landon M., Smith E.L. *Biochem Biophys Res Commun,* **1970**, *40*, 1173–1178
[292] Geiger T., Clarke S. *J Biol Chem*, **1987**, *262*, 785–794
[293] J. Havliš, A. Shevchenko, *Anal. Chem.* **2004**, *76*, 3029–3036
[294] N. L. Anderson, N. G. Anderson, L. R. Haines, D. B. Hardie, R. W. Olafson, T. W. Pearson, *J. Proteome Res.* **2004**, *3*, 235–244
[295] V. Mayya, K. Rezual, L. Wu, M. B. Fong, D. K. Han, *Mol. Cell. Proteomics MCP* **2006**, *5*, 1146–1157

Y^{15}GVVYK, obtenue par digestion trypsique de la protéine. Le but étant de suivre la phosphorylation de la protéine, l'équipe a choisi d'utiliser 4 combinaisons de phosphorylation (T^{14}_{P}-Y^{15}_{p}, T^{14}_{P}-Y^{15}, T^{14}-Y^{15}_{p}, et T^{14}-Y^{15}) pour pouvoir mettre en évidence la dynamique de phosphorylation de cette séquence des CDKs. Cette technique souffre cependant de certains problèmes soulevés dès 1996 par la publication initiale de Barr et al.,[296] le premier étant la pureté et la stabilité des molécules de référence ainsi que la variabilité de l'hydrolyse de la protéine. De plus, afin de pouvoir quantifier convenablement un étalon peptidique par SID-MS, celui-ci doit pouvoir être solubilisé et ne subir aucune modification chimique pendant sa conservation ou lors de l'étape de préparation de l'échantillon ; sans oublier la nécessité absolue de minimiser la perte de molécules par adsorption lors du stockage.[297,298]

En somme, la technique AQUA est bien adaptée à tout ce qui va concerner, d'une part la quantification de protéine ciblée pourvu que l'étape de digestion enzymatique soit particulièrement au centre de toutes les attentions, d'autre part l'analyse de phosphorylations de protéines.

III.G. La technique IDBEST, ou comment combiner ESI, MALDI et ICP-MS

Les marqueurs IDBEST (pour « Isotope-Differenciated Binding Energy Shift Tag ») ont été introduits par Hall et Schneider en 2003 et 2004.[299,300] Ceux-ci sont composés entre autre d'éléments qui présentent un fort défaut de masse comparé aux éléments habituellement utilisés (C, H, N, O). Un défaut de masse représente une différence négative entre la masse d'un composé et la somme des masses de ses éléments, qui reflète dans le cas d'un atome l'énergie de liaison nucléaire ; la référence du point de vue de la spectrométrie de masse étant le ^{12}C qui affiche un défaut de masse de 0. On parle de défaut de masse car, par l'intermédiaire de l'équation de la relativité restreinte d'Einstein ($E = m \times c^2$), à tout défaut ou excès de masse correspond un défaut ou un excès d'énergie de liaison nucléaire.

La plupart des stratégies d'études de profils protéiques en protéomique échouent face à l'identification de molécules de faible abondance à cause de leur gamme dynamique souvent limitée, comparée à la gamme dynamique affichée des approches ciblées de quantification de protéines dans des fluides biologiques, jusqu'à 11-12 ordres de grandeur dans le sérum par exemple. En outre, le nombre de peptides générés pose souvent problème en termes de résolution instrumentale et

[296] [296] J. R. Barr, V. L. Maggio, D. G. Patterson, G. R. Cooper, L. O. Henderson, W. E. Turner, S. J. Smith, W. H. Hannon, L. L. Needham, E. J. Sampson, *Clin. Chem.* **1996**, *42*, 1676–1682
[297] A. Kraut, M. Marcellin, A. Adrait, L. Kuhn, M. Louwagie, S. Kieffer-Jaquinod, D. Lebert, C. D. Masselon, A. Dupuis, C. Bruley, M. Jaquinod, J. Garin, M. Gallagher-Gambarelli, *J. Proteome Res.* **2009**, *8*, 3778–3785
[298] C. G. Arsene, R. Ohlendorf, W. Burkitt, C. Pritchard, A. Henrion, D. M. Bunk, B. Güttler, *Anal. Chem.* **2008**, *80*, 4154–4160
[299] M. P. Hall, S. Ashrafi, I. Obegi, R. Petesch, J. N. Peterson, L. V. Schneider, *J. Mass Spectrom.* **2003**, *38*, 809–816
[300] M. P. Hall, L. V. Schneider, *Expert Rev. Proteomics* **2004**, *1*, 421–431

nécessite la plupart du temps des étapes de purification comme la chromatographie en phase inverse ou encore la chromatographie d'affinité. Il existe aussi les méthodes d'enrichissement pour contourner le problème de la limitation de la gamme dynamique. En revanche celles-ci peuvent être difficiles à mettre en place lorsque l'échantillon présente des composés isobares.

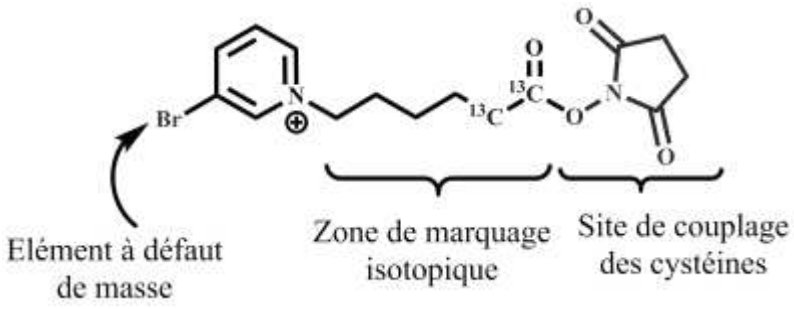


Figure 72 : Structure typique d'un marqueur IDBEST

Dans le cadre de la stratégie IDBEST, l'introduction d'atomes à haut défaut de masse va engendrer un déplacement des pics dans un spectre de masse du peptide contenant cet élément par rapport aux peptides ne contenant pas ce dernier et n'étant donc pas marqués. Ce déplacement est d'approximativement 0,1 u.m.a par atome présentant un défaut de masse. De tels écarts sont facilement caractérisables par des instruments avec une résolution supérieure à 10 000.[301] Grâce au développement de tels appareils, l'optimisation poussée des méthodes chromatographiques de séparation en amont de l'analyse par spectrométrie de masse n'est plus une priorité.

Une caractéristique supplémentaire des marqueurs IDBEST est la présence d'une charge positive dont l'objectif n'est autre que fournir une haute efficacité d'ionisation. Ceux-ci sont également composés d'un site réactif vis-à-vis des amines terminales d'acides aminés, d'un fragment incorporant le marquage isotopique et d'un atome de brome pour introduire le défaut de masse (voir Figure 72 p.113). Un grand intérêt de cette stratégie IDBEST est l'utilisation du brome ou d'autres éléments à haut défaut de masse qui sont aussi métalliques ou semi-métalliques et qui offrent une excellente réponse en ICP-MS. Cela permet de combiner de façon complémentaire ces deux approches. Plusieurs groupes de recherche ont démontré la mesure sensible d'espèces organiques bromées par ICP-MS couplée à une séparation chromatographique.[302,303,304] Dans cette optique l'ICP-MS pourrait être utilisée de façon complémentaire pour déterminer de manière absolue la quantité d'une protéine donnée via la mesure du contenu bromé de peptides.

[301] B. Domon, *Science* **2006**, *312*, 212–217
[302] A. P. Vonderheide, M. Montes-Bayón, J. A. Caruso, *J Anal Spectrom* **2002**, *17*, 1480–1485
[303] D. Pröfrock, P. Leonhard, S. Wilbur, A. Prange, *J Anal Spectrom* **2004**, *19*, 623–631
[304] B. Meermann, M. Bockx, A. Laenen, C. Van Looveren, F. Cuyckens, F. Vanhaecke, *Anal. Bioanal. Chem.* **2012**, *402*, 439–448

IV. Les techniques à base de marquage métabolique pour la quantification de peptides par SID

Après avoir largement discuté des approches par marquage chimique, nous allons nous intéresser aux techniques qui utilisent le marquage métabolique en recrutant des lignées cellulaires pour produire les biomolécules d'intérêt.

IV.A. L'introduction du marquage métabolique pour la quantification par SID : les approches SILAC et SILAP

Après les travaux de marquage de levures à ^{15}N dans le laboratoire de Chait, Ong et al. ont extrapolé le concept aux cellules de mammifère et l'ont baptisée SILAC (pour « Stable Isotope Labelling by amino acis in cell culture »),[305] qui constitue une méthode de marquage métabolique. Dans leur étude il a été question, non pas de marquer de façon uniforme par ^{15}N mais plutôt d'introduire des acides aminés marqués à ^{15}N et ^{13}C. Le principe est de faire croître une lignée cellulaire dans un milieu qui contiendra les acides aminés essentiels à la vie cellulaire ou bien dans un milieu contenant leurs équivalents marqués par ces isotopes comme $^{13}C_6{}^{15}N_2$-Lys ou $^{13}C_6{}^{15}N$-Leu par exemple. Les lignées marquées et non marquées sont ensuite mélangées avant de procéder à une analyse de type « bottom-up ».[306] Contrairement à la technique iTRAC et le marquage isobare, la technique SILAC affiche une différence de masse au niveau MS et non plus MS/MS. En revanche, les spectres de masse deviennent plus encombrés requérant des instruments à haute résolution.[307,308,309] De nombreux exemples viennent illustrer cette stratégie prometteuse de quantification,[310,311,312,313] dont une étude de Pan et al. dans laquelle ce dernier évalue l'altération de la phosphorylation lorsqu'une inhibition de kinase est enclenchée. Pour cela il a utilisée la méthode SILAC multiplexée en ayant recours à des milieux de culture cellulaire légers ($^{12}C_6$-Arg, $^{12}C_6$-Lys), lourds ($^{13}C_6{}^{15}N_4$-Arg, $^{13}C_6{}^{15}N_2$-Lys) et intermédiaires ($^{13}C_6$-Arg, $^{2}H_4$-Lys).[314] De cette manière il a été possible de mesurer des milliers de peptides phosphorylés à partir des trois populations différentes de cellules SILAC qui ont été exposées à un traitement de contrôle, un stimulus par EGF (pour « Epidermal Growth Factor ») ou en présence d'inhibiteur de kinase. L'expérimentation débute par une étape de fractionnement

[305] S.-E. Ong, *Mol. Cell. Proteomics* **2002**, *1*, 376–386
[306] Ong SE, Mann M., *Methods Mol. Biol.*, **2007**, *359*, 37–52
[307] J. Zhang, G. McCombie, C. Guenat, R. Knochenmuss, *Drug Discov. Today* **2005**, *10*, 635–642
[308] J. Graumann, N. C. Hubner, J. B. Kim, K. Ko, M. Moser, C. Kumar, J. Cox, H. Scholer, M. Mann, *Mol. Cell. Proteomics* **2007**, *7*, 672–683
[309] J. D. Venable, J. Wohlschlegel, D. B. McClatchy, S. K. Park, J. R. Yates, *Anal. Chem.* **2007**, *79*, 3056–3064
[310] M. Gronborg, *Mol. Cell. Proteomics* **2005**, *5*, 157–171
[311] A. K. Yocum, C. M. Busch, C. A. Felix, I. A. Blair, *J. Proteome Res.* **2006**, *5*, 2743–2753
[312] W. Luo, R. J. Slebos, S. Hill, M. Li, J. Brábek, R. Amanchy, R. Chaerkady, A. Pandey, A.-J. L. Ham, S. K. Hanks, *J. Proteome Res.* **2008**, *7*, 3447–3460
[313] A. Guo, J. Villen, J. Kornhauser, K. A. Lee, M. P. Stokes, K. Rikova, A. Possemato, J. Nardone, G. Innocenti, R. Wetzel, Y. Wang, J. MacNeil, J. Mitchell, S. P. Gigy, J. Rush, R. D. Polakiewicz, M. J. Comb, *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2008**, *105*, 692–697
[314] C. Pan, J. V. Olsen, H. Daub, M. Mann, *Mol. Cell. Proteomics* **2009**, *8*, 2796–2808

puis d'enrichissement des peptides phosphorylés. Les différentes fractions obtenues ont été analysées par LC-MS pour obtenir la carte d'identité des trois protéomes. De cette façon, les différentes phosphorylations ont été classées entres les 3 catégories contrôle, stimulus par EGF et stimulus par EGF couplé à une inhibition de kinase.

Une critique récurrente faite lorsque l'on compare stratégie de marquage chimique et métabolique est le fait que seul le marquage chimique soit applicable à l'analyse de sources primaires de biomatériel comme les fluides biologiques ou encore les tissus selon le protocole décrit ci-dessus. C'était sans compter sur l'opiniâtreté du laboratoire de Blair qui a démontré l'utilité d'un protéome marqué par la technique SILAC comme étalon de référence utilisable avec n'importe quelle source de matériel. La technique SILAP (pour « Stable Isotope-Labelled Proteome ») était née. La démonstration du concept a été la publication par Yu et al. en 2009.[315] Celle-ci présentait le marquage SILAC d'une lignée cellulaire de cancer pancréatique suivi par la collecte des protéines des milieux de culture. Par la suite ce proteome marqué aux isotopes, le SILAP, a été introduit comme étalon à des sérums concentrés de cancer pancréatique ou contrôles. De cette expérimentation est ressortie le constat d'une différence d'expression sur près de 100 biomarqueurs différents et validés indépendamment. Cette approche a été ensuite étendue par Rangiah et al. qui a développé une méthode combinant la MRM et un étalon SILAP pour l'étude de biomarqueurs chez la souris Apcmin, utilisée comme modèle biologique pour le cancer du colon.[316] La totalité des 12 biomarqueurs ont été mesurés avec des différences d'expression, résultats validés par la suite par analyse Western blot pour 5 d'entre eux. La versatilité de la méthode a ensuite été démontrée par Shah et al. qui a rassemblé les sécrétomes marqués par SILAC de cellules épithéliales humaines vaginales et endocervicales. Ceci a permis de proposer une quantification relative et une caractérisation des protéines d'un prélèvement prénatal de liquide cervicovaginal. Les résultats très prometteurs ont montré le niveau particulièrement élevé de trois protéines au niveau prénatal, construisant ainsi un socle solide pour des validations avancées.[317] En outre, la restriction des analyses à des protéines surexprimées dans les modèles cellulaires rend possible l'exclusion de protéines de phase aigüe[318] et d'autres protéines abondantes dans le sérum ou le liquide cervicovaginal tout en se concentrant simultanément sur des protéines d'intérêt pour la maladie considérée.

[315] K. H. Yu, C. G. Barry, D. Austin, C. M. Busch, V. Sangar, A. K. Rustgi, I. A. Blair, *J. Proteome Res.* **2009**, *8*, 1565–1576
[316] K. Rangiah, M. Tippornwong, V. Sangar, D. Austin, M.-P. Tétreault, A. K. Rustgi, I. A. Blair, K. H. Yu, *J. Proteome Res.* **2009**, *8*, 5153–5164
[317] S. J. Shah, K. H. Yu, V. Sangar, S. I. Parry, I. A. Blair, *J. Proteome Res.* **2009**, *8*, 2407–2417
[318] Protéines liées à une inflammation dont la production par le foie est soit inhibée soit favorisée.

IV.B. Le marquage métabolique et les approches de type « bottom-up »

De manière générale et quelle que soit la méthode, les techniques de quantification par SID affichent de bons coefficients de régression linéaire et une bonne précision. Il existe deux méthodes à l'heure actuelle qui utilisent le marquage métabolique et qui sont capables de proposer une quantification fiable de protéines ciblées selon une approche « bottom-up » : la technique QconCAT (voir Figure 73 p.117), qui fait appel à des peptides chimériques protéotypiques ajoutés après l'étape de fractionnement d'un mélange de protéines et la technique PSAQ qui a recours des protéines entières marquées et introduites en tout début de processus. La première consiste en la production de peptides chimériques marqués par un isotope avant l'étape de digestion enzymatique (voir Figure 73 p.117) tandis que la seconde, quant à elle, consiste en un marquage d'une protéine entière par un isotope.

	Peptides concaténés QconCAT	Etalons PSAQ	Peptides AQUA
Justesse de la mesure	- à +++	+++	- à +++
Précision de la mesure	+++	+++	+++
Evaluation de l'achèvement de la digestion trypsique	Nécessaire	Non nécessaire[319]	Nécessaire
Compatibilité avec le pré fractionnement	-	+++	-
Discriminabilité de variations/isoformes	- à +	++	- à +
Etude de complexes de protéines (stoechiométrie du partenaire)	++	++	- à +
Quantification de PTM	Impossible	Impossible	+++ (phosphorylation)

Tableau 10 : Forces et limitations des étalons pour SID pour la quantification absolue de protéines. - : faible ; + : bonne ; ++ très bonne ; +++ : excellente

L'approche QconCAT (pour « Quantification conCATamers ») a été développée par Beynon et al en 2005[320] et reprise par Mirzaei et al en 2007.[321] Dans cette dernière étude des étalons peptidiques ont été utilisés en tant qu'étalon pour la mesure de protéines, comme pour la technique AQUA. La spécificité de l'approche QconCAT réside dans le fait d'utiliser des peptides chimériques, c'est-à-dire des assemblages de peptides protéotypiques marqués par un isotope. Ceux-ci sont obtenus grâce à un système bactérien de transcription/traduction dans lequel est introduit un plasmide permettant l'expression du peptide chimérique. On parlera alors de synthèse et de marquage métabolique qui permet d'accroître considérablement le nombre de peptides protéotypiques atteignables comme des peptides hydrophobes ou contenant des résidus instables dans les conditions de synthèse en laboratoire. Pour obtenir les peptides marqués, l'équipe a

[319] Si l'étalon se replie selon la même structure que l'analyte.
[320] R. J. Beynon, M. K. Doherty, J. M. Pratt, S. J. Gaskell, *Nat. Methods* **2005**, *2*, 587–589
[321] H. Mirzaei, J. K. McBee, J. Watts, R. Aebersold, *Mol. Cell. Proteomics* **2007**, *7*, 813–823

procédé à une culture cellulaire dans un milieu contenant des acides aminés marqués par des isotopes, à savoir $^{13}C_6{}^{15}N_2$-Lys et $^{13}C_6{}^{15}N_4$-Arg. De cette manière, 25 peptides protéotypiques ont été assemblés. Malgré cette performance, la technique souffre des mêmes sources d'erreur que l'approche AQUA, liée à l'introduction de ces peptides chimériques voués à subir une digestion enzymatique. Les peptides concaténés sont, de façon similaire aux peptides AQUA, ajoutés après l'étape de pré fractionnement mais avant digestion enzymatique, car étant constitués de plusieurs peptides protéolytiques ils ont besoin de cette étape pour pouvoir rendre possible la quantification de la(les) protéine(s) cible(s). Le fait de pouvoir inclure plusieurs sous-unités peptidiques de cette manière est très avantageux et peut permettre de réduire les coûts en allant jusqu'à l'incorporation de 50 peptides.[322] Cela impacte directement la robustesse de la méthode car il est alors possible de quantifier avec une plus grande fiabilité une protéine avec un nombre important de peptides protéotypiques. Au final, dès que le gène codant pour le peptide chimérique d'intérêt a été cloné, le grand avantage de cette méthode réside dans la production et le marquage de ce dernier qui deviennent très rapide et intéressant pour des études à large échelle ou dans un grand nombre de laboratoires par exemple.

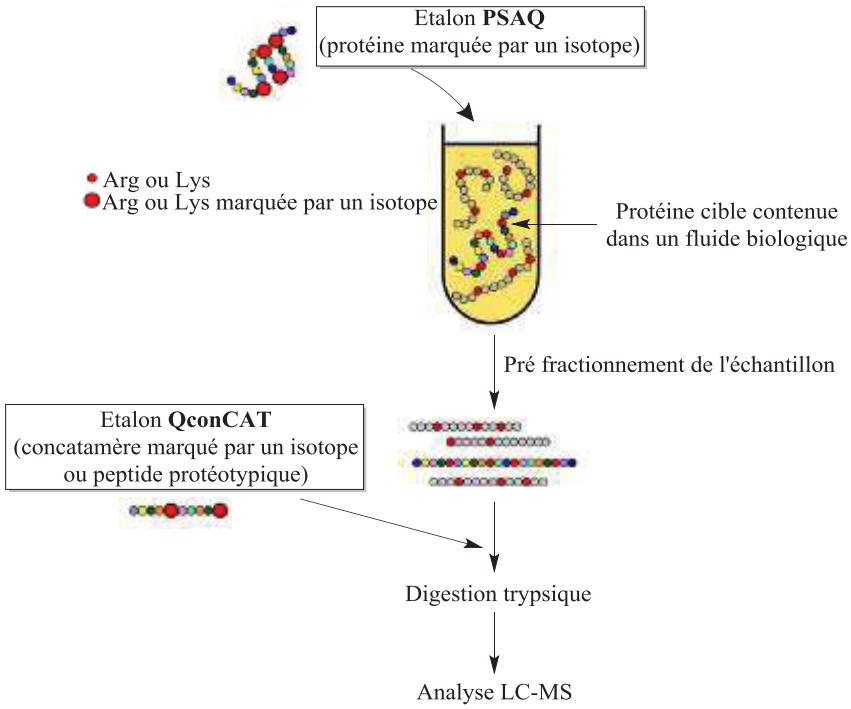


Figure 73 : Stratégies de dilution isotopique pour de la quantification de protéines par spectrométrie de masse. Il existe trois modes de quantification de protéines suivant une approche « bottom – up » dans un fluide biologique par marquage métabolique, dont deux sont présentées ici : A- PSAQ pour « Protein Standard Absolute Quantification », il s'agit d'une version de la protéine cible marquée par un isotope et ajoutée directement à l'échantillon. B- QconCAT pour « Quantification concatamer », il s'agit d'une protéine chimérique qui contient un ou plusieurs peptides protéotypiques de la protéine cible marqués par des isotopes. Le peptide concaténé est ajouté avant l'étape de digestion pour que l'(les)étalon(s) soit(ent) relargué(s) dans l'échantillon

[322] J. Rivers, D. M. Simpson, D. H. L. Robertson, S. J. Gaskell, R. J. Beynon, *Mol. Cell. Proteomics* **2007**, *6*, 1416–1427

L'utilisation de peptides chimériques est puissante car cela permet l'obtention de multiples peptides protéotypiques marqués de façon simultanée après digestion enzymatique qui peuvent ensuite être tous comparés à leur équivalent non marqué issus de la protéine d'intérêt. L'ennui avec les peptides QconCAT est l'absence de conformation particulière car cela engendre une digestion enzymatique plus rapide que la protéine cible et par conséquent un fort biais lors de la quantification, étape qui, comme pour les peptides AQUA doit être contrôlée à cause de cette différence de protéolyse. Pour surmonter ce problème, Kito et al. ont astucieusement cernés les peptides protéotypiques au sein même du peptide concaténé par leurs séquences voisines à l'état naturel, permettant ainsi de fortement réduire les biais dûs à la digestion enzymatique et obtenir des rendements de digestion similaires.[323] Cependant, l'étude insiste sur le fait que, quel que soit le peptide utilisé, une attention toute particulière doit être accordée à la validation de la méthode et la précision de celle-ci. En effet, l'étalonnage des peptides QconCAT est un enjeu important de la méthode d'analyse pour assurer une quantification juste et précise en fin d'expérimentation. C'est dans ce but qu'est utilisée la technique AAA (pour « Amino Acid Analysis »). Cette méthode consiste en une étape d'hydrolyse acide du peptide considéré sous activation thermique (110 - 165 °C). Par la suite, les acides aminés sont séparés par une colonne échangeuse d'ions et directement détectés ensuite par ampérométrie ou mesure UV.[324,325] Une fois que la mesure a été effectuée, seuls des contrôles de qualités de routine sont à prévoir.

La seconde approche considérée a été baptisée PSAQ pour « Protein Standard Absolute Quantification ».[326] Lorsque l'on considère la quantité phénoménale de protéines dans certains échantillons biologiques et surtout dans des fluides biologiques extraits d'organismes vivants, le pré fractionnement devient incontournable pour parvenir à détecter des protéines faiblement abondantes.[327] Dans cette situation l'étalon idéal pour une protéine donnée est d'avoir le même comportement que la cible pendant l'étape d'analyse. Ceci dans le but de limiter tout biais qui serait lié à l'ionisation des composés ou à leur comportement vis-à-vis de la fragmentation. De plus l'étalon idéal possède également un comportement similaire pendant l'étape pré analytique correspondant au traitement et à la manipulation des échantillons, là aussi dans le but de limiter le plus possible les sources de variabilité. Ainsi le choix d'un équivalent de la protéine cible entièrement marquée avec un ou plusieurs isotopes est tout à fait pertinent. Elle sera ensuite introduite en tout début de manipulation de l'échantillon marqué, en l'occurrence, par les acides aminés [$^{13}C_6$,$^{15}N_2$] L-lysine et

[323] K. Kito, K. Ota, T. Fujita, T. Ito, *J. Proteome Res.* **2007**, *6*, 792–800
[324] A. P. Clarke, P. Jandik, R. D. Rocklin, Y. Liu, N. Avdalovic, *Anal. Chem.* **1999**, *71*, 2774–2781
[325] P. Jandik, A. P. Clarke, N. Avdalovic, D. C. Andersen, J. Cacia, *J. Chromatogr. B. Biomed. Sci. App.* **1999**, *732*, 193–201
[326] V. Brun, A. Dupuis, A. Adrait, M. Marcellin, D. Thomas, M. Court, F. Vandenesch, J. Garin, *Mol. Cell. Proteomics* **2007**, *6*, 2139–2149
[327] X. Fang, W.-W. Zhang, *J. Proteomics* **2008**, *71*, 284–303

[$^{13}C_6$,$^{15}N_4$]L-arginine. Ces derniers sont incorporés dans la protéine grâce à des kits tels que le kit RTS 500 ProteoMaster *Escherichia coli* HY qui, combiné à l'introduction de plasmides, permet sa synthèse sachant que des systèmes bactériens peuvent également être utilisés.[328] La technique a été développée par Brun et al en 2007 et comparée aux deux précédentes techniques, à savoir AQUA et QconCAT, afin d'en extraire les avantages et inconvénients.

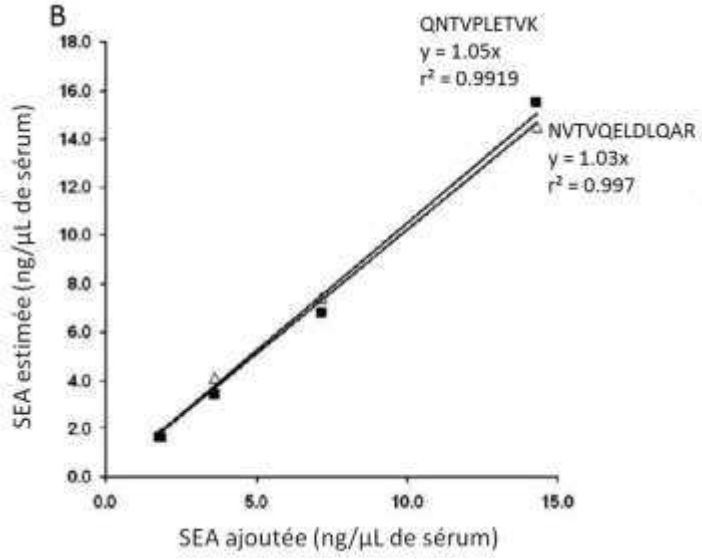


Figure 74 : Quantification de la SEA (pour « Staphylococcal Enterotoxin A ») à partir du chromatogramme des ions extraits pour chaque paire des deux peptides sélectionnés pour le suivi en LC-MS par MRM. Le graphique représente les quantités estimées de SEA en fonction des quantités ajoutées[329]

L'étude a porté sur des toxines de staphylocoques synthétisées et marquées par un isotope. Il est apparu que l'approche PSAQ était bien plus juste que ces deux concurrentes sur ce cas précis, et surtout qu'elle ne sous-estimait pas les quantités de toxines. En outre, le suivi de deux peptides protéotypiques entraîne une mesure juste et une quantification robuste du fait de plusieurs points :

- L'absence de dispersion des rendements de digestion enzymatique entre l'étalon et l'analyte grâce à leur similarité de structure. C'est un point capital étant donné que la digestion trypsique est connue pour être incomplète et non spécifique.[330]
- La compatibilité avec n'importe quel type de fractionnement pré opératoire pourvu que la protéine cible naturelle et l'étalon choisi partagent les mêmes propriétés biochimiques mises en jeu dans le processus de séparation. On peut citer parmi ces techniques de séparation la méthode SDS-PAGE, la capture de protéines hydrophobes ou encore l'immunocapture.[331,332]

[328] S. Hanke, H. Besir, D. Oesterhelt, M. Mann, *J. Proteome Res.* **2008**, *7*, 1118–1130
[329] V. Brun, C. Masselon, J. Garin, A. Dupuis, *Journal of Proteomics* **2009**, *72*, 740–749
[330] P. Picotti, R. Aebersold, B. Domon, *Mol. Cell. Proteomics* **2007**, *6*, 1589–1598
[331] A. Dupuis, J.-A. Hennekinne, J. Garin, V. Brun, *PROTEOMICS* **2008**, *8*, 4633–4636
[332] V. Brun, A. Dupuis, A. Adrait, M. Marcellin, D. Thomas, M. Court, F. Vandenesch, J. Garin, *Mol. Cell. Proteomics* **2007**, *6*, 2139–2149

- La compatibilité de la méthodologie avec l'élimination des protéines de sérum en forte abondance. Cela a été démontré au cours d'expériences de titrage effectuées sur l'entérotoxine A de staphylocoque dans du sérum humain. Cette immunoélimination est effectuée grâce à des anticorps contenus dans des cartouches, en l'occurrence des cartouches MARS d'Agilent Technologies©. L'avantage de ces travaux réside dans le fait que la SEA n'est pas présente naturellement dans le sérum humain, ce qui en fait, *de facto*, une matrice exempte de contamination et particulièrement adaptée pour les mesures de l'étude.

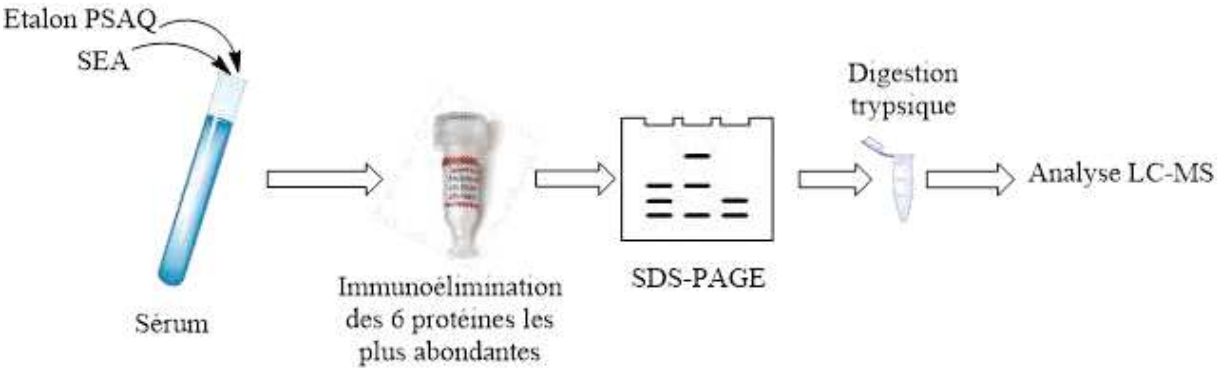


Figure 75 : Protocole opératoire utilisé pour démontrer la compatibilité de la stratégie PSAQ avec l'immunoélimination. Pour cela la SEA a été ajoutée avec une quantité connue d'étalon PSAQ dans des échantillons avant de subir l'immunoélimination

Cette méthodologie est également séduisante pour son comportement face aux interférences comme la compétition à l'ionisation. En effet, si un tel phénomène devait se produire avec un peptide, la technique PSAQ offre la possibilité de passer rapidement au suivi d'un autre peptide issu de digestion trypsique. A noter que pour un étalon PSAQ donné, il est toujours possible de recourir à une autre enzyme de digestion. En effet, grâce au marquage par deux acides aminés basiques chaque peptide issu de la digestion enzymatique possèdera au moins un acide aminé sous sa forme dite lourde à condition que l'enzyme choisie coupe au niveau des résidus basiques. De cette étape de digestion et ses nombreuses possibilités découle une qualité de la technique PSAQ, à savoir l'accès à un recouvrement de séquence important et par voie de conséquence, la possibilité de différencier des isoformes ou des variantes de protéines (voir Tableau 10 p.116).[333]

Cependant, et malgré ses qualités, la PSAQ nécessite tout de même une étape d'étalonnage qui est effectuée par AAA (pour « Amino Acid Analysis »)[334] de la même manière que ce qui est prévu pour les peptides QconCAT.

Cette technique ne quantifiait pas les PTMs telles que la phosphorylation, étant une modification facilement éliminable par hydrolyse ; en revanche, concernant les PTMs stables telles

[333] D. J. Janecki, K. G. Bemis, T. J. Tegeler, P. C. Sanghani, L. Zhai, T. D. Hurley, W. F. Bosron, M. Wang, *Anal. Biochem.* **2007**, *369*, 18–26
[334] Determination of the Amino Acid Content of Peptides by AAA-Direct, Dionex, Technical note 50, Thermo Scientific

que les glycosylations, il est toutefois possible de les inclure dans les étalons PSAQ grâce à des systèmes dédiés pour leur expression. C'était sans compter sur l'implication du laboratoire de Blair qui a réussi à mettre au point un étalon PSAQ modifié pour correspondre à la protéine naturelle ayant subi une PTM, en l'occurrence une phosphorylation.[335] Les deux études conduites par Ciccimaro et al. ont été les premières à se servir d'une protéine complète phosphorylée par PTM et marquée par des isotopes, fournissant ainsi des données inatteignables par les autres techniques existantes. L'objectif de la première étude était la phosphorylation de la tyrosine kinase Src[336] par la FAK (pour « human Focal Adhesion Kinase ») à l'intérieur même de la zone catalytique de cette dernière. A cette fin, les deux protéines ont été synthétisées par voie métabolique *in vitro* à la fois sous forme phosphorylée et marquée aux isotopes. Dans un premier temps la quantité de protéine FAK a été mesurée sous forme native et sous forme phosphorylée grâce à des étalons peptidiques, permettant ainsi l'accès à la quantité de Scr phosphorylée par rapport à sa forme native. Cela étant fait dans des conditions métaboliques normales, c'est-à-dire sans ajout d'aucun médicament pouvant affecter le métabolisme, il est alors devenu possible des suivre, dans la seconde étude, l'influence de l'inhibition de la kinase Src sur des cultures cellulaires.[337] Récemment, la technique PSAQ et le suivi par SIM/SIR (pour « Single Ion Monitoring » ou « Single Ion Recording ») a été combinée avec un appareil de type LTQ-orbitrap par Hanke et al. en 2008. Cela leur a permis de quantifier une protéine liée au maltose à des quantités infimes, de l'ordre de la centaine d'attomole.[338]

Une autre application élégante de la technique PSAQ a été publiée par Heudi et al. pour la quantification d'un anticorps de manière juste et précise, et ce malgré des pertes impressionnantes de matériel de 72 % sur tout le traitement de l'échantillon dont 32 % sur la seule digestion enzymatique.[339] La comparaison entre l'analyse par spectrométrie de masse et le test ELISA a montré une surestimation des valeurs obtenues par LC-MS/MS d'un facteur 1,6 environ. Après avoir effectué des tests de digestion enzymatique sur une solution type contenant un complexe rendant l'anticorps inaccessible pour le test ELISA, l'équipe a montré que 80 % de la quantité totale d'anticorps était récupérée à partir du complexe, c'est-à-dire la forme libre ou active de celui-ci. Cela a permis de démontrer le fait que le test ELISA n'est pas capable de comptabiliser seule une forme active ou libre d'un anticorps, rendant ainsi la technique PSAQ très séduisante pour des tests cliniques en mettant en valeur son avantage, surtout dans les cas où des anticorps seraient « piégés ». Une des limitations de cette méthode, en revanche, est son coût et la certaine difficulté à produire des étalons

[335] E. Ciccimaro, S. K. Hanks, K. H. Yu, I. A. Blair, *Anal. Chem.* **2009**, *81*, 3304–3313
[336] Tyrosine kinase impliquée dans la voie de signalisation de nombreux récepteurs membranaires comme les récepteurs à tyrosine kinase et les GPCR.
[337] E. Ciccimaro, S. K. Hanks, I. A. Blair, *Mol. Pharmacol.* **2009**, *75*, 658–666
[338] S. Hanke, H. Besir, D. Oesterhelt, M. Mann, *J. Proteome Res.* **2008**, *7*, 1118–1130
[339] O. Heudi, S. Barteau, D. Zimmer, J. Schmidt, K. Bill, N. Lehmann, C. Bauer, O. Kretz, *Anal. Chem.* **2008**, *80*, 4200–4207

protéiques. Cependant, une importante quantité de protéines ont déjà été synthétisées et purifiées en génomique structurelle avec des taux de production/purification pour des protéines d'eurkaryotes et de bactéries de 30 % et 19 % respectivement.[340]

Au final, pour tous ses avantages et malgré ses limites, la technique PSAQ fait désormais office de méthode de référence pour la quantification de protéines, en particulier pour ce type de mélange complexe ou de fluide biologique.[341] D'un autre côté, la méthodologie QconCAT affiche l'avantage principal du multiplexage pour la quantification de protéines d'autant plus qu'une fois les gènes clonés, des expérimentations ou tests de routine peuvent être aisément mis au point et qu'un grand nombre de peptides protéotypiques peuvent être inclus tout en prenant en compte l'astuce de Kito et al. d'encadrer ces derniers par leur séquences voisines à l'état naturel pour fiabiliser les tests. De cette manière les échanges peuvent être grandement facilités entre laboratoires.

V. La quantification de peptides par les approches label-free

Dans ce paragraphe nous allons aborder les approches de type « label-free » qui n'impliquent pas de marquage isotopique des biomolécules, mais visent à remarquer des singularités concernant ces biomolécules parmi un ensemble très vastes de mesures.

La quantification par approche « label-free » peut être utilisée comme alternative bon marché à une méthode de marquage isotopique. Malheureusement, cette dernière ne permet pas de multiplexer les analyses comme c'est le cas avec la méthodologie SID en marquage métabolique (e.g : SILAC) ou chimique (e.g : iTRAQ) et requiert donc une analyse en mode MS séparée pour chaque échantillon, ce qui peut tendre à augmenter les variations et donc à faire perdre en précision, voir en justesse. Ce type d'erreur a tendance à augmenter à cause du traitement et à l'élution chromatographique de l'échantillon sujet à variations. Les méthodes label-free cherchent à comparer deux expérimentations ou plus, soit en comparant directement l'aire du signal MS pour n'importe quel peptide, soit en utilisant le nombre de correspondances peptides/protéine acquises comme un indicateur de leurs proportions respectives dans un échantillon donné.[342]

Actuellement, il existe deux stratégies de quantification dites « label-free » fondamentalement différentes (voir Figure 76 p.123) :

1. La mesure et la comparaison des aires des signaux en mode MS d'un ion issu d'un peptide précurseur faisant partie d'une protéine donnée.[343]

[340] Graslund S, Nordlund P, Weigelt J, Hallberg BM, Bray J, GileadiO., *Nat Methods*, **2008,** *5*, 135–146
[341] O. Heudi, S. Barteau, D. Zimmer, J. Schmidt, K. Bill, N. Lehmann, C. Bauer, O. Kretz, *Anal. Chem.* **2008**, *80*, 4200–4207
[342] K. A. Neilson, N. A. Ali, S. Muralidharan, M. Mirzaei, M. Mariani, G. Assadourian, A. Lee, S. C. van Sluyter, P. A. Haynes, *PROTEOMICS* **2011**, *11*, 535–553
[343] M. Bantscheff, M. Schirle, G. Sweetman, J. Rick, B. Kuster, *Anal. Bioanal. Chem.* **2007**, *389*, 1017–1031

2. Le décompte et la comparaison d'un grand nombre de spectres de fragmentation qui permettent d'identifier un peptide faisant partie d'une protéine donnée.

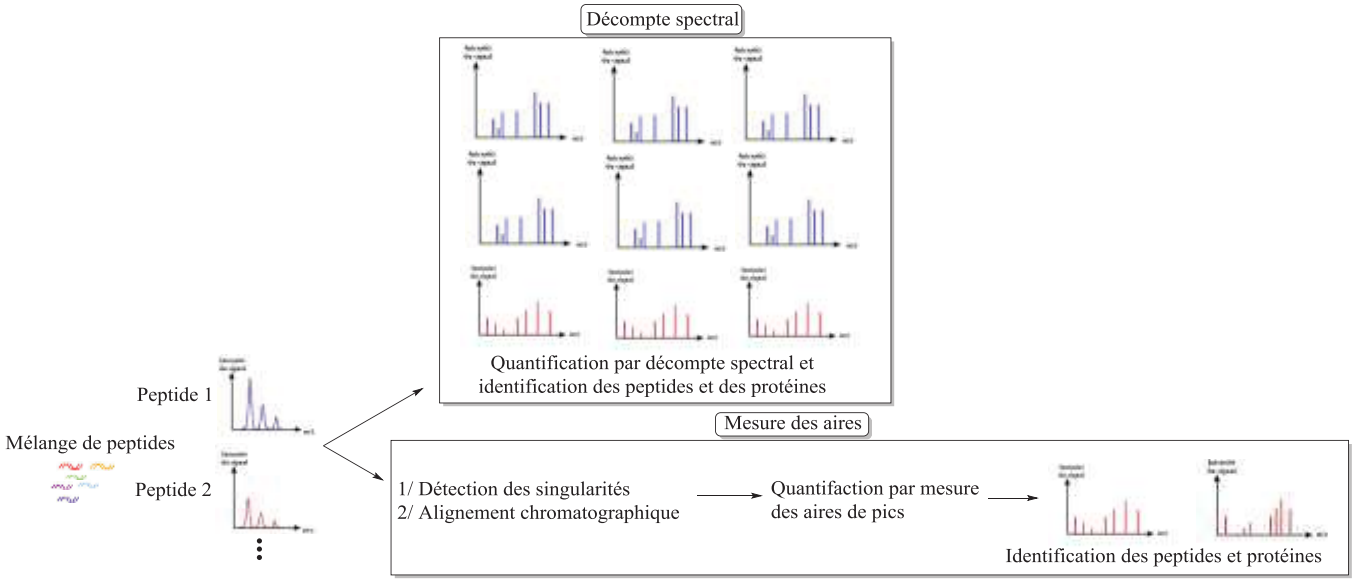


Figure 76 : Représentation des deux approches principales en protéomique label-free. La quantification par mesure d'aire est effectuée au niveau MS tandis que la MS/MS sert à l'identification des peptides dont l'abondance est modifiée entre les différents échantillons. Le décompte spectral, quant à lui, quantifie et identifie les peptides de manière simultanée au niveau MS/MS

V.A. La mesure des aires de signaux MS

En ce qui concerne la première approche, présentée en 2002 par Bondarenko et al.,[344] les chromatogrammes des ions sont extraits pour chaque peptide à partir des données de LC-MS/MS et les aires de pics sont intégrées tout au long de l'élution chromatographique.[345,346] Dans le cas de spectres à basse résolution, ce type d'opération est réalisé par l'édition d'un chromatogramme d'ion extrait (XIC pour « eXtracted Ion Current ») pour un rapport m/z déterminé précisément pour chaque peptide. Plus récemment, le concept a été étendu aux données à haute résolution pour inclure la contribution du ^{13}C à l'ensemble des aires prises en compte.[347] Cette valeur d'aire obtenue pour chaque peptide en une expérimentation peut par la suite être comparée au même signal obtenu en une ou plusieurs autres expérimentations pour obtenir une donnée quantitative à propos du peptide d'intérêt.[348,349,350,351] Dans le cadre des analyses en protéomique de mélanges complexes de peptides, il existe trois points expérimentaux particulièrement importants vis-à-vis de la justesse de la

[344] P. V. Bondarenko, D. Chelius, T. A. Shaler, *Anal. Chem.* **2002**, *74*, 4741–4749
[345] H.-Y. Tang, L. A. Beer, K. T. Barnhart, D. W. Speicher, *J. Proteome Res.* **2011**, *10*, 4005–4017
[346] S. D. Sherrod, M. V. Myers, M. Li, J. S. Myers, K. L. Carpenter, B. MacLean, M. J. MacCoss, D. C. Liebler, A.-J. L. Ham, *J. Proteome Res.* **2012**, *11*, 3467–3479
[347] M. Ono, *Mol. Cell. Proteomics* **2006**, *5*, 1338–1347
[348] W. Wang, H. Zhou, H. Lin, S. Roy, T. A. Shaler, L. R. Hill, S. Norton, P. Kumar, M. Anderle, C. H. Becker, *Anal. Chem.* **2003**, *75*, 4818–4826
[349] M. C. Wiener, J. R. Sachs, E. G. Deyanova, N. A. Yates, *Anal. Chem.* **2004**, *76*, 6085–6096
[350] R. E. Higgs, M. D. Knierman, V. Gelfanova, J. P. Butler, J. E. Hale, *J. Proteome Res.* **2005**, *4*, 1442–1450
[351] G. Wang, W. W. Wu, W. Zeng, C.-L. Chou, R.-F. Shen, *J. Proteome Res.* **2006**, *5*, 1214–1223

quantification par les aires des pics. Premièrement le spectromètre de masse : Il est intéressant de recourir à un instrument qui propose une excellente justesse en masse en raison de l'influence de signaux interférents de masse similaire mais toutefois distincte. Cela permet de minimiser l'interférence en question. Deuxièmement, le profil chromatographique du peptide d'intérêt doit être optimisé et reproductible pour faciliter la recherche des peptides correspondant entre différentes expérimentations. Ce n'est pas une tâche évidente comme il y paraît et c'est la raison pour laquelle des logiciels ont été développés pour procéder à un alignement des chromatogrammes avant l'identification des peptides.[352,353,354] Enfin, il doit y avoir un équilibre entre les acquisitions destinées à l'identification des peptides et les spectres de fragmentation. Le fait est qu'un séquençage de peptides par spectrométrie de masse en tandem est nécessaire à l'identification d'autant de protéines que possible dans des mélanges complexes, alors qu'une quantification robuste par mesure d'aires nécessite de multiples spectres. Typiquement, un grand nombre de spectres de fragmentation sont acquis pour chaque spectre d'identification à des vitesses extrêmement rapides allant de 0,2 s/spectre pour les pièges à ions à 1-3 s/spectre pour les quadripôles. Etant donné le fait que les largeurs de pics chromatographiques sont de l'ordre de 10 à 30 secondes pour une séparation nano-LC, les trappes à ions montrent un avantage certain par rapport aux Q-ToF car un nombre beaucoup plus important de cycles de mesure MS versus mesure en mode MS/MS peut être effectué pendant l'élution chromatographique.

Cependant, même si le nombre d'acquisitions peut être grandement augmenté, une meilleure justesse de mesure amènera de façon certaine à un recouvrement de séquence protéique plus faible et vice-versa. Ce dilemme a conduit plusieurs laboratoires à effectuer deux séries d'expérimentations qui, pour la première, se focalise sur l'identification d'un maximum de peptides en mode MS/MS tandis que la seconde est vouée à l'optimisation de l'échantillonnage de signaux intacts de peptides en mode MS. Dans ce type d'approche, la corrélation entre l'intégration des aires des pics et les peptides identifiés est possible en combinant le temps de rétention du peptide d'intérêt et sa masse précise.[355,356,357] De façon assez évidente, le traitement d'autant de données est source de défis d'autant plus qu'un grand nombre de spectres de fragmentation montrent de nombreux ions de séquence provenant de multiples peptides, chacun contribuant différemment au contenu spectral final. Une alternative pour contourner ce problème a été proposée ; elle consiste en

[352] D. Bylund, R. Danielsson, G. Malmquist, K. E. Markides, *J. Chromatogr. A* **2002**, *961*, 237–244
[353] P. Wang, H. Tang, M. P. Fitzgibbon, M. Mcintosh, M. Coram, H. Zhang, E. Yi, R. Aebersold, *Biostatistics* **2007**, *8*, 357–367
[354] N. Jaitly, M. E. Monroe, V. A. Petyuk, T. R. W. Clauss, J. N. Adkins, R. D. Smith, *Anal. Chem.* **2006**, *78*, 7397–7409
[355] E. F. Strittmatter, P. L. Ferguson, K. Tang, R. D. Smith, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **2003**, *14*, 980–991
[356] J. C. Silva, R. Denny, C. A. Dorschel, M. Gorenstein, I. J. Kass, G.-Z. Li, T. McKenna, M. J. Nold, K. Richardson, P. Young, S. Geromanos, *Anal. Chem.* **2005**, *77*, 2187–2200
[357] J. S. D. Zimmer, M. E. Monroe, W.-J. Qian, R. D. Smith, *Mass Spectrom. Rev.* **2006**, *25*, 450–482

l'arrêt des cycles « analyse MS/analyse MS/MS » pour se tourner vers la détection et la fragmentation simultanées des peptides dans une fenêtre chromatographique donnée en alternant rapidement entre des conditions de haute et basse énergie à l'intérieur même du spectromètre de masse.[358,359,360, 361]

V.B. Le décompte spectral

La seconde approche a été développée plus récemment.[362] Elle se base sur l'observation empirique selon laquelle plus une protéine donnée sera présente en quantité importante dans un échantillon et plus grand sera le nombre de spectres de fragmentation collectés pour les peptides de la protéine en question. Par conséquent, la quantification relative peut être effectuée en comparant le nombre de spectres obtenus de cette manière entre séries d'expérimentations. A l'inverse de la quantification par mesure d'aires, le décompte de spectres bénéficie d'une acquisition importante de données pendant la durée d'une élution chromatographique à la fois pour l'identification et la quantification de la protéine d'intérêt. En revanche, l'exclusion dynamique d'ions ayant déjà été sélectionnés, procédure usuelle en quantification « label-free », se fait au détriment d'une quantification juste et précise.[363] Cette méthode est très intuitive et séduisante en termes pratiques. Cependant l'approche par décompte de spectres est toujours très controversée à cause de l'absence de mesure directe d'aucune propriété physique d'un peptide donné. Elle atteste même que la linéarité de la réponse est identique pour toutes les protéines. En réalité, la réponse spectrale est différente pour chaque peptide du fait, tout d'abord, du comportement chromatographique de celui-ci (temps de rétention, largeur de pic) qui varie pour chaque composé ; deuxièmement cette réponse va évoluer en fonction de l'efficacité d'ionisation qui peut varier. En conséquence de quoi, et dans l'optique de fournir une quantification raisonnable d'une protéine, il est nécessaire de fournir un grand nombre de spectres, même pour une seule protéine. En effet, Old et al. ont montré en 2005 que, même s'il était possible de détecter une variation quantitative d'un facteur trois d'une protéine donnée avec seulement quatre spectres, ce nombre augmentait exponentiellement si l'on souhaitait quantifier des variations plus faibles (e.g : 15 spectres pour une variation d'un facteur deux). A cet instant d'autres complications entrent en jeu comme les effets de saturation qui peuvent être observés pour un grand nombre d'acquisition de spectres tout en sachant que le niveau de saturation sera différent pour chaque protéine étudiée.

---

[358] R. H. Bateman, R. Carruthers, J. B. Hoyes, C. Jones, J. I. Langridge, A. Millar, J. P. C. Vissers, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **2002**, *13*, 792–803
[359] T. Nakamura, N. Dohmae, K. Takio, *PROTEOMICS* **2004**, *4*, 2558–2566
[360] R. Niggeweg, T. Köcher, M. Gentzel, A. Buscaino, M. Taipale, A. Akhtar, M. Wilm, *PROTEOMICS* **2006**, *6*, 41–53
[361] J. C. Silva, *Mol. Cell. Proteomics* **2005**, *5*, 589–607
[362] H. Liu, R. G. Sadygov, J. R. Yates, *Anal. Chem.* **2004**, *76*, 4193–4201
[363] W. M. Old, *Mol. Cell. Proteomics* **2005**, *4*, 1487–1502

Néanmoins, la corrélation entre une quantité donnée de protéine et le nombre de spectres de fragmentation est un point qui pousse toujours plus loin la mesure absolue de niveaux d'expression de protéines par cette méthode. A titre d'exemple Rappsilber et al. ont, en 2002,[364] mis au point l'outil PAI (pour « Protein Abundance Index ») en divisant le nombre de peptides observés après digestion trypsique d'une protéine par le nombre de tous les peptides tryptiques possibles dans la gamme de masse définie. Cet outil a même été amélioré (emPAI pour « exponentially modified Protein Abundance Index ») avec une meilleure corrélation sur une protéine connue, la HSA (pour « Human Serum Albumin »).[365]

D'autres méthodes similaires ont été mises au point, notamment l'approche P3 (pour « Proteotypic Peptide Profiling ») par Craig et al. en 2005.[366] Celle-ci décrit un algorithme qui compare les bases de données de séquences peptidiques protéotypiques aux identifications effectuées par spectrométrie de masse en tandem. Les bases de données sont scannées par collections entières pour tenter de découvrir quelles protéines sont représentées parmi les séquences enregistrées, puis les spectres de masse sont analysés en détails avec assistance des peptides protéotypiques correspondant. D'autres résultats obtenus par Lu et al. en 2007 avec la méthode APEX (pour « Absolute Protein Expression Profiling ») suggèrent que les niveaux d'expression de protéines peuvent être déterminés avec des valeurs d'ordres de grandeur corrects et corrélés à des analyses par Western blot, gels 2D et cytométrie de flux.[367]

Les approches label-free sont certainement les méthodes qui souffrent le plus d'une justesse modeste parmi les nombreuses techniques de quantification par spectrométrie de masse lorsque l'on considère le processus expérimental global et les nombreuses variations systématiques ou non systématiques observées.[368,369] Ceci ayant pour conséquence de chercher à minimiser le nombre d'étapes expérimentales et de contrôler au mieux la reproductibilité à chaque étape. Néanmoins, la quantification « label-free » vaut la peine d'être développée pour plusieurs raisons :

- De façon pratique, le temps utilisé à introduire un marquage dans une protéine est écarté et des économies par rapport au coût des marqueurs sont à noter.
- Du point de vue de la stratégie analytique, il n'y a pas de limite au nombre d'expériences qui peuvent être comparées (sauf éventuellement la capacité de calcul et de stockage de l'ordinateur utilisé). De plus, à l'inverse des techniques de marquage isotopique, la

[364] J. Rappsilber, *Genome Res.* **2002**, *12*, 1231–1245
[365] Y. Ishihama, *Mol. Cell. Proteomics* **2005**, *4*, 1265–1272
[366] R. Craig, J. P. Cortens, R. C. Beavis, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **2005**, *19*, 1844–1850
[367] P. Lu, C. Vogel, R. Wang, X. Yao, E. M. Marcotte, *Nat. Biotechnol.* **2007**, *25*, 117–124
[368] N. Colaert, J. Vandekerckhove, K. Gevaert, L. Martens, *PROTEOMICS* **2011**, *11*, 1110–1113
[369] D. A. Megger, L. L. Pott, M. Ahrens, J. Padden, T. Bracht, K. Kuhlmann, M. Eisenacher, H. E. Meyer, B. Sitek, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics* **2014**, *1844*, 967–976

complexité des spectres de masse n'augmente pas en termes de nombre de peptides détectés en une expérience.

- Enfin, il y a des preuves selon lesquelles les méthodes « label-free » montrent une plus large gamme dynamique de quantification (2 à 3 ordres de grandeur) comparé à la plupart des techniques de marquage isotopique (2 ordres de grandeur maximum), les rendant très attirantes en particulier pour l'analyse d'importants changements dans le niveau d'expression de certaines protéines.

En conclusion, les approches « label-free » ne sont pas encore avantageuses par rapport aux méthodologies à base de marquage du fait des limitations technologiques en terme de retraitement des données, de bases de données existantes, de puissance de calcul des systèmes informatiques, mais aussi de la sensibilité des instruments et des mesures effectuées qui nécessitent encore un marquage pour rendre singulier un sujet d'étude, comme une protéine ou un peptide dans un mélange. C'est un désavantage qui pourrait bientôt disparaître dans la décennie à venir à mesure que les performances des instruments d'analyse augmentent sans cesse.

Tableau 11 : Résumé des techniques de quantification par marquage chimique, métabolique et de type label-free

Marquage	Technique / Année de publication	Méthode de suivi / originalité	Qualités	Inconvénients
Marquage chimique	PAL[370] **1962**	ESI-MS ; MALDI-MS ; ESI-MS/MS et MRM (QToF/QqQ) / **Utilisation de lumière pour libérer le peptide marqué**	Sélection d'une protéine dans un mélange grâce à une intéraction protéine-ligand immobilisé. Caractérisation du site d'affinité grâce à la liaison d'avec le marqueur photoaffin. Caractérisation de la protéine grâce aux peptides protéolytiques hors site de liaison. Longueurs d'ondes élevées et inertes pour le solvant. Synthèse aisée d'arylazides.	Choix d'un ligand spécifique à une protéine ciblée. Temps important d'irradiation créant un risque de marquage non spécifique. Courte longueur d'onde utilisée dans le cas des arylazides qui peuvent donner des nitrènes comme produits secondaires.
	ICAT[371] **1999**	LC-MS / **Marqueur avec des isotopes pour la quantification et une biotine pour la purification**	Isolation des protéines marquées par chromatographie d'affinité. Améliorations du marqueur pour éviter les problématiques liées à la biotine (cITAC et pITAC).	Utilisation du deutérium entraînant des différences d'élution. PTM non quantifiables car retenues par la purification par chromatographie d'affinité. Biotine hydrophobe entraînant une élution des peptides dans une mince fenêtre. Interférence possible de la biotine avec la recherche de séquence dans les bases de données. Coût des marqueurs ICAT en isotopes stables potentiellement prohibitif pour la démocratisation de la technique. Impossibilité de quantifier des protéines sans cystéine. Relarguage des peptides biotinylés non quantitatif.
	ICP-MS[372] **2000**	Ionisation par plasma / **MS élémentaire**	Détection ultrasensible pour une majorité de métaux et d'hétéroatomes (Sélénium, iode, phosphore, tellure)	Incorporation des éléments métalliques et semi métalliques dans les séquences peptidiques.

[370] A. Singh, E. R. Thornton, F. H. Westheimer, *J. Biol. Chem.* **1962**, *237*, PC3006-PC3008
[371] S. P. Gygi, B. Rist, S. A. Gerber, F. Turecek, M. H. Gelb, R. Aebersold, *Nat. Biotechnol.* **1999**, *17*, 994–999
[372] J. Szpunar, *The Analyst* **2000**, *125*, 963–988

Marquage chimique	ECAT[373] **2001**	ICP-MS (ionisation plasma)/ **MS élémentaire à base de lanthanide**	Multiplexage important possible en utilisant différents lanthanides. Haute sensibilité et haute spécificité fournie par le lanthanide.	Stabilité du cation de lanthanide dans le cycle supramoléculaire.
	MCAT[374] **2002**	LC-MS et LC-MS/MS par CID (QToF/QqQ) / **Dérivation de lysine en homoarginine**	Marquage sélectif des résidus lysines. Identification simple et rapide en MS des peptides par contrôles des différences de masse (21 et/ou 42). Larges applications possibles comme le suivi de l'évolution du niveau d'expression des protéines. Analyse de polymorphismes de protéines.	Biais dans le marquage dans le cas de miscleavage par l'enzyme de digestion et donc dans la quantification. Etude d'ion mono et dichargé pouvant complexifier le traitement des données.
	SPICAT / SP_2ICAT[375] **2002**	µLC-MS (trappe à ion) µLC-MS/MS (SRM)	Sélection d'une protéine dans un mélange grâce à une intéraction protéine-ligand immobilisé sur support solide. Caractérisation du site d'affinité grâce à la liaison d'avec le marqueur photoaffin.	Choix d'un ligand spécifique à une protéine ciblée. Limité aux protéines contenant des cystéines ou des ponts disulfures pouvant être réduits.
	AQUA[376] **2003**	ESI-MS/MS et MRM (QToF/QqQ) / **Peptides protéotypiques marqués**	Combinaison avec SDS-PAGE et simplification des analyses. Attractivité avec un grand nombre de séquences disponibles	Variabilité de la digestion enzymatique : à contrôler sytématiquement. Stabilité/pureté des étalons. Modification chimique de l'étalon possible. Taille limitée des peptides (< 15 acides aminés)
	IDBEST[377] **2003**	LC-MS/MS (ISF[378]) /**Utilisation concomitante de l'ICP et de l'ESI/MALDI-MS**	Utilisation de marqueurs (légers et lourds) composés d'hétéroéléments à fort défaut de masse pouvant être détectés de manière spécifique et sensible en ICP-MS. Complémentarité de la quantification relative avec la quantification absolue par ICP-MS.	Inutilisable sur des appareils de résolution inférieure à 10 000 pour discriminer le défaut de masse.

[373] C. Zhang, F. Wu, Y. Zhang, X. Wang, X. Zhang, *J. Anal. At. Spectrom.* **2001**, *16*, 1393–1396
[374] G. Cagney, A. Emili, *Nat Biotech* **2002**, *20*, 163–170
[375] H. Zhou, J. A. Ranish, J. D. Watts, R. Aebersold, *Nat. Biotechnol.* **2002**, *20*, 512–515
[376] S. A. Gerber, J. Rush, O. Stemman, M. W. Kirschner, S. P. Gygi, *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2003**, *100*, 6940–6945
[377] M. P. Hall, S. Ashrafi, I. Obegi, R. Petesch, J. N. Peterson, L. V. Schneider, *J. Mass Spectrom.* **2003**, *38*, 809–816
[378] In Source Fragmentation

Marquage chimique	TMT[379] **2003**	MS/MS par CID (QToF/QqQ/ToF-ToF/cellule HCD) / **Quantification du fragment portant le marquage**	Structures similaires des différents marqueurs qui permettent de conserver des conditions de marquage et d'élution identiques.	Sous-estimation d'importantes variations des protéomes (interférences du bruit de fond et contamination isotopique). Temps d'analyse augmenté par nécessité d'acquérir des spectres MS/MS.
	iTRAQ[380] **2004**	ESI-MS/MS et MRM par CID (QToF/QqQ) MALDI-ToF/ToF par CID / **Sonde et groupe équilibrant dans un fragment de masse constante**	Protocoles de marquage établis. Composés iTRAQ de base disponibles à la vente. Adapté à l'étude de PTMs, comme la mesure et le suivi temporelle de phosphorylations. Pas de limite aux systèmes incorporant les isotopes pendant la culture. Multiplexage (à 4 ou 8 composés isobares). Coefficients de variation de 15 à 17 %.	Sous-estimation d'importantes variations des protéomes (interférences du bruit de fond et contamination isotopique). Temps d'analyse augmenté par nécessité d'acquérir des spectres MS/MS. Difficulté à être utilisé sur des trappes à ion (faibles masses des fragments).
	ICPL[381] **2005**	MALDI-ToF/ToF / **Marquage des résidus cystéines de protéines**	Applicable à n'importe quel échantillon de protéine possédant des amines libres, ou n'importe quel extrait tissulaire ou de fluide biologique en contenant. Permet un important recouvrement de séquence. Permet l'analyse de PTM et d'isoformes. Multiplexage jusqu'à 3 échantillons.	Dénaturation de protéines pour accéder à tous les sites aminés libres. Vérification de la complétion du marquage de la protéine avec une étape supplémentaire.

[379] A. Thompson, J. Schäfer, K. Kuhn, S. Kienle, J. Schwarz, G. Schmidt, T. Neumann, C. Hamon, *Anal. Chem.* **2003**, *75*, 1895–1904
[380] P. L. Ross, *Molecular & Cellular Proteomics* **2004**, *3*, 1154–1169
[381] A. Schmidt, J. Kellermann, F. Lottspeich, *PROTEOMICS* **2005**, *5*, 4–15

Marquage chimique	MECT[382] **2006**	LC-MS, LC-MS/MS (ESI-QToF) et MALDI-ToF-MS / **Marquage d'amines primaires**	Applicable à tout peptide avec une amine primaire libre (N-ter ou lysine). Faible coût grâce à l'anhydride bicyclique d'acide diéthylènetriamine-N,N,N',N'',N''-pentaacétique. Quantification relative (comparaison des aires des signaux). Possibilité de combiner l'analyse MALDI-ToF-MS avec l'ICP-MS et la LC-MS/MS. Identification par spectre de fragmentation.	Coût des terres rares pour la version 4plex.
	MeCAT[383] **2007**	ICP-MS (ionisation plasma) / **MS élémentaire offrant des dérivations supplémentaires**	Dérivations supplémentaires possibles grâce au groupement modifiable (R). Multiplexage important possible en utilisant différents lanthanides. Haute sensibilité et spécificité fournie par le lanthanide.	Stabilité du cation de lanthanide dans le cycle supramoléculaire.
	OxICAT[384] **2008**	LC-MS / **Détermination d'états d'oxydation de cystéines**	Utilisation possible pour une grande variété de cellules et d'organismes. Outil puissant pour l'identification, la quantification et le suivi des oxydations de ponts disulfures *in vivo*.	Incapacité à identifier et quantifier les hauts degrés d'oxydation des cystéines (acide sulfénique et sulfonique).
	IPTL[385] **2009**	MALDI-ToF/ToF et nLC-LTQ Orbitrap (CID) **Mélange isobare de peptides**	Conçu pour éviter le recouvrement d'avec des fragments peptidiques (marquages en C-ter et N-ter inversés entre deux mélanges de peptides). Facilité de marquage en C-ter et N-ter grâce au choix de digestion enzymatique (Lys-C). Multiples points de comparaison dans les spectres MS/MS pour chaque fragment (traitement statistique possible). Adapté aux trappes à ion.	Multiplexage limité à trois échantillons.

[382] H. Liu, Y. Zhang, J. Wang, D. Wang, C. Zhou, Y. Cai, X. Qian, *Analytical Chemistry* **2006**, *78*, 6614–6621
[383] R. Ahrends, S. Pieper, A. Kuhn, H. Weisshoff, M. Hamester, T. Lindemann, C. Scheler, K. Lehmann, K. Taubner, M. W. Linscheid, *Mol. Cell. Proteomics* **2007**, *6*, 1907–1916
[384] L. I. Leichert, F. Gehrke, H. V. Gudiseva, T. Blackwell, M. Ilbert, A. K. Walker, J. R. Strahler, P. C. Andrews, U. Jakob, *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2008**, *105*, 8197–8202
[385] C. J. Koehler, M. Strozynski, F. Kozielski, A. Treumann, B. Thiede, *J. Proteome Res.* **2009**, *8*, 4333–4341

Marquage chimique	MECT[386] **2006**	ESI-MS/MS et MRM par CID (QToF/QqQ) MALDI-ToF/ToF par CID / **Inspiré des marqueurs iTRAQ mais non isobares**	Quantification spécifique de chaque version du peptide marqué. Possibilité de marquer indifféremment l'analyte et la référence. Possibilité de normaliser les mesures et d'effectuer des comparaisons croisées. Approche économe.	Temps d'analyse accru par nécessité d'acquérir un spectre MS/MS.
	aTRAQ®[387] **2011**	ESI-MS/MS et MRM par CID (QToF/QqQ) MALDI-ToF/ToF par CID / **Application des marqueurs mTRAQ à l'analyse d'acides aminés (AAA)**	Analyse des acides aminés (AAA) de manière juste et précise en utilisant deux formes (lourde et légère) de marqueur aTRAQ® similaire aux marqueurs mTRAQ® et iTRAQ. Marqueurs non isobares éliminant la superposition des masses en mode MS.	Temps d'analyse accru par nécessité d'acquérir un spectre MS/MS.

[386] H. Liu, Y. Zhang, J. Wang, D. Wang, C. Zhou, Y. Cai, X. Qian, *Analytical Chemistry* **2006**, *78*, 6614–6621
[387] P. K. Held, L. White, M. Pasquali, *J. Chromatogr. B* **2011**, *879*, 2695–2703

Label-free	Intégration d'aires[388] **2002**	ESI-MS et MS/MS / **Unique analyse pour identifier et quantifier**	Pas d'étape de marquage. Quantification et identification en mode MS/MS simultanément.	Très important volume de données à retraiter. Précision et justesse sujettes à d'importantes variations.
	Décompte spectral[389] **2004**	ESI-MS et MS/MS / **Utilisation de la MS^1 et de la MS^2**	Pas d'étape de marquage. Analyses en mode MS pour l'identification du peptide. Analyse en mode MS/MS pour la quantification des peptides.	Grand nombre d'expérimentations à effectuer. Très important volume de données à retraiter. Grande complexité des spectres de fragmentation. Précision et justesse sujettes à d'importantes variations.
Marquage métabolique	QconCAT [390] **2005**	LC-MS/MS et MRM (QToF/QqQ) / **Peptide chimérique utilisable pour quantifier plusieurs protéines**	Une fois le gène codant pour un peptide QconCAT cloné, la production de ce peptide peut être faite sur demande et à volonté. Acides aminés lourds utilisés : [$^{13}C_6$,$^{15}N_2$] L-lysine, [$^{13}C_6$,^{15}N]L-leucine et [$^{13}C_6$,$^{15}N_4$]L-arginine	Variabilité de la digestion enzymatique à contrôler sytématiquement Stabilité/pureté des étalons Modification chimique de l'étalon possible. Pas de conformation préférentielle (folding) permettant une digestion enzymatique rapide mais entraînant une différence de digestion par rapport à la protéine cible.
	PSAQ[391] **2007**	LC-MS/MS et MRM (QToF/QqQ) / **Protéine cible entière marquée**	Analyse possible n'importe quelle protéine. Quantification de la quantité totale d'anticorps (par rapport au test ELISA). Acides aminés lourds utilisés : [$^{13}C_6$,$^{15}N_2$] L-lysine, [$^{13}C_6$,^{15}N]L-leucine et [$^{13}C_6$,$^{15}N_4$]L-arginine.	Coût important d'une analyse : 900 $ contre 375 $ pour ELISA.

[388] P. V. Bondarenko, D. Chelius, T. A. Shaler, *Anal. Chem.* **2002**, *74*, 4741–4749
[389] H. Liu, R. G. Sadygov, J. R. Yates, *Anal. Chem.* **2004**, *76*, 4193–4201
[390] R. J. Beynon, M. K. Doherty, J. M. Pratt, S. J. Gaskell, *Nat. Methods* **2005**, *2*, 587–589
[391] V. Brun, A. Dupuis, A. Adrait, M. Marcellin, D. Thomas, M. Court, F. Vandenesch, J. Garin, *Mol. Cell. Proteomics* **2007**, *6*, 2139–2149

Marquage métabolique	SILAC[392] **2002**	LC-MS / **Comparaison de niveaux d'expression de protéomes entiers**	Pas de réaction chimique pour l'incorporation des isotopes. Incorporation des isotopes stables à un stade précoce de la préparation des protéines en utilisant le métabolisme des cellules limitant ainsi les variations de préparation d'échantillons. Multiplexage jusqu'à 3 échantillons. Acides aminés lourds utilisés : [$^{13}C_6$,$^{15}N_2$] L-lysine, [$^{13}C_6$,^{15}N]L-leucine et [$^{13}C_6$,$^{15}N_4$]L-arginine	Peu adapté à un grand nombre de protocoles requérant une production à grande échelle par manque de sources de sérum enrichi en ^{15}N. Dépend du marquage endogène des protéines par des isotopes lourds, impossible à mettre en place chez un patient.
	SILAP[393] **2009**	LC-MS / **Etude de protéomes de sources de fluides biologiques**	Comparaison rapide de l'évolution entre deux protéomes entiers. Acides aminés lourds utilisés : [$^{13}C_6$,$^{15}N_2$] L-lysine, [$^{13}C_6$,^{15}N]L-leucine et [$^{13}C_6$,$^{15}N_4$]L-arginine	Validation de l'analyse par Western blot. Peu adapté aux analyses à grande échelle.

[392] S.-E. Ong, *Mol. Cell. Proteomics* **2002**, *1*, 376–386
[393] K. H. Yu, C. G. Barry, D. Austin, C. M. Busch, V. Sangar, A. K. Rustgi, I. A. Blair, *J. Proteome Res.* **2009**, *8*, 1565–1576

Conclusion

La spectrométrie de masse représente un outil qui permet le criblage extrêmement rapide des études de protéomique de type « shotgun », mais aussi d'interactions ligands/protéines. Et, grâce au développement instrumental qui permet sans cesse d'améliorer la sensibilité et la résolution des analyses, celle-ci peut se positionner comme voie incontournable dans le processus de développement de médicaments avec l'explosion du nombre de cibles thérapeutiques. [394] Dans cette optique, les méthodes MS représentent des alternatives tout à fait crédibles et fiables grâce à leur spécificité sans équivalent, leur très haute sensibilité, et leur capacité à multiplexer les expérimentations basées sur la SID-MS. Cela amène donc au choix de la technique à utiliser qui devra se faire en fonction de l'expérimentation et de son objectif et non pas à l'utilisation unilatérale d'une seule méthodologie. En effet chaque approche propose des avantages tout en affichant certains inconvénients et c'est bien la minimisation des inconvénients qui permettra de sélectionner la plus adaptée pour une expérimentation donnée tandis que les avantages mettront plus l'accent sur l'objectif recherché par le manipulateur (SILAC/SILAP versus AQUA, QconCAT, PSAQ , iTRAQ, ICAT etc…) en orientant le choix vers un marquage chimique, métabolique ou une étude type label-free. Cependant, lors des premières phases de découverte de biomarqueurs, l'accent est en premier lieu mis sur la précision des mesures et non pas la justesse des évaluations. Plus en aval, au moment de la validation des méthodes, le besoin de justesse et de précision tout autant que la signification statistique seront prédominants appelant à des techniques très performantes dans des situations d'analyse de protéines ciblées. De plus, à mesure que le développement avance au stade clinique, le besoin de disposer de méthodologies facilement, rapidement et efficacement transposables se fera ressentir au moment des comparaisons inter laboratoires.

Ainsi, dans l'optique de gagner en reconnaissance, ces méthodologies MS doivent être validées avec précaution et leur justesse/précision évaluées de façon rigoureuse.[395] Bien entendu, la détection et la quantification doivent être robustes, spécifiques, sensibles, précises et reproductibles (incluant la reproductibilité inter laboratoires). En outre, leur capacité de multiplexage jusqu'à 10 analyses simultanées permet une grande adaptabilité. A cela il faut ajouter le fait que la découverte de nouveaux marqueurs permet de mieux comprendre les mécanismes mis en jeu dans diverses pathologies, d'améliorer les pronostics, de développer des diagnostics toujours plus sensibles et tôt dans l'évolution d'une pathologie, d'identifier les cibles thérapeutiques et d'améliorer la compréhension des mécanismes d'action des médicaments.

[394] P. Chène, *ChemMedChem* **2006**, *1*, 400–411
[395] C. T. Viswanathan, S. Bansal, B. Booth, A. J. DeStefano, M. J. Rose, J. Sailstad, V. P. Shah, J. P. Skelly, P. G. Swann, R. Weiner, *Pharm. Res.* **2007**, *24*, 1962–1973

Les travaux de recherche de cette thèse s'inscrivent directement dans ce domaine de la quantification par dilution isotopique appliquée à l'étude d'interaction récepteur-ligand peptidique. Ces études ont été effectuées par spectrométrie de masse MALDI-ToF, plate-forme d'analyse très peu employée pour la quantification de biomolécules jusqu'à maintenant à laquelle sera dédié le chapitre suivant de ce manuscrit.

Chapitre 3 : La spectrométrie de masse MALDI - Approche historique, fondamentale et appliquée

I. Développement de la technique MALDI

La spectrométrie de masse par MALDI est une technique moderne d'ionisation qui a été développée à la fin du XX^{è} siècle. La discussion autour de celle-ci sera orientée suivant une perspective historique avant d'aborder la source MALDI, le développement des matrices, l'analyse à une dimension (MS^1) et enfin l'analyse à deux dimensions (MS^2).

I.A. Aspect historique de l'ionisation MALDI

L'acronyme MALDI pour « Matrix Assisted Laser Desorption Ionisation » a été inventé par Franz Hillenkamp, Doris Bachmann et Michael Karas en 1985.[396] Dans leur publication originelle, les chercheurs ont montré que des acides aminés tels que l'alanine pouvaient être ionisés beaucoup plus facilement en présence de tryptophane à une longueur d'onde de 266 nm. En effet, l'irradiance du laser (puissance par unité de surface en $W.m^{-2}$) nécessaire était alors égale à un dixième de celle requise pour l'ionisation de l'alanine seule. Le tryptophane absorbait l'énergie laser et assistait l'ionisation de l'alanine, incapable d'absorber efficacement l'énergie laser à cette longueur d'onde. Dans le cas du tryptophane, à une irradiance de 10^7 $W.cm^{-2}$ et une impulsion laser de 10 ns, l'énergie absorbée est de 21,5 eV environ, équivalant à 4 à 5 photons d'une longueur d'onde de 266 nm. Cette valeur se calcule à partir de l'équation de la loi de Beer-Lambert adaptée à l'absorption d'énergie par des chromophores de la partie supérieure d'une couche moléculaire (voir Equation 2 ci-dessous).

$$e_a = \frac{2{,}3.\varepsilon_n.E.\tau}{N_A}$$

Equation 2 : Equation de la loi de Beer-Lambert adaptée à l'absorption totale d'énergie par un chromophore de la couche supérieure d'un dépôt moléculaire où ε_n est le coefficient d'extinction molaire, E l'irradiance du laser considérée, τ la durée de l'impulsion laser et N_A le nombre d'Avogadro

Deux ans plus tard grâce à cette technique d'ionisation assistée par matrice, des peptides allant jusqu'à une masse de 2 843 Da comme la mélittine ont été ionisées en mélange avec du tryptophane.[397] L'avancée majeure a été apportée par l'équipe du Dr. Koichi Tanaka de chez Shimadzu© pour le développement de leur méthode « ultra-fine metal plus liquid matrix », connue plus tard sous l'acronyme SALDI (pour « Surface Assisted Laser Desorption Ionisation »).[398] Les chercheurs ont combiné une matrice composée de particules de Cobalt de 30 nm avec du glycérol et une ionisation par un laser à azote à une longueur d'onde de 337 nm. Cela leur a permis d'ioniser de

[396] M. Karas, D. Bachmann, F. Hillenkamp, *Analytical Chemistry* **1985**, *57*, 2935–2939
[397] M. Karas, D. Bachmann, U. Bahr, F. Hillenkamp, *International Journal of Mass Spectrometry and Ion Processes* **1987**, *78*, 53–68
[398] K. Tanaka, H. Waki, Y. Ido, S. Akita, Y. Yoshida, T. Yoshida, T. Matsuo, *Rapid Communications in Mass Spectrometry* **1988**, *2*, 151–153

larges biomolécules comme la protéine carboxypeptidase-A d'une masse de 34,5 KDa, une enzyme d'origine pancréatique et intestinale (duodénum) qui permet d'hydrolyser les polypeptides acide aminé par acide aminé. Ces travaux lui ont valu la co-attribution du prix Nobel de chimie en 2002 avec John B. Fenn pour « *leur développement des méthodes de désorption par ionisation douce pour des analyses de macromolécules biologiques par spectrométrie de masse* ». Il faut toutefois replacer ces découvertes dans leur contexte historique. En effet, avant d'être capable d'accélérer des photons pour ioniser des molécules, les premières techniques d'ionisation ont été développées autour de l'accélération d'ions primaires (gaz nobles, oxygène ionisé, molécules ionisées) pour former des ions secondaires (les analytes) qui sont par la suite analysés, c'est le principe du SIMS (pour « Secondary Ion Mass Spectrometry »). Par la suite la technique FAB (pour « Fast Atom Bombardment ») a consisté en la production d'un faisceau d'atomes neutres accélérés bombardant un échantillon solide ou liquide (d'où l'appellation LSIMS pour « Liquid SIMS »). Enfin les dernières particules à avoir été utilisées pour l'ionisation de molécules ont été les photons issus de laser au travers de l'immense diversité des techniques développées dont la liste exhaustive ne pourrait être développée dans ce manuscrit (voir Figure 77 ci-dessous).

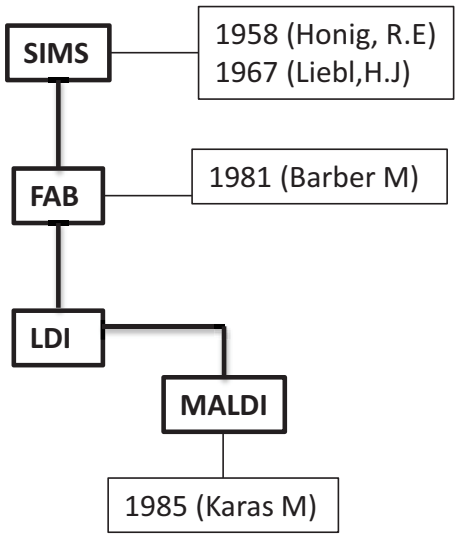


Figure 77 : Chronologie non exhaustive de l'évolution historique des techniques d'ionisation

Le Pr. Karas et le Pr. Hillenkamp ont, après les découvertes du Dr. Tanaka, été capables d'ioniser de plus larges biomolécules comme la protéine d'albumine bovine de 67 KDa grâce à une matrice constituée d'acide nicotinique et un laser à 266 nm.[399] D'autres évolutions ont été décrites avec l'utilisation d'un laser à 355 nm et des dérivés de l'acide cinnamique (acide férulique et acide caféique) et avec l'acide sinapinique (voir Figure 78 ci-dessous).[400] La démocratisation de la technique MALDI a été rendue possible grâce à la disponibilité commerciale de petits lasers à azote opérant à

[399] M. Karas, F. Hillenkamp, *Analytical Chemistry* **1988**, *60*, 2299–2301
[400] R. C. Beavis, B. T. Chait, K. G. Standing, *Rapid Communications in Mass Spectrometry* **1989**, *3*, 436–439

337 nm et à l'apparition d'instruments commerciaux au début des années 1990.[401] Puis ces lasers ont été remplacés par des lasers de type Nd:YAG (pour « Neodynium-dopped Yttrium Aluminium Garnet ») fonctionnant à 355 nm avec, à l'heure actuelle, des matrices organiques utilisées la plupart du temps. Un certain nombre d'études et de travaux, dont certains au sein de l'IBMM, se sont en revanche servis de matrices inorganiques pour se passer des interférences dues aux ions de matrice aux basses masses dans le cas d'analyse de petites molécules.[402]

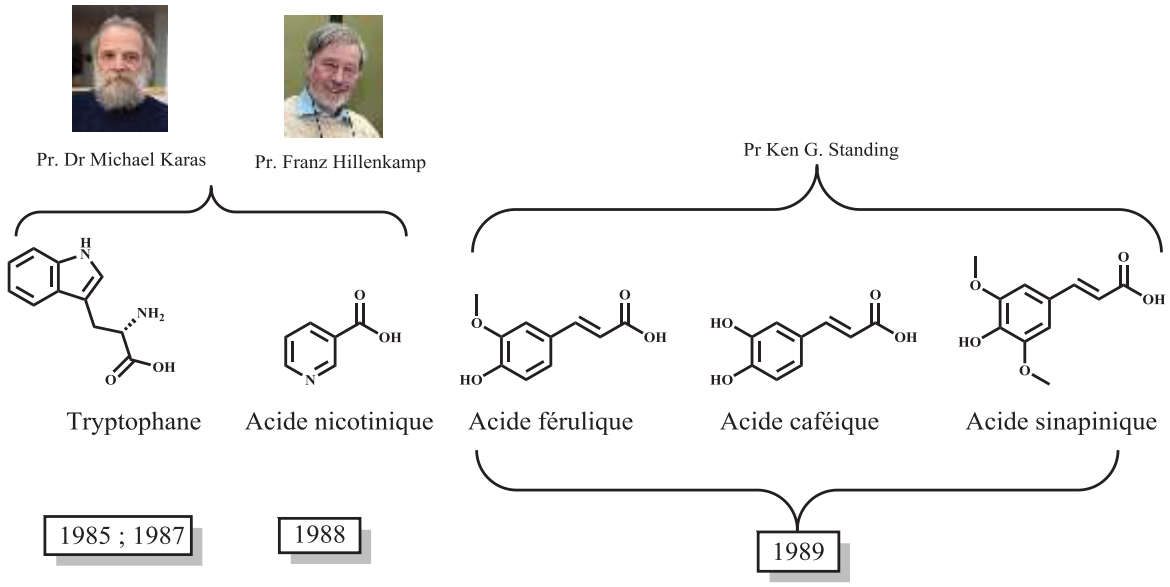


Figure 78 : Premières matrices utilisées lors du développement de la technique MALDI avec leur apparition chronologique

Depuis la technique MALDI a trouvé de nombreuses applications dans des domaines allant de la médecine à la chimie organique en passant par la biochimie. En chimie des polymères par exemple, le MALDI peut être utilisé pour déterminer la dispersité des chaînes polymériques.[403] De plus, pour des molécules de tailles importantes comme les rotaxanes, les dendrimères ou encore les polymères hyperbranchés, le MALDI reste une technique d'analyse incontournable grâce à sa capacité à fournir une ionisation douce pour des composés excédant les 1 000 à 10 000 Da. La microbiologie, elle, a subi une révolution avec l'arrivée de la technique MALDI pour l'identification de micro-organismes comme des bactéries et même des champignons.[404] En effet, par un simple dépôt d'une colonie de bactérie recouverte par une couche de matrice, il est possible d'obtenir des spectres qui, une fois comparés avec des profils stockés dans des bases de données, permettent d'identifier le micro-organisme. Une des raisons de l'engouement pour le MALDI vient du fait qu'il

[401] M. Karas, U. Bahr, *TrAC Trends in Analytical Chemistry* **1990**, *9*, 321–325
[402] Mathieu Dupré, « Développements méthodologiques en spectrométrie de masse LDI pour l'analyse de peptides », Thèse de doctorat en Ingénierie moléculaire, sous la direction de Christine Enjalbal, Montpellier, Université Montpellier 2, 2012.
[403] S. F. Macha, P. A. Limbach, *Current Opinion in Solid State and Materials Science* **2002**, *6*, 213–220
[404] P. Seng, M. Drancourt, F. Gouriet, B. La Scola, P. Fournier, J. M. Rolain, D. Raoult, *Clinical Infectious Diseases* **2009**, *49*, 543–551

permet des diagnostics plus rapides, précis et bons marchés par rapport à des analyses immunologiques ou biochimiques grâce à des analyses robustes, fiables et facilement répétables en routine.

I.B. La source MALDI et l'expression fondamentale des énergies en jeu

I.B.1. La source MALDI et l'AP-MALDI

La source MALDI, généralement sous vide à une pression de 10^{-5} bar ou moins (10^{-6} bar en source sur le MALDI Ultraflex III, Brucker©), est composée d'un système permettant l'accueil de la plaque de dépôt et d'un laser incident focalisé sur un point cible de la plaque mobile par un système ingénieux de lentilles et de miroirs particulier à chaque constructeur (voir Figure 79 ci-dessous).

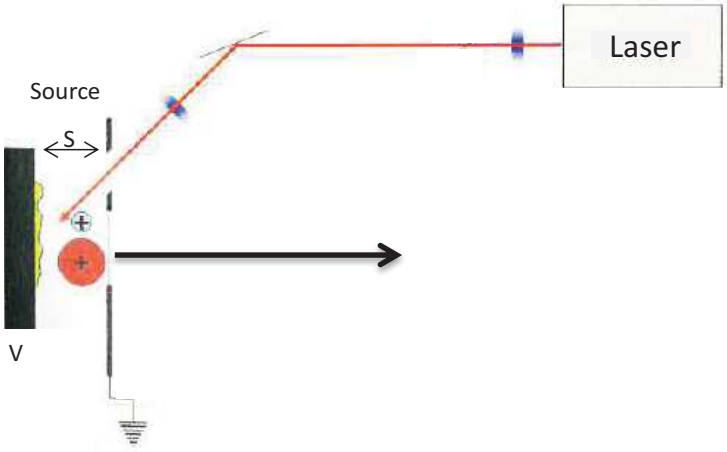


Figure 79 : Schéma d'une source MALDI avec le laser incident focalisé par des lentilles et envoyé sur la cible par un miroir. Le support des dépôts est à un potentiel V et la sortie de la source est reliée à la terre

Le laser émis est par la suite absorbé par la matrice présente dans l'échantillon déposé dont le rôle est de transférer l'énergie laser à l'échantillon. L'absorption de l'énergie incidente est soumise à la loi de Beer-Lambert et fait décroître la fluence du laser « H » (voir Equation 3 ci-dessous) exprimée en $J.m^{-2}$ à une profondeur « z » dans l'échantillon, « H_0 » étant sa valeur à la surface de l'échantillon. Cette loi fait intervenir le coefficient d'absorption molaire « α_n » et la concentration « C_n » des molécules absorbantes de l'échantillon. La dépendance de ce coefficient d'absorption en fonction de la longueur d'onde du laser est une propriété des matrices MALDI avec une valeur maximale comprise entre 5.10^3 et 5.10^4 $L.mol^{-1}.cm^{-1}$ à la longueur d'onde du pic d'absorption de la matrice considérée.[405]

[405] F. Hillenkamp, J. Peter-Katalinić, Eds. , *MALDI MS: A Practical Guide to Instrumentation, Methods and Applications*, Wiley - VCH, Weinheim, **2009**

$$H = H_0 . e^{-\alpha z}, \text{ avec } \alpha = \alpha_n . C_n$$
$$\frac{E_a}{V} = \alpha . H$$

Equation 3 : Expression de la fluence laser « H » en fonction de la profondeur « z » et de l'énergie absorbée par unité de volume « E_a »

En MALDI, c'est la densité d'énergie absorbée (énergie absorbée E_a par unité de volume) qui est la clé du processus d'ionisation et qui est égale à l'opposé de la dérivé de la fluence laser (voir Partie E – ***Annexes***, paragraphe II.A.1 p.478). Ainsi, une matrice avec un coefficient d'absorption suffisant pourra absorber l'énergie laser même avec une fluence relativement faible. A titre d'exemple, un laser à N_2 (337 nm) émet des photons de 3,7 eV chacun. Une fluence laser de 100 $J.m^{-2}$ correspond à $6{,}25.10^{20}$ $eV.m^{-2}$ et donc à $1{,}7.10^{16}$ photons par centimètre carré, ce qui est une quantité d'énergie par unité de surface très élevée capable d'arracher la matière de la surface de sa zone de dépôt. La plupart des appareils sont équipés avec des lasers UV à azote ou Nd:YAG à fréquence triplée (355 nm) ou quadruplée (266 nm). En revanche les lasers infrarouges (IR), bien que plus rares, ont d'intéressantes applications en biologie grâce à l'avantage de leur mode d'ionisation plus doux dû à des photons de plus faible énergie (voir Figure 80 ci-dessous).

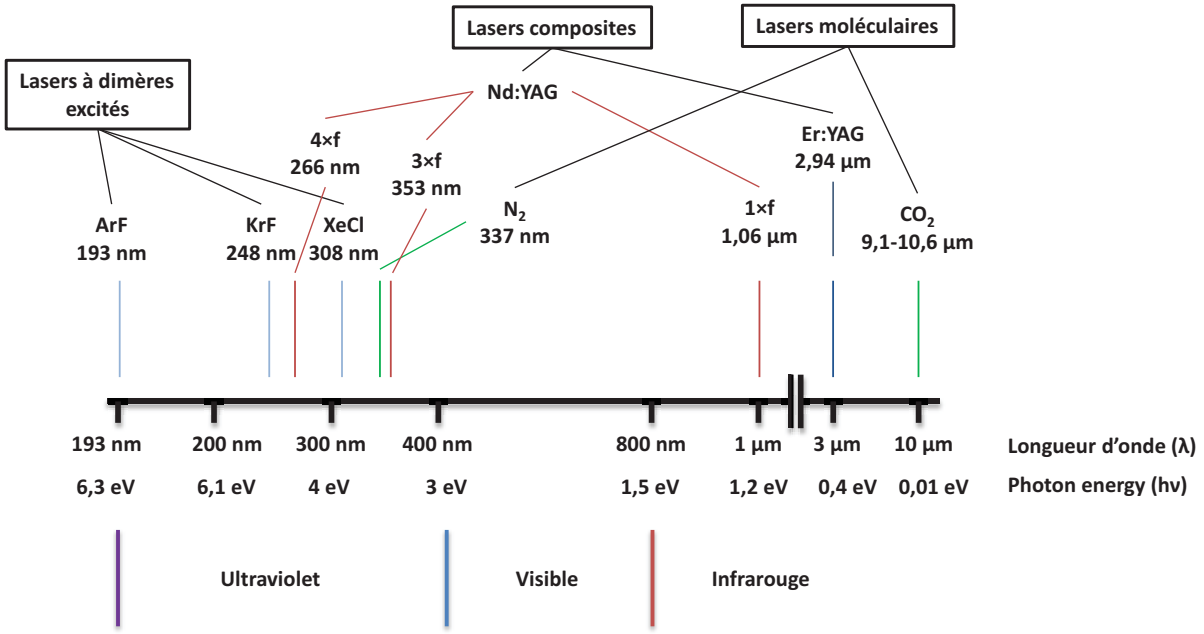


Figure 80 : Présentation des différents lasers existant. Les plus couramment utilisés en MALDI sont les lasers UV de type Nd:YAG et à azote[406]

Il existe une variation du MALDI sous vide, le MALDI à pression atmosphérique ou AP-MALDI.[407,408] Cette principale différence de pression dans laquelle les ions sont créés ont, par le

[406] F. Hillenkamp, J. Peter-Katalinić, Eds. , *MALDI MS: A Practical Guide to Instrumentation, Methods and Applications*, Wiley - VCH, Weinheim, **2009**
[407] V. V. Laiko, L. B. Alma, *Atmospheric Pressure Matrix Assisted Laser Desorption*, **1999**, US 5965884 A
[408] V. V. Laiko, M. A. Baldwin, A. L. Burlingame, *Analytical Chemistry* **2000**, *72*, 652–657

passé, limité l'utilisation de l'AP-MALDI à cause d'une sensibilité plus faible. Malgré cela, le transfert efficace des ions de la source à l'analyseur permet une détection de quantités très faibles jusqu'à la femtomole.[409] Cette technique est avantageusement utilisée en recherche médicinale sur des sujets variés comme l'analyse de bactéries, d'ADN, d'ARN, de lipides, d'oligosaccharides, de phosphopeptides, de petites molécules ou encore de polymères. L'avantage par rapport au MALDI sur ce type de sujet est avant tout la facilité avec laquelle la source AP-MALDI peut être couplée sur des instruments équipés avec des sources à pression atmosphérique comme l'ESI ou la source nanoESI.[410]

I.B.2. Le processus de désorption/ablation de la matière

Le processus de désorption est au cœur de l'analyse MALDI puisqu'il permet le passage des molécules de matrice et d'analyte adsorbées sur une surface, la plaque MALDI, en phase gazeuse.[411] Cependant le terme « ablation » convient mieux pour décrire le phénomène étant donné qu'il s'agit plutôt, à chaque exposition d'une impulsion laser, d'arracher un certain volume de molécules (i.e : plusieurs couches de molécules) du dépôt. Ce processus est concomitant avec l'ionisation des composés présents dans le dépôt et se déroule sur une échelle très faible de l'ordre du micromètre et de la nanoseconde (voir Figure 81 et Figure 82 ci-dessous).[412]

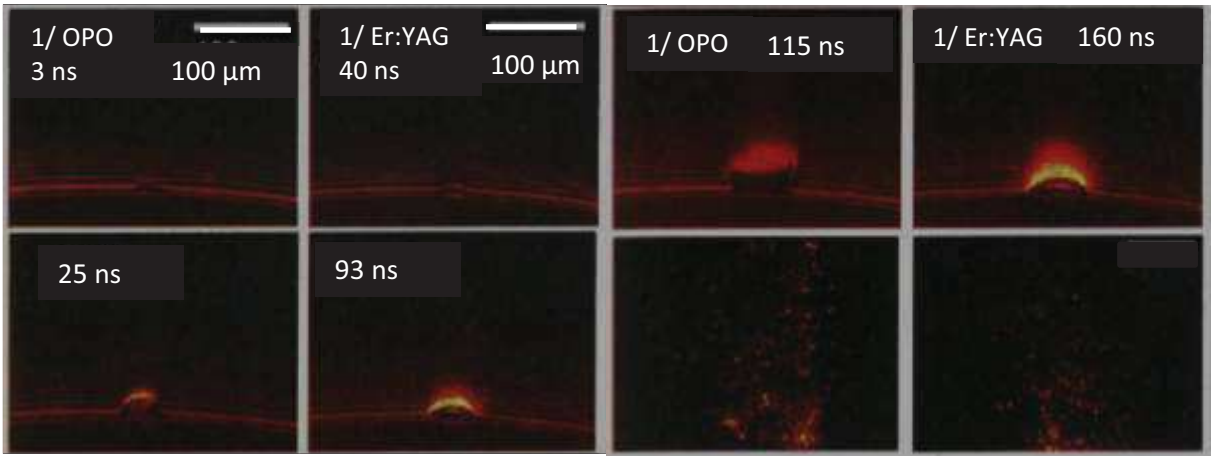


Figure 81 : Clichés à haute vitesse de nuages de particules générés en IR-MALDI, d'une part avec un laser OPO (pour « Optical Parametric Oscillator ») et une impulsion de 6 ns (à gauche), d'autre part avec un laser Er:YAG (pour « Erbium-doped Yttrium Aluminium Garnet » Er:$Y_3Al_5O_{12}$) et une impulsion de 100 ns. Les deux lasers opèrent à 2,94 µm avec du glycérol en tant que matrice, une résolution temporelle de 8 ns et une résolution spatiale de 4 µm. Les trois premiers clichés montrent un gradient de composés qui modifient l'indice de réfraction du nuage de particules. Le quatrième cliché représente l'émission des particules dans le nuage par diffraction de la lumière à 90 °

[409] K. Strupat, S. Scheibner, T. Arrey, M. Bromirski, "Biological Applications of AP MALDI with Thermo Scientific Exactive Orbitrap MS," can be found under http://www.apmaldi.com/images/stories/005-111101-an30224-maldi-generalapp_6s_v4a_kp.pdf, **2011**
[410] V. V. Laiko, S. C. Moyer, R. J. Cotter, *Analytical Chemistry* **2000**, *72*, 5239–5243
[411] K. Dreisewerd, *Chemical Reviews* **2003**, *103*, 395–426
[412] F. Hillenkamp, J. Peter-Katalinić, Eds. , *MALDI MS: A Practical Guide to Instrumentation, Methods and Applications*, Wiley - VCH, Weinheim, **2009**

Ces deux clichés montrent qu'au bout d'une centaine de nanosecondes, les composés sont ablatés quel que soit le type de laser utilisé.

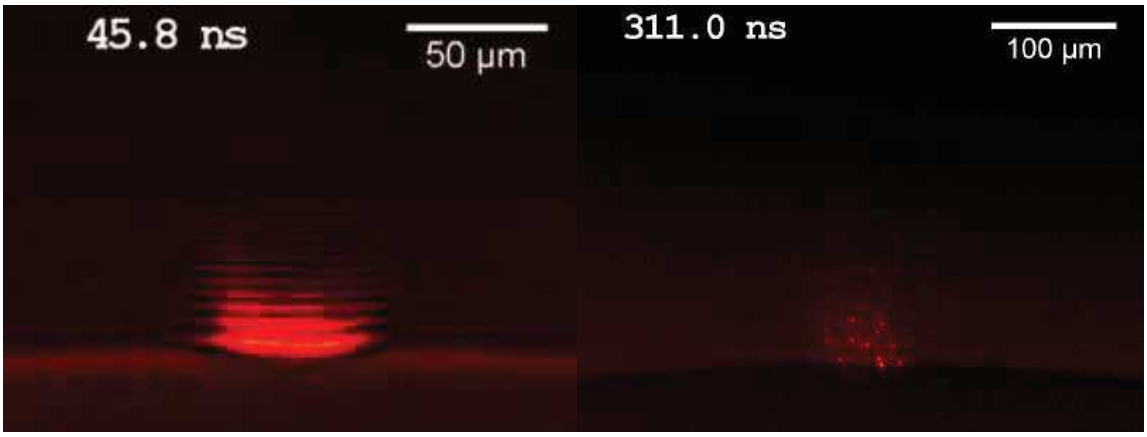


Figure 82 : Clichés à haute vitesse de nuages de particules générés en UV-MALDI avec un laser Nd:YAG (pour « Neodynium-doped Yttrium Aluminium Garnet » $Nd:Y_3Al_5O_{12}$) à 266 nm et à fréquence quadruplée avec une impulsion laser de 8 ns, une résolution temporelle de 8 ns et du nitrobenzylalcool comme matrice. Le cliché de gauche correspond à un délai de 45 ns après le tir laser tandis que le cliché de droite correspond à l'image du nuage de particule 311 ns après l'exposition au laser par diffraction de la lumière à 90°[413]

Pour saisir les tenants et aboutissant de la phase d'ionisation, l'environnement doit être pris en considération car il évolue très rapidement, ainsi que sa densité qui varie et sa fenêtre temporelle d'action. En effet, bien que la durée d'une impulsion laser soit de l'ordre de la dizaine de nanoseconde (6 à 8 ns), l'expansion du nuage de particules généré se déroule sur une durée de plusieurs microsecondes (voir Figure 83 ci-dessous). Deux régimes fondamentaux d'ionisation sont possibles en fonction de la fluence du laser mise en jeu : l'ablation ou la désorption. Le régime dit d'ablation de la matière correspond à une forte fluence laser illustré dans la Figure 83 (voir ci-dessous) et la Figure 84 p.145. La limite est très ténue et il est plus intéressant de se placer dans des conditions qui permettent de s'assurer de l'un ou l'autre des régimes plutôt que de rester dans une zone incertaine dont les résultats pourraient dépendre très fortement d'autres facteurs (préparations des échantillons, dépôt, homogénéité …).

[413] A. Rohlfing, Untersuchungen Zum Deso Rptionsprozess in Der UV-Matrix-Unterstützten La Serdesorption/-Ionisation Mit Einer Flüssigmatrix, Dissertation, **2006**

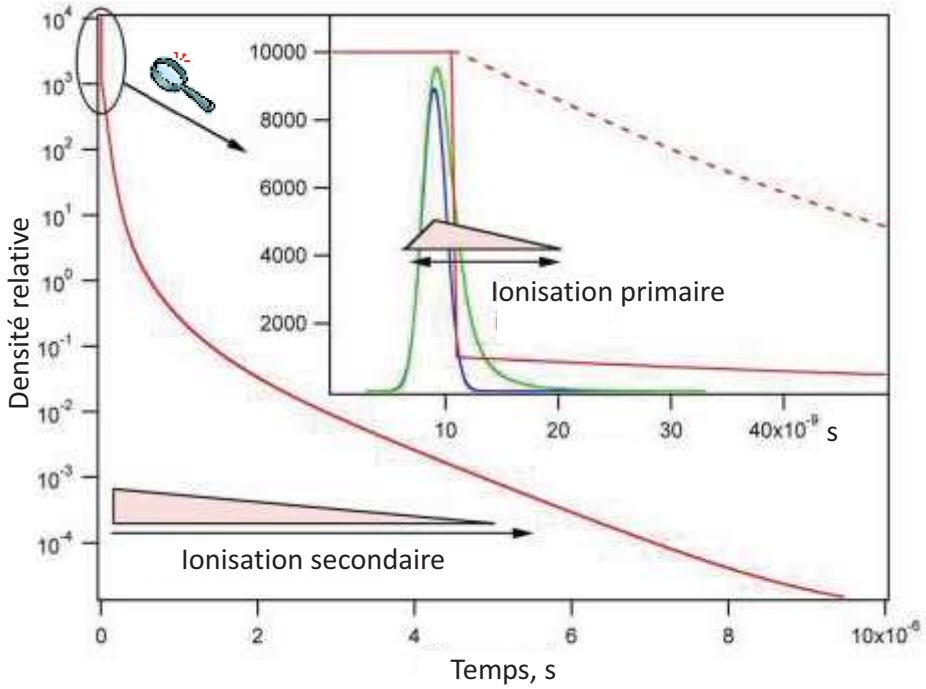


Figure 83 : Représentation de la densité de charges durant l'ionisation MALDI où la courbe bleue représente une impulsion laser, la courbe verte représente la population de molécules en état excité et la courbe rouge représente la densité relative du nuage de particules en expansion en fonction du temps. La ligne pointillée représente son évolution lors d'une phase « d'explosion » (l'ablation de matière) tandis que la ligne continue représente une phase d'évaporation douce (la désorption)

A chaque impulsion laser, une certaine quantité d'énergie est transférée au solide. Il ne faut toutefois pas omettre les différents processus de dissipation d'énergie qui interviennent dans la nature de l'extraction de matière (régime de désorption ou d'ablation) :

- La dissipation par conduction thermique, qui consiste en un transfert thermique de la radiation incidente à travers les différentes couches de matière traversées.
- La vague de pression thermoélastique qui est générée par le laser incident et qui se déplace à la vitesse du son. Dans un solide, celle-ci est comprise entre 1 000 et 5 000 $m.s^{-1}$ et avec une profondeur de pénétration de l'ordre de la centaine de nanomètre (pour un laser UV) cela donne une constante de temps inférieure à la centaine de picosecondes, bien plus court que l'impulsion laser qui est de l'ordre de quelques nanosecondes, qui donne lieu à une « explosion » de matière par rebond (ou vague d'expansion) : l'ablation de particules de la zone de dépôt (voir Figure 84 ci-dessous et Figure 85 p.146). Même observation dans le cas d'un laser IR avec une pénétration de l'ordre du micromètre et une impulsion laser de l'ordre de la nanoseconde. Cela créerait une onde accoustique de l'ordre de la femtoseconde au maximum, qui va

être capable par des rebonds dans la phase solide de participer activement au processus d'ablation.[414]

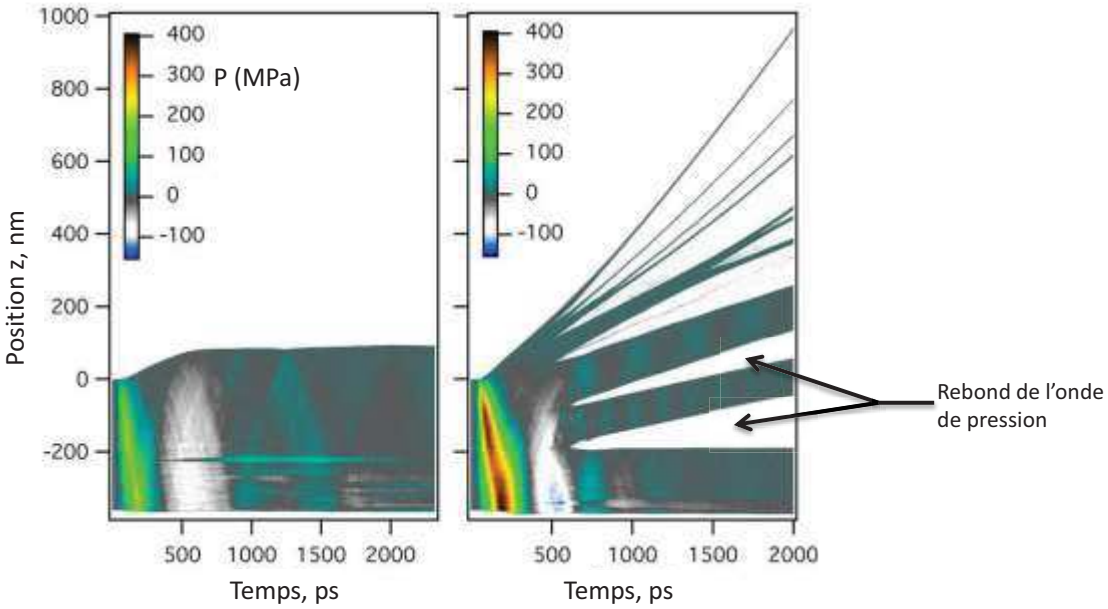


Figure 84 : Illustration des phases de désorption et d'explosion en MALDI avec la représentation de la hauteur par rapport au temps calculée par dynamique moléculaire pour deux énergies d'impulsion laser et une coloration en fonction de la pression. A gauche, une faible énergie mène à une expansion et une évaporation douce à partir de la surface du dépôt ; tandis qu'une forte énergie d'impulsion laser entraîne une phase explosive et l'éjection de « clusters » dans les couches supérieures. De plus la vague de pression après rebond sur la plaque de dépôt, est suffisamment puissante pour casser le dépôt froid jusqu'à une profondeur importante, ce qui entraîne l'éclatement en fines couches

C'est cet ensemble de particules éjectées (matrice et analyte en phase gaz, blocs de matière condensés …) qui compose le nuage particulaire en expansion (« plume » en Anglais) dans lequel se déroulent les processus fondamentaux qui mènent à la vaporisation des blocs de matière et l'ionisation finale des molécules de matrice et d'analyte observés. La très courte période suivant l'impulsion laser est caractérisée par une forte densité et une forte énergie (transmise par le laser) qui permet aux processus à haute énergie de se dérouler, c'est l'ionisation primaire. S'en suit la réaction de ces ions primaires avec des molécules neutres du nuage particulaire, c'est l'ionisation secondaire. Ces deux processus sont discutés plus en détails au paragraphe II p.158. Une fois les composés présents dans les dépôts ablatés, ceux-ci sont transférés dans l'analyseur.

[414] F. Hillenkamp, J. Peter-Katalinić, Eds. , *MALDI MS: A Practical Guide to Instrumentation, Methods and Applications*, Wiley - VCH, Weinheim, **2009**

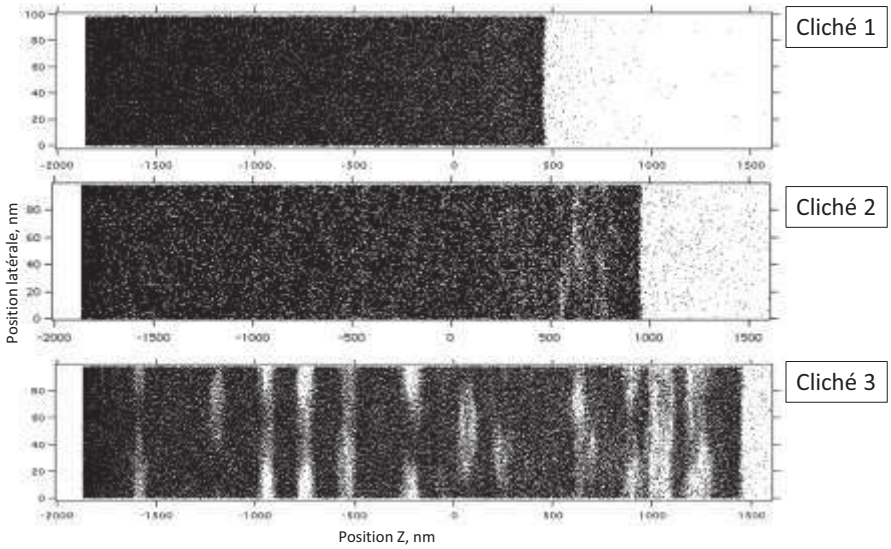


Figure 85 : Représentation de la phase d'explosion en MALDI par des clichés latéraux de simulation en dynamique moléculaire en fonction du temps (Cliché 1, 2 puis 3). Le laser incident provient de la droite. Durant le réchauffement du dépôt et son expansion sous l'effet de la vague de compression engendrée par le laser, les molécules commencent par se désorber doucement (cliché 1). Puis la nucléation profonde sous haute pression dans les couches inférieures du dépôt débute (cliché 2). Enfin, le cliché 3 montre l'effet de la vague d'expansion (après rebond) et la formation de bulles de vapeur denses sous la surface qui marque le début de la phase d'ablation[415]

I.C. Les matrices au cœur de l'analyse MALDI : propriétés et préparation

En MALDI la préparation de la surface est un autre point clé de la réussite de l'analyse car elle a une forte influence sur la sensibilité de la détection notamment en fonction de l'homogénéité du dépôt. Nous allons à présent discuter des classes de matrice, de leurs propriétés et des techniques de dépôt développées.

I.C.1. Des classes de matrice adaptées aux analytes cibles

Au cours du développement de petites molécules organiques en tant que matrices, certaines se sont révélées plus efficaces que d'autres pour former des ions à partir de biomolécules de catégories différentes. Ce qui a entraîné un classement des matrices en fonction de leurs cibles et de leur capacité à produire des ions à partir d'échantillons divers. Ainsi, il existe des matrices adaptées à l'ionisation des peptides et protéines (voir Tableau 12 p.147), des sucres y compris des glycopeptides et glycoprotéines, des acides nucléiques, des lipides et glycolipides sans oublier les polymères synthétiques. Nous nous intéresserons uniquement aux matrices adaptées à l'étude des protéines et peptides, ces derniers faisant l'objet des travaux de cette thèse.

Pour l'analyse de ces objets moléculaires deux groupes principaux de matrice ont démontré leurs capacités, à savoir l'acide 2,5-dihydroxybenzoïque et les dérivés de l'acide cinnamique. Le premier a fait l'objet d'études qui ont démontré sa capacité à ioniser de grosses protéines comme l'albumine d'œuf de poule avec une amélioration des performances lorsqu'un additif, l'acide 2-

[415] R. Knochenmuss, "Phase explosion in MALDI," can be found under http://www.rknochenmuss.ch/MALDI/F3.jpg.

hydroxy-5-méthoxybenzoïque était ajouté à hauteur de 1 à 10 %.[416,417] La seconde classe de matrice construite autour de l'acide cinnamique compte plusieurs membres dont l'acide sinapinique et l'acide 4-hydroxy-α-cyanocinnamique (voir Tableau 12 p.147).[418,419,420] A noter qu'il a été observé une facilité particulière des peptides, naturels ou synthétiques, à se fragmenter facilement lorsque cocristallisés avec la matrice HCCA par mécanisme PSD et même ISD.[421]

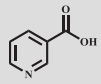
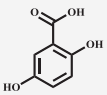
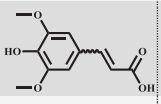
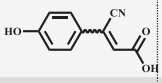
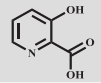
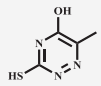
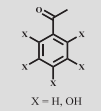
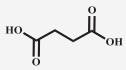
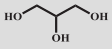
Domaine spectral	Longueur d'onde de travail	Matrice	Structure	Molécules cibles principales
Ultraviolet	266 nm	Acide nicotinique		Protéines, peptides, formation d'adduits
	337 nm ; 353 nm	Acide 2,5-dihydroxybenzoïque (DHB ; + 1-10 % d'acide 2-hydroxy-5-méthoxybenzoïque)		Protéines, peptides, sucres, polymères de synthèse
		Acide sinapinique (AS)		Protéines, peptides
		Acide 4-hydroxy-α-cyanocinnamique (HCCA)		Peptides, fragmentation
		Acide 3-hydroxypicolinique		Acides nucléiques
		6-aza-2-thiothymine		Protéines, peptides, complexes non covalents
		Pentahydroxyacétophénone (solution à pH quasi neutre)		Protéines, peptides, complexes non covalents
Infrarouge	2,79 µm ; 2,94 µm	Acide succinique		Protéines, peptides
		Glycérol (matrice liquide)		Protéines, peptides

Tableau 12 : Résumé des structures des principales matrices utilisées pour l'analyse de biomolécules, leur domaine spectral et la longueur d'onde de travail

[416] M. Karas, H. Ehring, E. Nordhoff, B. Stahl, K. Strupat, F. Hillenkamp, M. Grehl, B. Krebs, *Organic Mass Spectrometry* **1993**, *28*, 1476–1481
[417] K. Strupat, M. Karas, F. Hillenkamp, *International Journal of Mass Spectrometry and Ion Processes* **1991**, *111*, 89–102
[418] R. C. Beavis, B. T. Chait, H. M. Fales, *Rapid Communications in Mass Spectrometry* **1989**, *3*, 432–435
[419] R. C. Beavis, B. T. Chait, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **1990**, *87*, 6873–6877
[420] R. C. Beavis, T. Chaudhary, B. T. Chait, *Organic Mass Spectrometry* **1992**, *27*, 156–158
[421] J. J. Gorman, B. L. Ferguson, T. B. Nguyen, *Rapid Communications in Mass Spectrometry* **1996**, *10*, 529–536

I.C.2. A propos des propriétés des matrices

L'essence de la technique MALDI est la matrice, généralement en excès par rapport à l'analyte (≈ 1 000 fois) et est co-ablatée/co-désorbée avec ce dernier sous impulsion laser. Grâce à un important travail sur la découverte de matrices (voir annexe Partie D – Annexes, paragraphe I p.473), un certain nombre de qualités peuvent être résumées pour faire la différence entre une bonne et une mauvaise matrice (voir Tableau 13 ci-dessous). Il a notamment été démontré qu'une évaporation rapide du solvant organique contenant la matrice HCCA permettait d'obtenir des couches de cristaux homogènes. Pour obtenir des spectres de masse de bonne qualité l'analyte doit être bien incorporé aux cristaux de matrice. Cela permet une transmission efficace de l'énergie absorbée par la matrice à l'analyte, élément essentiel pour l'ionisation de ce dernier.[422]

Propriété	Qualité pour une bonne matrice
Solubilité	La matrice doit être soluble dans un solvant ou tout système de solvant permettant la solubilisation de l'analyte.
Absorptivité	Cette propriété est liée à la capacité de la matrice à absorber la radiation incidente (impulsion laser). Typiquement il s'agit de petites molécules organiques avec un système aromatique (chromophore) possédant un haut coefficient d'absorption molaire (ε_λ) à la longueur d'onde du laser.
Réactivité	La matrice doit être chimiquement inerte par rapport à l'analyte, servir d'agent de protonation, de déprotonation ou d'agent électrodonneur ou électroattracteur. Un composé lié de manière covalente à un analyte ne peut pas être considéré comme une matrice.
Volatilité	La matrice doit posséder une pression de vapeur saturante suffisamment basse pour limiter la vaporisation dans la source sous vide (propriété non considérée en AP-MALDI) tout en se sublimant facilement sous impulsion laser.
Ablation	La matrice doit faciliter la co-ablation/co-désorption d'un analyte sous impulsion laser.

Tableau 13 : Propriétés intrinsèques de molécules pouvant être considérées comme des bonnes matrices MALDI

I.C.3. Matrice chaude ou matrice froide, quelle différence ?

L'expression de matrice chaude et matrice froide provient de la caractérisation initiale des matrices selon leur capacité plus ou moins prononcée à induire la fragmentation de glycoprotéines. Dans l'étude de Karas et al de 1995 les matrices sont classées selon leur capacité à induire une fragmentation de type PSD : HCCA (matrice chaude) > AS > DHB (matrice froide).[423] Cela proviendrait, selon les auteurs, de l'énergie transmise aux analytes dans le nuage particulaire en expansion qui serait plus importante dans le cas d'un nuage plus dense car étant le théâtre de bien plus nombreuses collisions entre molécules de matrice et d'analyte ; cette densité serait bien

[422] O. Vorm, P. Roepstorff, M. Mann, *Analytical Chemistry* **1994**, *66*, 3281–3287
[423] M. Karas, U. Bahr, K. Strupat, F. Hillenkamp, A. Tsarbopoulos, B. N. Pramanik, *Analytical Chemistry* **1995**, *67*, 675–679.

évidemment variable en fonction de la matrice choisie. L'excès d'énergie résiduelle correspondrait alors à la différence d'affinité protonique entre l'analyte et la matrice en phase gazeuse. Cependant une autre étude de Luo et al. en 2002 a montré des résultats opposés, à savoir que l'HCCA serait une matrice froide et le DHB une matrice chaude.[424] Cette étude s'est servie de sels de benzylpyridinium comme thermomètres moléculaires pour mesurer l'énergie transférée de la matrice à l'analyte. Des travaux complémentaires menés par Gabelica et al en 2004[425] ont révélé que la « température » d'une matrice était corrélée à sa température de sublimation et que trois contributions distinctes à l'énergie interne des ions formés pouvaient être décrites grâce à des études en MALDI-MS sous vide et AP-MALDI :

- Une contribution par activation thermique dans le nuage particulaire en expansion.
- Une contribution par activation chimique avec la réaction de radicaux d'hydrogène dans le nuage particulaire en expansion.
- Une contribution par activation collisionnelle des ions avec les composants neutres du nuage particulaire en expansion, induite par l'extraction du dépôt des particules.

I.C.4. Les techniques de dépôts développées

La manipulation de la matrice est souvent considérée comme une des plus importantes étapes dans la préparation d'analyses MALDI, dont la qualité a un impact direct sur le résultat final. Des effets indésirables peuvent parfois apparaître si la plus grande attention n'est pas portée à la préparation des échantillons comme les effets de discrimination et de suppression spectrale qui seront discutés au paragraphe II.E.3 p.181. Les préparations de matrice peuvent être regroupées en trois catégories principales :

- Préparation de matrices solides (nous nous limiterons à ces techniques).[426]
- Préparation de matrices liquides.[427,428]
- Préparation de matrices particulières (support solide et échantillons insolubles).

[424] G. Luo, I. Marginean, A. Vertes, *Analytical Chemistry* **2002**, *74*, 6185–6190
[425] V. Gabelica, E. Schulz, M. Karas, *Journal of Mass Spectrometry* **2004**, *39*, 579–593
[426] E. Nordhoff, M. Schürenberg, G. Thiele, C. Lübbert, K.-D. Kloeppel, D. Theiss, H. Lehrach, J. Gobom, *International Journal of Mass Spectrometry* **2003**, *226*, 163–180
[427] S. Zhao, K. V. Somayajula, A. G. Sharkey, D. M. Hercules, F. Hillenkamp, M. Karas, A. Ingendoh, *Analytical Chemistry* **1991**, *63*, 450–453
[428] E. T. P. Sze, T.-W. D. Chan, G. Wang, *Journal of the American Society for Mass Spectrometry* **1998**, *9*, 166–174

Technique	Principe	Avantage	Inconvénient	Illustration
Goutte séchée	Introduite par le Pr. Karas et le Pr. Hillenkamp en 1988, elle consiste à déposer une goutte de solution de matrice et une goutte de solution d'analyte par-dessus sans séchage intermédiaire.	Bonne tolérance à certains sels et aux tampons.	Agrégation possible de cristaux à la lisière de la goutte déposée rendant le dépôt inhomogène.	**1 - Goutte de matrice en solution** **2 - Goutte de solution d'analyte** **3 - Séchage**
Cristal écrasé[429]	Extension de la méthode de la goutte séchée développée pour déposer des échantillons dopés en analyte en présence de solvants à haute concentration (glycérol, DMSO …).	Formation de films uniformes, bonne production d'ions et bonne reproductibilité par rapport à la goutte séchée.	Augmentation du temps de préparation.	**1 - Goutte de matrice en solution** **2 - Goutte de solution d'analyte contenat un solvant visqueux (glycérol, DMSO ...)** **3 - Séchage**
Evaporation rapide[430]	Technique développée par Vorm O., Roepstorff P. et Mann M. Elle consiste à déposer une solution de matrice dans un solvant organique à évaporation rapide (e.g : acétone) puis une goutte d'analyte après séchage de la solution de matrice par-dessus.	Préparation des surfaces de matrice en avance. Distribution homogène de la matrice et de l'analyte qui permet une acquisition plus rapide des données.	La matrice doit être soluble dans un solvant organique à évaporation rapide.	**1 - Goutte de matrice en solution (solvant organique à évaporation rapide)** **2 - Séchage** **3 - Goutte de solution d'analyte** **4 - Séchage**
Couche mince[431]	Développée à partir de la combinaison des deux méthodes précédentes (cristal écrasé et évaporation rapide).	Haute sensibilité en détection, haute reproductibilité et meilleure isolation entre les molécules d'analyte grâce à un dépôt matrice-analyte sur la couche de matrice.	La matrice doit être partiellement soluble dans le solvant qui contient l'analyte pour se resolubiliser en partie et former cette couche mixte matrice-analyte.	**1 - Goutte de matrice en solution (solvant organique à évaporation rapide)** **2 - Séchage** **3 - Goutte de solution d'analyte contenat un solvant visqueux (glycérol, DMSO ...)** **4 - Séchage**

[429] F. Xiang, R. C. Beavis, W. Ens, *Rapid Communications in Mass Spectrometry* **1994**, *8*, 199–204
[430] O. Vorm, P. Roepstorff, M. Mann, *Analytical Chemistry* **1994**, *66*, 3281–3287
[431] Y. Dai, R. M. Whittal, L. Li, *Analytical Chemistry* **1996**, *68*, 2494–2500

Technique	Principe	Avantage	Inconvénient	Illustration
Sandwich[432]	Développée à partir de la combinaison de la méthode couche mince et évaporation rapide. Cela consiste à effectuer un dépôt couche mince puis de rajouter une couche de matrice par-dessus.	La couche de matrice supérieure, par pénétration de l'impulsion laser permet d'obtenir des molécules de matrices excitées/ionisée en nombre important à l'atteinte de la couche contenant l'analyte, permettant un transfert d'énergie plus efficace.	Temps de préparation augmenté.	1 - Goutte de matrice en solution (solvant organique à évaporation rapide) 2 - Séchage 3 - Goutte de solution d'analyte contenat un solvant visqueux (glycérol, DMSO ...) 4 - Séchage 5 - Goutte de solution de matrice 6 - Séchage
Enduction centrifuge[433]	Technique développée par Kantarzoglou et al. en 1995. Elle consiste à déposer un échantillon contenant l'analyte et la matrice pré mélangés sur une surface circulaire métallique mise ensuite en rotation pour uniformément répartir la goutte grâce à la force centrifuge (voir Figure 86 p.152).	Hautement reproductible, cette méthode génère également un nombre très important d'ions dans la gamme 5 – 150 kTh.	Temps de préparation augmenté, coût de l'équipement particulier.	
Electrospray[434,435]	Cette technique permet de déposer par électrospray une solution pré mélangée d'analyte et de matrice sur une large surface à 0,5 – 3 cm de distance d'une plaque reliée au potentiel de la terre (voir Figure 87 p.152).	Très avantageuse pour de l'imagerie MALDI de coupes de tissus car permettant une répartition rapide et large de la solution déposée	Peu adaptée aux échantillons précieux et aux faibles volumes.	
Couche préenduite[436,437]	Cette technique consiste à déposer un échantillon d'analyte directement sur une surface sur laquelle est déposée une membrane pré enduite de matrice.	Interfaçage possible du MALDI avec l'électrophorèse capillaire et la chromatographie liquide. Gain de temps au moment du dépôt.	Développement de membranes inertes chimiquement et vis-à-vis des impulsions laser.	1 - Goutte d'analyte en solution 2 - Séchage

Tableau 14 : Résumé des principales techniques de dépôt

[432] M. Kussmann, E. Nordhoff, H. Rahbek-Nielsen, S. Haebel, M. Rossel-Larsen, L. Jakobsen, J. Gobom, E. Mirgorodskaya, A. Kroll-Kristensen, L. Palml, et al., *Journal of Mass Spectrometry* **1997**, *32*, 593–601
[433] I. K. Perera, J. Perkins, S. Kantartzoglou, *Rapid Communications in Mass Spectrometry* **1995**, *9*, 180–187
[434] R. M. Caprioli, T. B. Farmer, J. Gile, *Analytical Chemistry* **1997**, *69*, 4751–4760
[435] S. Mowthorpe, M. R. Clench, A. Cricelius, D. S. Richards, V. Parr, L. W. Tetler, *Rapid Communications in Mass Spectrometry* **1999**, *13*, 264–270
[436] L. M. Preston, K. K. Murray, D. H. Russell, *Biological Mass Spectrometry* **1993**, *22*, 544–550
[437] H. Zhang, R. M. Caprioli, *Journal of Mass Spectrometry* **1996**, *31*, 690–692

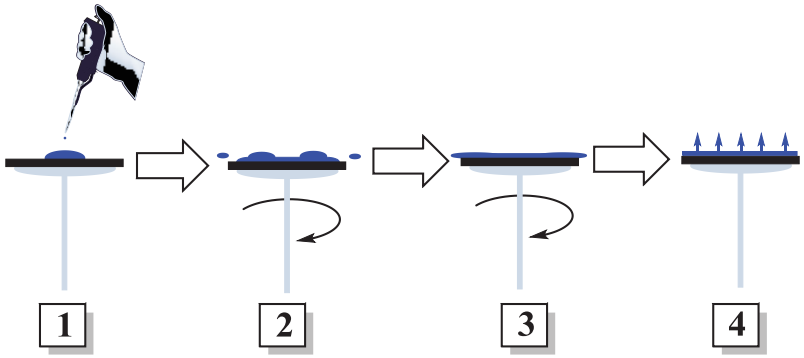


Figure 86 : Principe de l'enduction centrifuge où une goutte de solution contenant la matrice et l'analyte pré mélangés est déposée sur un support (1) mis en rotation (2) pour uniformément répartir la goutte sur l'ensemble du dépôt (3) avant analyse (4)

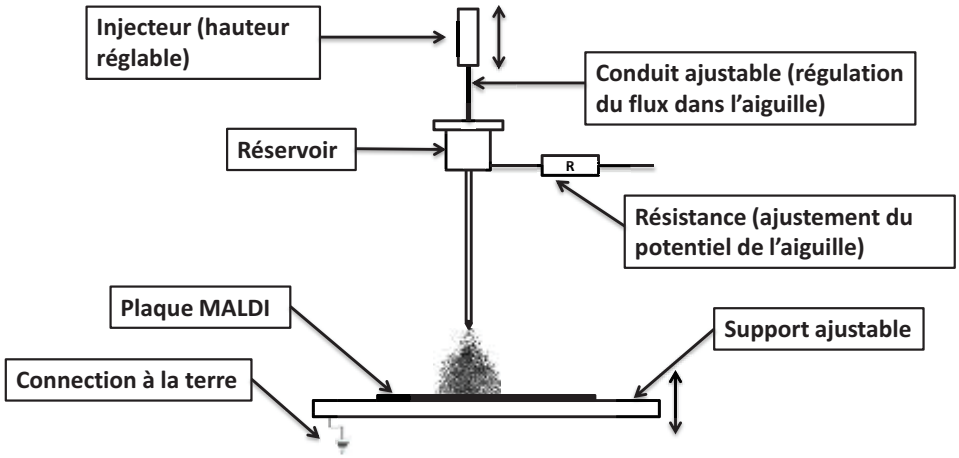


Figure 87 : Schéma du dépôt d'un mélange matrice/analyte par électrospray qui permet une reproductibilité améliorée et une intensité de signal accrue en MALDI

I.D. L'analyse MS1 en MALDI-ToF

L'analyseur est la partie instrumentale qui suit la source et dans laquelle va s'opérer la séparation des ions avant d'arriver au détecteur. L'analyseur le plus largement couplé à la source MALDI est le temps de vol (ToF pour « Time of Flight ») grâce à sa très large gamme de masse allant de la centaine à environ 500 000 Thomson selon les méthodes standard. L'intérêt du ToF réside également dans l'ionisation des molécules par impulsions laser. Cela permet, avec l'ajout d'un délai de post-extraction, de transférer les ions résultant d'une série de tirs simultanément dans l'analyseur. En outre, l'ajout d'un réflectron, ou miroir ionique, permet d'améliorer la résolution au-delà de 20 000 pour les appareils commerciaux récents.

Il existe différents analyseurs. Le plus commun d'entre eux, le ToF axial permet aux particules ionisées d'être immédiatement transférées et accélérées dans une zone sans champ avant d'atteindre un détecteur tel qu'une plaque à micro canaux. Le courant ionique est alors tracé en fonction du temps d'arrivée grâce à un oscilloscope (voir Figure 88 ci-dessous). Pour que la détection soit efficace, les scans de l'oscilloscope doivent être lancés au bon moment ; c'est pour cela qu'un

miroir semi-réfléchissant est utilisé pour déclencher le scan de l'oscilloscope grâce à une photodiode au moment où les ions sont générés. Les ions sont ensuite accélérés pour obtenir la même énergie cinétique décrite par l'Equation 4 ci-dessous.

$E_c = z.e.U$, avec z, l'état de charge ; e, la charge élémentaire et U la tension (20 kV en général)

Equation 4 : Energie cinétique acquise par les ions formés à partir d'une source MALDI et accélérés par une différence de potentiel U

Ils vont alors acquérir, grâce à cette énergie, une vitesse qui va dépendre de leur masse qui peut être utilisée pour obtenir le temps d'arrivée de chaque molécule ionisée au détecteur (voir Equation 5 ci-dessous). Il est alors possible de réorganiser cette expression pour voir apparaître le rapport m/z traditionnellement représenté sur les spectres de masse (voir Equation 5 ci-dessous). La démonstration de ces relations est consultable en Partie E – ***Annexes***, paragraphe II.A.2 p.478).

$t = L\sqrt{\frac{m}{2.E_c}} = L\sqrt{\frac{m}{2.z.e.U}}$, avec m, la masse de l'ion et L la longueur du tube de vol

$$\frac{m}{z} = 2eU(t/L)^2$$

Equation 5 : Equations donnant le temps d'arrivée de chaque ion au détecteur et la relation liant le rapport m/z caractéristique de chaque ion à son temps d'arrivée

Cependant, les particules vont être extraites de leur dépôt avec une énergie cinétique initiale non nulle. De plus la surface n'étant pas parfaitement plate, les particules auront des positions différentes dans le nuage particulaire et donc des vitesses différentes après accélération. Cela va créer, à partir d'une dispersion spatiale, une dispersion temporelle que l'on retrouve dans l'expression du rapport m/z et donc des pics plus ou moins larges sur le spectre de masse. Il est toutefois possible de corriger ce problème de résolution. La première solution pour réduire cette dispersion est d'ajouter un délai d'extraction en conservant un champ électrique entre la première électrode et l'échantillon ; le temps que les particules soient extraites pour ensuite appliquer une différence de potentiel et les accélérer.

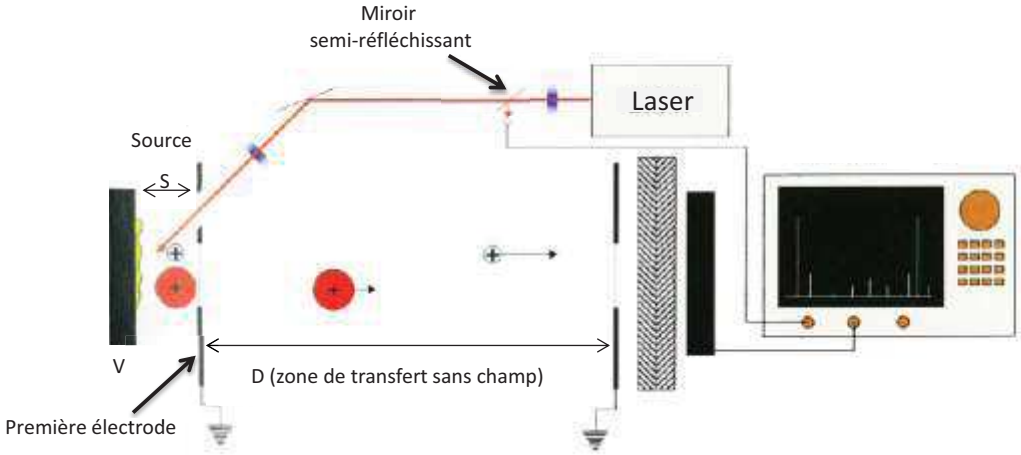


Figure 88 : Schéma décrivant le principe de fonctionnement du MALDI-ToF en mode axial

Une seconde solution pour réduire cette dispersion est l'utilisation d'un miroir ionique composé de lentilles électrostatiques à différents potentiels dont le rôle est de renvoyer les ions vers un deuxième détecteur. Les plus rapides s'enfoncent plus en avant dans ce réflectron que les plus légers et sont renvoyés avec la même énergie cinétique et la même vitesse pour les ions de même masse, ce qui permet de refocaliser ces derniers et de diminuer la dispersion spatiale pour augmenter la résolution (voir Figure 89 ci-dessous).

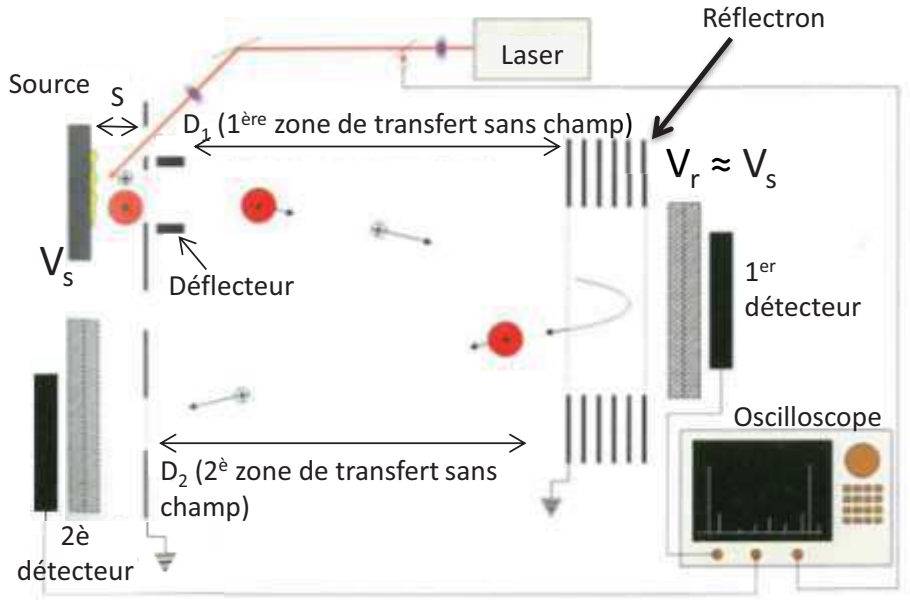


Figure 89 : Schéma d'un instrument de type MALDI-ToF linéaire combiné à un réflectron. L'appareil est constitué de deux zones de transfert d'ions sans champ, la première à destination du 1er détecteur et la seconde lorsque le réflectron est activé

I.E. L'analyse MS^2 en MALDI-ToF

Pour obtenir des fragments d'ion en spectrométrie de masse en tandem dans un appareil de type MALDI-ToF, il faut pouvoir briser des liaisons covalentes. Plusieurs méthodes de fragmentation sont alors possibles :

- La fragmentation en source (ISD, voie B Figure 90 ci-dessous) : elle correspond à une prompte fragmentation induite par la production de radicaux ou par réaction thermique suite à la propagation de l'onde thermoélastique dans le dépôt.[438] L'intérêt de cette fragmentation est la possibilité d'effectuer de la pseudo MS^3 sur les fragments les plus intenses étant donné que les premiers ions transférés sont déjà des fragments qui peuvent ensuite être à nouveau fragmentés. Cette technique a été appliquée sur des biomolécules et notamment des protéines dans le but d'étudier des modifications d'acides aminés.[439]

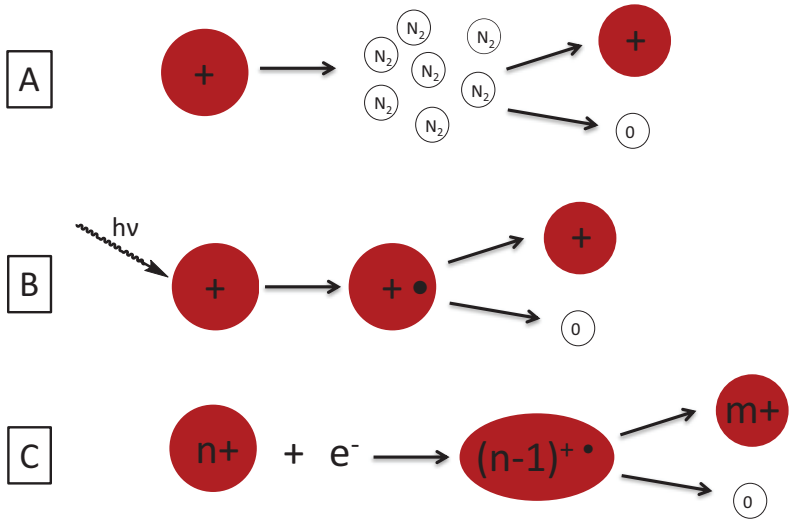


Figure 90 : Représentation des trois voies principales de fragmentation en MS^2 avec A, la dissociation induite par collision (CID) ; B, la photodissociation et C, l'ensemble des réactions de dissociation avec assistance d'un électron (EXD : ECD, ETD, EID, EDD…)

- La fragmentation post-source (PSD, voie B Figure 90 ci-dessus) : Lorsque la réaction de fragmentation est trop lente pour avoir lieu en source mais suffisamment rapide pour s'opérer avant la détection, il est alors question de fragmentation post-source mettant en jeu des ions plus connus sous l'appellation « ions métastables ».[440,441] Le problème majeur de ce type d'expérimentation étant la complexité des spectres de fragmentation qui requièrent donc une paire d'électrodes pour filtrer une partie des ions dans fenêtre de masse définie. Il s'agit en général de faire un compromis entre

[438] D. Debois, N. Smargiasso, K. Demeure, D. Asakawa, T. A. Zimmerman, L. Quinton, E. De Pauw, *Top Curr Chem* **2013**, *331*, 117–141
[439] L. Sellami, O. Belgacem, C. Villard, M. E. Openshaw, P. Barbier, D. Lafitte, *Analytical Chemistry* **2012**, *84*, 5180–5185
[440] B. Spengler, *Journal of Mass Spectrometry* **1997**, *32*, 1019–1036
[441] S. H. Yoon, J. H. Moon, M. S. Kim, *Journal of the American Society for Mass Spectrometry* **2010**, 1876–1883.

la largeur de la fenêtre de masse et la transmission de la porte électrostatique.[442] A titre d'exemple, la transmission d'un signal monoisotopique aura pour conséquence de ne laisser passer qu'une faible partie de celui-ci, probablement sous la barre des 50 %. Une manière d'effectuer la fragmentation PSD se fait via une cellule dite « lift » qui va augmenter l'énergie cinétique des fragments pour réduire la différence entre celle-ci et leur énergie totale ayant pour conséquence l'amélioration de la résolution.[443]

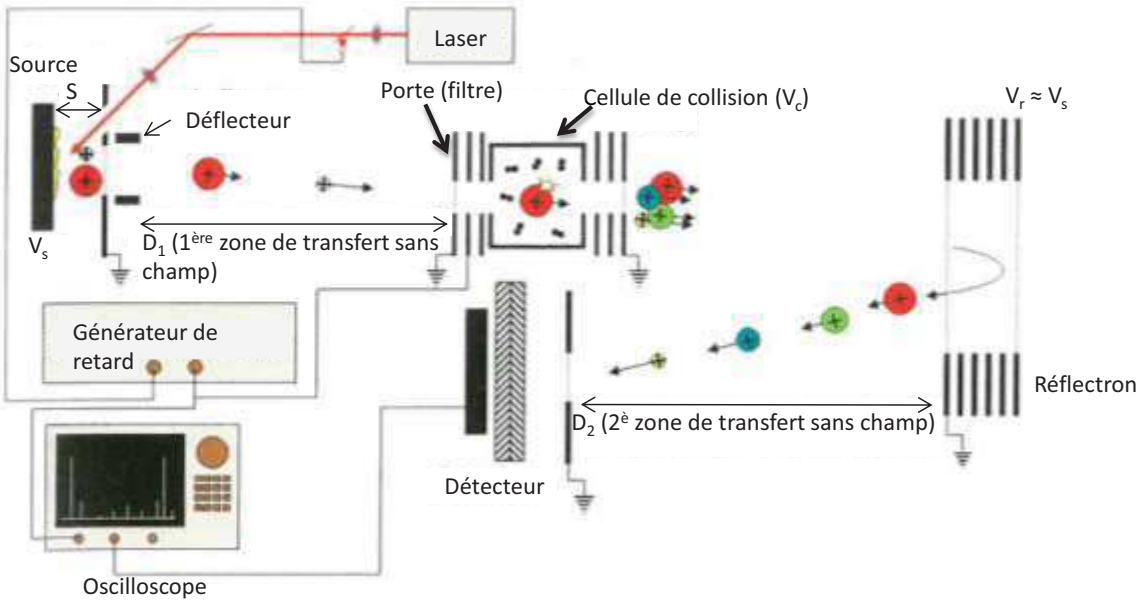


Figure 91 : Schéma d'un instrument de type MALDI-ToF/ToF pour la spectrométrie de masse en tandem

- La fragmentation par collision (CID/CAD, voie A Figure 90 p.155) : cette méthode permet d'obtenir davantage de fragments comparés aux méthodes ISD et PSD. Elle s'effectue grâce à des collisions avec des gaz neutres dans une cellule dédiée à cela (voir Figure 91 ci-dessus). La première zone de déplacement des ions permet de les séparer en groupes de différents rapports m/z avant l'arrivée à une porte qui s'ouvre pendant un cours laps de temps pour laisser passer les ions précurseurs choisis. Leur énergie cinétique est contrôlée dans la chambre de collision en ajustant le potentiel de celle-ci. A titre d'exemple, si une source génère des ions avec une énergie cinétique de 10 keV et que la tension de la cellule est réglée à 9,5 kV, cela permet aux ions d'effectuer des collisions à une énergie de 500 eV. Il est possible de faire varier cette énergie de collision de 0 à 100 eV (CID basse énergie) ou de 2 à 10 keV

[442] S. H. Yoon, J. H. Moon, K. M. Choi, M. S. Kim, *Rapid Communications in Mass Spectrometry* **2006**, *20*, 2201–2208
[443] D. Suckau, A. Resemann, M. Schuerenberg, P. Hufnagel, J. Franzen, A. Holle, *Analytical and Bioanalytical Chemistry* **2003**, *376*, 952–965

(CID haute énergie) en fonction des objectifs recherchés. En effet, en CID basse énergie, seules les liaisons les plus fragiles seront fragmentées car nécessitant très peu d'énergie pour être brisée (e.g : liaison peptidique C-N) ; alors qu'en CID haute énergie les liaisons les plus fortes pourront être brisées (e.g : les liaisons C-C des chaînes latérales d'acides aminés).[444] La seconde zone de déplacement des ions permet alors la séparation temporelle des fragments avant l'arrivée sur le détecteur. L'étalonnage est alors un peu plus complexe car les fragments possèdent une énergie cinétique résiduelle provenant des ions précurseurs, raison pour laquelle une constante est ajoutée à l'équation (voir Equation 4 p.153).

Un système plus récent a été développé par la suite : le temps de vol orthogonal. Le principal apport de cette géométrie est l'extraction des ions qui se fait non pas dans l'axe de la source mais de manière perpendiculaire à la direction du mouvement initial. Cela est possible grâce à des impulsions de tension qui permettent d'envoyer le courant d'ion dans le tube de vol (voir Figure 92 ci-dessous). Cela permet d'éliminer l'impact de la vitesse initiale des ions pour obtenir une meilleure résolution (jusqu' à moins de 10 ppm), une meilleure précision de masse et un étalonnage plus simple. Cela a marqué le début de la construction d'instruments hybrides MALDI-QqQ-ToF dans lesquels le premier quadripôle sert uniquement à diminuer l'énergie cinétique des ions incidents et à les focaliser suivant l'axe du second quadripôle Q_1 (voir Figure 92 ci-dessous) avec une trajectoire définie. Ce second quadripôle sert alors de filtre pour sélectionner un ion précurseur qui sera fragmenté dans le troisième quadripôle Q_3 utilisé en tant que cellule de collision.

[444] K. F. Medzihradszky, J. M. Campbell, M. A. Baldwin, A. M. Falick, P. Juhasz, M. L. Vestal, A. L. Burlingame, *Analytical Chemistry* **2000**, *72*, 552–558

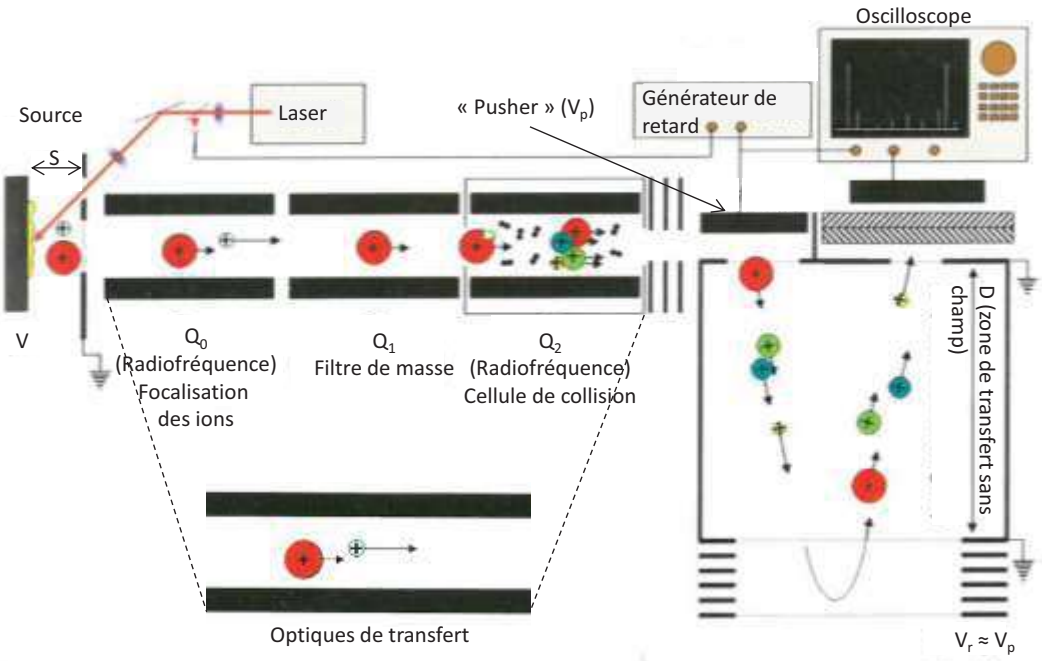


Figure 92 : Instrument hybride triple quadripôle et temps de vol (QqQ/ToF). Celui-ci est composé de trois quadripôles jouant un rôle passant (Q_0), filtrant (Q_1) et fragmentant (Q_2) tandis que le ToF orthogonal permet la migration et la séparation des fragments produits

II. Les modèles pour décrire l'ionisation MALDI

Dans ce paragraphe, nous allons discuter les différents modèles existant qui permettent de décrire le processus d'ionisation qui prend place en MALDI-MS. En ce qui concerne les différentes phases du processus d'ionisation, celles-ci donnent lieu à des débats très animés. Ces deux approches opposent les travaux du Pr Karas aux travaux du Dr Knochenmuss qui portent respectivement sur le modèle des clusters et le modèle de la fusion énergétique.

II.A. Le modèle des clusters aussi appelé « lucky survivor model »

Ce modèle part du principe que des biomolécules, comme des protéines ou des peptides, déposées avec une solution de matrice le soient sous forme chargée en conservant la charge obtenue en solution. Cette hypothèse se base sur l'observation d'indicateurs pH-métriques qui conservent leur coloration et leur état de charge après cocristallisation avec des matrices acides, neutres et même basiques comme en témoigne l'étude de Karas et al en 2001.[445] Dans ce modèle, presque toutes les biomolécules présentes dans le dépôt, dans le cas d'une matrice acide, afficheront un excès de charge positive avec des contre-ions tels que des trifluoroacétates ou des anions de matrice. De plus l'excès de charge doit être maintenu, et dans cette optique, le modèle postule une incorporation de l'analyte dans les cristaux. Cette hypothèse est en accord avec les processus de cristallisation rapide. En effet, d'après la théorie de la chaîne du solide humide, une croissance rapide de cristaux a pour conséquence l'incorporation de molécules de solvant qui sont alors

[445] R. Krüger, A. Pfenninger, I. Fournier, M. Glückmann, M. Karas, *Analytical Chemistry* **2001**, *73*, 5812–5821

potentiellement porteuse, dans le cas du MALDI, de molécules d'analytes sous forme solvatées et intégrées dans les cristaux. C'est une observation qui est connue par les mécanismes de croissance de cristaux et qui a également été modélisée.[446] Cette hypothèse est valide dans le cadre de ce modèle en partant du principe que le séchage des dépôts est suffisamment rapide pour engendrer une cristallisation elle aussi suffisamment rapide qui intègre sous forme solvatée les molécules d'analyte.

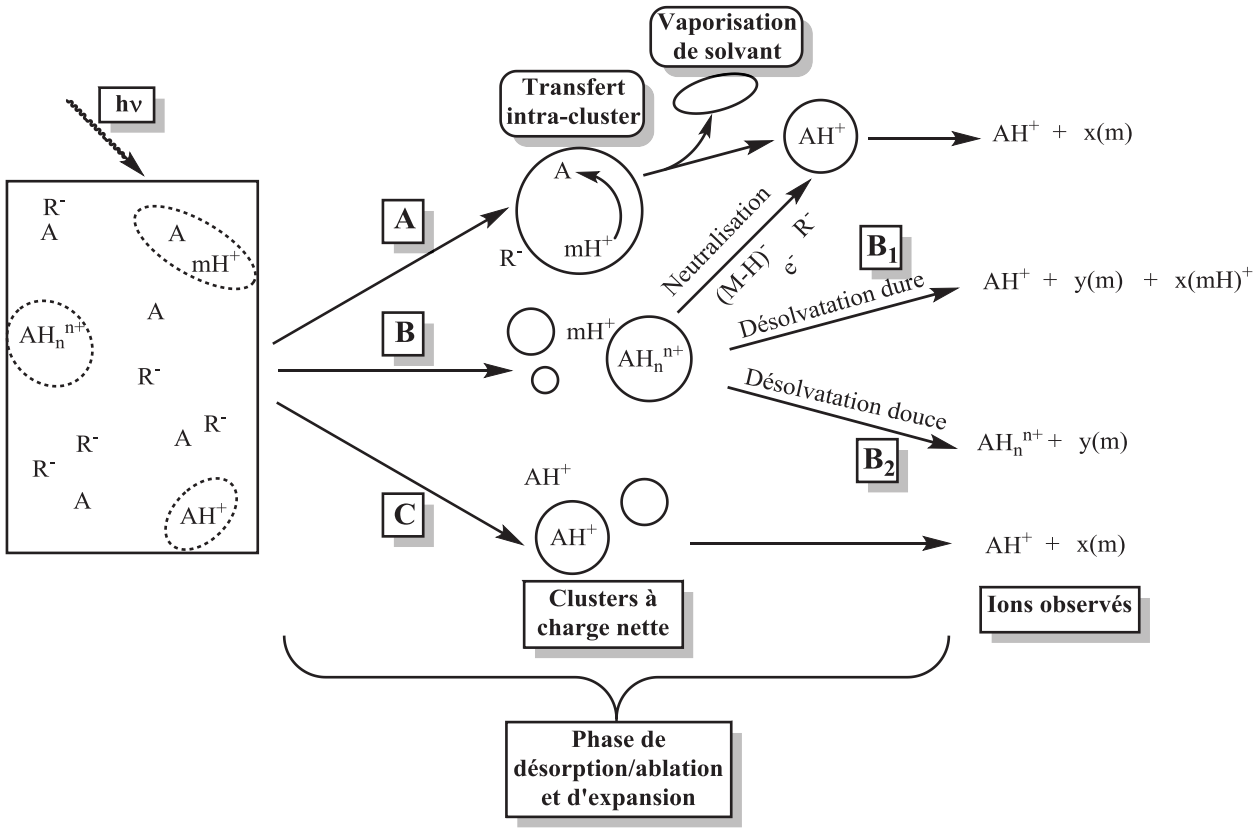


Figure 93 : Schéma des processus majeurs proposés dans le modèle des clusters ou « lucky survivor » en ionisation MALDI. A représente l'analyte, m la matrice et R^- un contre-ion générique

Dans un second temps le modèle postule une brisure de la phase cristalline en plus petits blocs de matière lors de la phase de désorption/ablation (voir Figure 93 ci-dessus). Globalement, certains de ces blocs afficheront une charge positive ou négative par déficit ou excès de contre-ion. Lors de la phase de désorption/ablation et d'expansion du nuage particulaire, les blocs de matière sont supposés perdre des molécules de matrice neutres et de solvant. Si l'analyte est déjà chargé, en l'occurrence par rétention de charge en solution, l'évaporation du cluster engendrera un ion libre en phase gazeuse (voie C, Figure 93 ci-dessus). Dans d'autres clusters la charge peut avoir besoin de migrer de sa localisation initiale, sur un ion de matrice par exemple, pour aller se fixer sur une zone plus favorable comme une molécule d'analyte (ionisation secondaire, voie A Figure 93, ci-dessus). En

[446] A. Gadomski, J. Łuczka, *Journal of Molecular Liquids* **2000**, *86*, 237–247

revanche, dans le cas d'ions multichargés, des voies de désolvatation douces et dures (respectivement voies B_1 et B_2, Figure 93 ci-dessus) mènent à différents ions libérés en phase gazeuse. Enfin, la neutralisation par des électrons ou des contre-ions est toujours possible sans être complète, menant alors à des ions monochargés dans le cas d'une désolvatation douce laissant le temps à cette réaction de se produire (voir Figure 94 ci-dessous).

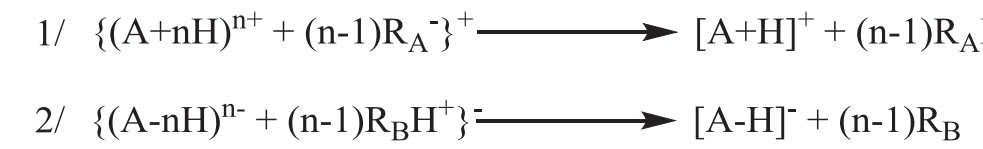


Figure 94 : Représentation mécanistique dans le modèle des clusters de la neutralisation des charges de peptides excepté pour l'excès de charge qui subsiste où A représente l'analyte, R_A^- un anion et R_AH son acide conjugué, R_B et R_BH^+ une base et son acide conjugué

Ces mécanismes de neutralisation permettent de comprendre, d'un point de vue mécanistique, pourquoi en MALDI on n'observe quasi exclusivement des ions monochargés et très peu d'ions dichargés ou plus en raison du faible excès de charges (positives ou négatives).

Une force du modèle des clusters est la justification de l'observation d'ions négatifs dans des conditions acides (1, Figure 95 ci-dessous) et inversement, de l'observation d'ions positifs dans des conditions basiques (2, Figure 95 ci-dessous). [447]

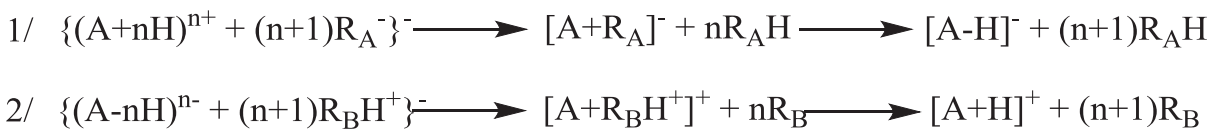


Figure 95 : Représentation mécanistique dans le modèle des clusters de la possibilité de former des ions négatifs à partir de conditions acides (1) et des ions positifs à partir de conditions basiques (2), où A représente l'analyte, R_A^- un anion et R_AH son acide conjugué, R_B et R_BH^+ une base et son acide conjugué

Ce type d'évènement n'a jamais été observé avec des solutés standards comme le TFA ou les sels d'ammonium mais uniquement lorsque des acides forts ont été utilisés comme l'acide perchlorique ($HClO_4$) ou le bis(trifluorométhylsulfonyl)imide (HTFSI) dont les basicités en phase gazeuse sont faibles (voir Tableau 15 ci-dessous). Ces observations s'expliquent par la supériorité de la basicité en phase gazeuse des bases anioniques sur celle des bases neutres (voir Tableau 15 ci-dessous) et qui, une fois au contact des analytes protonés dans le cas d'un milieu acide, opèrent le transfert de proton et la formation de l'analyte sous forme anionique.

[447] R. Krüger, M. Karas, *Journal of the American Society for Mass Spectrometry* **2002**, *13*, 1218–1226

Type de molécule		BG ($kJ.mol^{-1}$)
Base anionique	**CH_3COO^-**	1 429
	CF_3COO^-	1 325
	$TFSI^-$	1 221
	ClO_4^-	1 180
Base neutre	**Arginine (chaîne latérale)**	1 007
	Lysine (chaîne latérale)	952
	Histidine (chaîne latérale)	952
	Glycine (N-terminus)	852
	NH_3	847

Tableau 15 : Basicité en phase gazeuse (BG) de quelques bases anioniques et neutres tirées du site http://webbook.nist.gov/

II.B. Le modèle CPCD et la fusion énergétique ou « pooling effect»

Ce modèle a été développé par le Dr. R. Knochenmuss, initialement connu sous le nom de « Two-step ionisation model » ou « Two-step framework », a été modifié pour mieux correspondre aux phénomènes qu'il décrit, à savoir le modèle CPCD pour « Coupled Physical and Chemical Dynamics ». Ce nom a vocation à refléter la capacité du modèle à décrire de manière explicite tout le processus d'ionisation partant d'une phase condensée aux ions pseudo isolés en incluant les processus chimiques et physiques en interaction qui déterminent le résultat final.

Nous allons, au cours de ce paragraphe, discuter des deux étapes que ce modèle s'efforce de décrire, à savoir l'ionisation primaire et les mécanismes d'ionisation secondaire.

II.B.1. L'étape d'ionisation primaire

L'hypothèse avancée en UV-MALDI est l'absorption séquentielle de deux photons par la molécule de matrice, molécule capable d'absorber efficacement l'énergie UV. Ce phénomène est bien connu en physique et notamment en fluorescence où les fluorochromes sont capables d'absorber jusqu'à deux photons. Le problème, pour la matrice MALDI, provient du fait que les potentiels d'ionisation de presque toutes les matrices communément utilisées sont supérieurs à l'énergie absorbée via les deux photons (voir Tableau 16 p.162) produits par des lasers répandus comme les laser à N_2 (337 nm, 2 photons avec E_{hv} = 7,4 eV) et le Nd:YAG à fréquence triplée (355 nm, 2 photons avec E_{hv} = 7 eV). La même observation a été faite sur des clusters en phase condensée.[448] A partir de ces observations, l'énergie nécessaire à l'ionisation des molécules de matrice a été estimée à une valeur portée par 3 photons.

[448] R. Knochenmuss, A. Stortelder, K. Breuker, R. Zenobi, *Journal of Mass Spectrometry* **2000**, *35*, 1237–1245

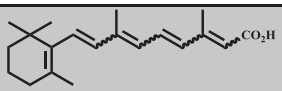
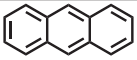
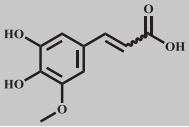
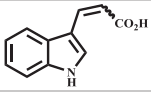
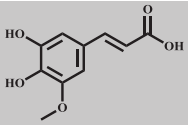
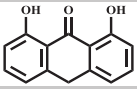
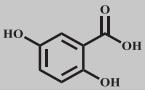
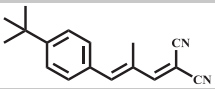
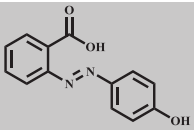
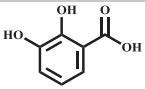
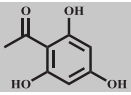
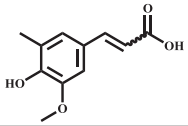
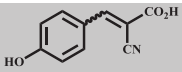
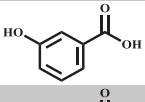
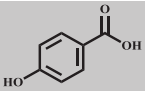
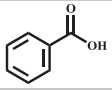
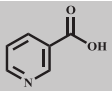
Matrice	Structure	PI mesuré (eV)	PI calculé (eV)
Acide rétinoïque			7,09
Anthracène		7,43	7,41
Acide sinapinique			7,72
Acide 3-indoleacrylique (IAA)			7,75
Acide 5-méthoxysinapinique		8,24	8,09
Dithranol (1,8-dihydroxyanthrone)			8,17
Acide 2,5-dihydroxybenoïque (DHB)[449]			8,19
DCTB (trans-2-[3-(4-tert-Butylphényl)-2-méthyl-2-propènylidène]malononitrile)			8,22
HABA (acide 2-(4'-hydroxybenzèneazo)benzoïque)			8,32
Acide 2,3-dihydroxybenzoïque		8,25	8,37
THAP (trihydroxyacétophénone)			8,44
Acide 5-méthylsinapinique		8,24	8,47
Acide 4-hydroxy-α-cyanocinnamique			8,50
Acide 3-hydroxybenzoïque		9,2	8,78
Acide 4-hydroxybenzoïque		9,2	8,83
Acide benzoïque		9,3	9,43
Acide nicotinique		9,3	

Tableau 16 : Potentiel d'ionisation PI des matrices (eV) [450]

[449] V. Karbach, R. Knochenmuss, *Rapid Communications in Mass Spectrometry* **1998**, *12*, 968–974

[450] A. Hoteling, W. Nichols, D. Giesen, J. Lenhard, R. Knochenmuss, *European Journal of Mass Spectrometry* **2006**, *12*, 345

La question qui se pose alors se résume à savoir comment l'ionisation des matrices est possible puisque l'on observe bien des ions. La réponse vient d'un processus de concentration d'énergie qui a été appelé fusion énergétique mais plus connu en anglais sous le terme de « pooling event ». Ce processus intervient lorsque deux molécules voisines sont suffisamment proches pour que leurs orbitales moléculaires puissent interagir entre elles (voir Figure 96 ci-dessous). Cela implique un contact des orbitales moléculaires du système aromatique π des molécules qui se trouvent dans un état solide, ordonné. Deux molécules voisines peuvent alors fusionner leur énergie sur l'une des deux en conservant la même énergie totale (1, voir Figure 96 ci-dessous). Si l'on considère uniquement des molécules excitées immobiles, le processus resterait insuffisant pour obtenir une ionisation efficace. Heureusement, l'énergie d'excitation possède la capacité de se déplacer dans la matrice solide, grâce à des sauts énergétiques de proche en proche ou « hopping ». Peu importe sur quelle molécule va être transférée cette énergie du moment qu'elle l'est sur une molécule voisine (voir 2 Figure 96 ci-dessous).

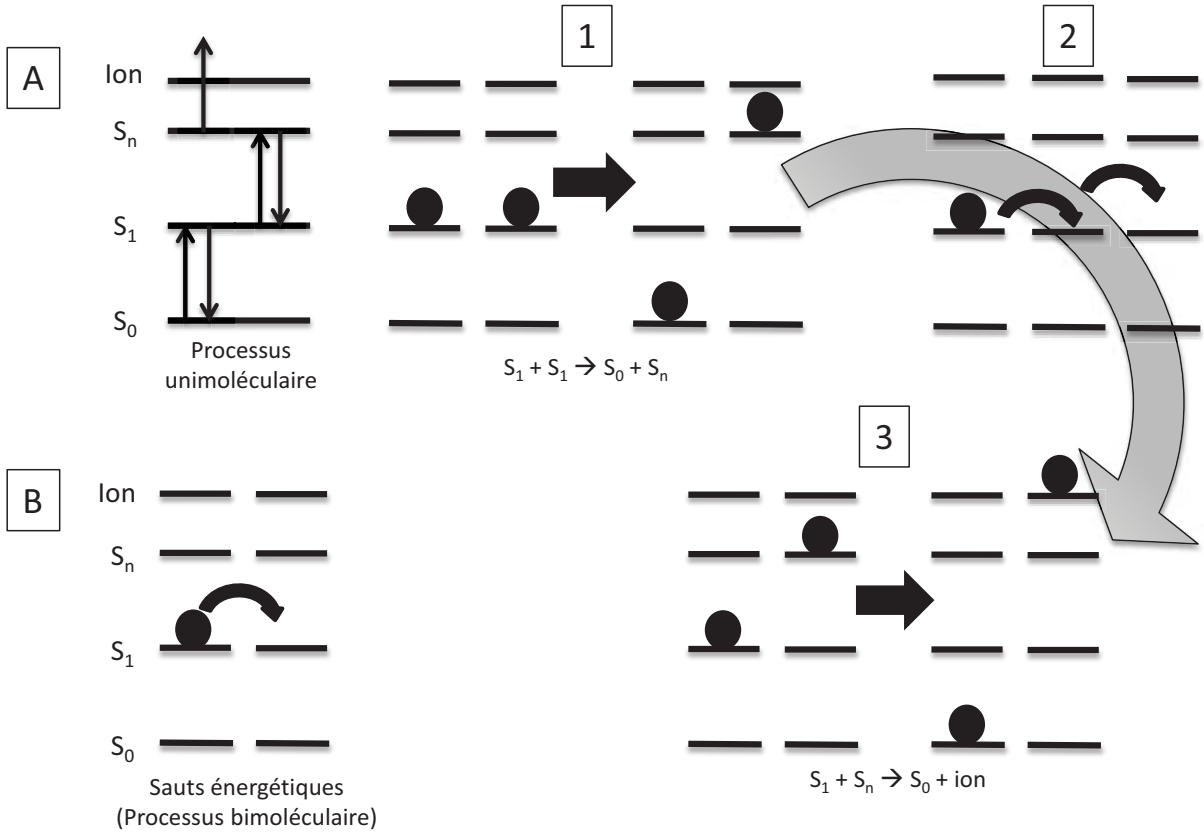


Figure 96 : Processus unimoléculaires et bimoléculaires de fusion énergétique existant dans le modèle « Coupled Physical and Chemical Dynamics » (CPCD). Les réactions de combinaison énergétique entre les états excités (électrons aux niveaux excités S_1 et S_n et à l'état au repos S_0) des matrices sont l'étape clé de la concentration énergétique et de l'ionisation[451]

[451] P. D. Setz, R. Knochenmuss, *The Journal of Physical Chemistry A* **2005**, *109*, 4030–4037

En combinant ces capacités de fusion des énergies d'excitation et de saut énergétique, il est alors possible à partir de deux molécules excités à des états S_1 d'obtenir des molécules excitées à des états S_n qui pourront à nouveau absorber de l'énergie grâce aux sauts énergétiques et passer de l'état S_n à l'état ionisé (voir 3 Figure 96 ci-dessus).

La fusion énergétique a été démontrée grâce à des expériences d'extinction de fluorescence en FRET et HTRF sur des échantillons de matrice DHB auxquels a été incorporé du 4-(dicyanométhylène)-2-méthyl-6-(4-diméthylaminostyryl)-4*H*-pyrane (DCM), un fluorochrome. Pour les besoins de l'étude, il a fallu s'assurer que le DHB soit insoluble et le DCM soluble dans le solvant de lavage des cristaux formés pour éliminer le DCM adsorbé en surface des cristaux. Cette expérimentation revient à mesurer par FRET/HTRF la fluorescence due aux fluorochromes à différentes fluences laser dont l'objectif est d'exciter les molécules de matrice, initier le processus de transfert énergétique jusque sur les fluorochromes qui, une fois dans un état excité, perdront leur capacité à fluorescer. En effet la fluorescence (voir chapitre 1, paragraphe III.B) est basée sur l'absorption d'un photon dont l'énergie correspond à une différence entre un état au repos S_0 et un état excité S_1 puis à l'émission d'une radiation correspondant au passage de l'état S_1 à l'état S_0. A cause du saut énergétique des états S_1 des molécules de matrices, on assiste à une fusion énergétique S_1-S_1 entre la matrice et le fluorochrome qui entraîne soit une excitation supplémentaire de la matrice et une désexcitation du fluorochrome soit une excitation supplémentaire du fluorochrome et une désexcitation de la matrice. Les deux options ayant la même conséquence, à savoir l'arrêt de la fluorescence progressive à mesure que la fluence laser utilisée augmente, permettant ainsi à davantage de molécules de matrices d'être excitées et donc de stopper la fluorescence (voir Figure 97 ci-dessous). Les mesures ainsi effectuées ont permis de montrer que le temps moyen de transfert énergétique dans la matrice DHB était d'environ 50 ps avec un rayon d'action d'environ 15 molécules de matrice ultra pure. Ce qui montre à quel point ce phénomène de fusion énergétique est une clé de l'ionisation de la matrice, en particulier dans des dépôts concentrés en matrice et pourquoi une pureté extrême des matrices doit être exigée.

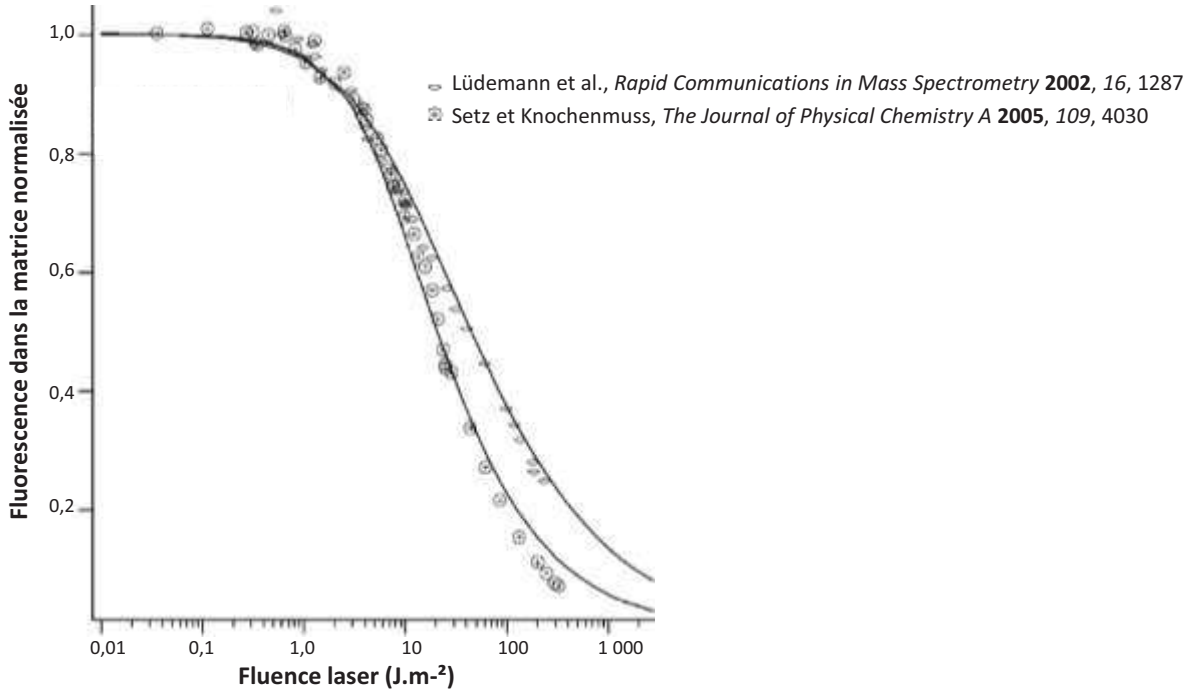


Figure 97 : Fluorescence de la matrice en fonction de la fluence du laser. Les résultats symbolisés par les cercles correspondent à l'étude présentée tandis que les losanges correspondent à une autre étude de la littérature à des fins comparatives. Les courbes sont issues d'une modélisation moléculaire par équations différentielles décrites dans la publication de Setz et Knochenmuss de 2005

Une fois la matrice ionisée, elle peut apparaître sur les spectres de masse sous différentes formes comme des radicaux ($M^{+\bullet}$, $M^{-\bullet}$), des produits de protonation ou de déprotonation ($[M+H]^+$ ou $[M-H]^-$) ou encore des adduits cationiques comme $[M+Na]^+$, sachant que les ions primaires sont supposés être les radicaux, les autres en étant dérivés (voir Figure 105 p.177). Le fait de décrire l'ionisation de la matrice ne signifie pas que des molécules d'analyte ne puissent pas être ionisées à cet instant, mais simplement que la matrice étant présente en large excès, il est beaucoup plus probable que ce soit elle qui soit le sujet de cette ionisation primaire ; en particulier si l'analyte ne comporte pas de groupements chromophores capables d'absorber les radiations UV.

II.B.2. La deuxième étape d'ionisation : la production des ions d'analyte à partir des ions de matrice primaires

Cette étape d'ionisation secondaire se déroule dans le nuage particulaire en expansion dont la densité va évoluer suffisamment lentement pour donner lieu à de multiples collisions entre molécules qui vont produire les ions secondaires qui seront détectés (voir Figure 98 ci-dessous). Cette étape est beaucoup plus longue que l'ionisation primaire et peut potentiellement démarrer dès la formation du premier ion de matrice, signifiant la possibilité que les phénomènes d'ionisation primaires et secondaires puissent se chevaucher dans le temps.

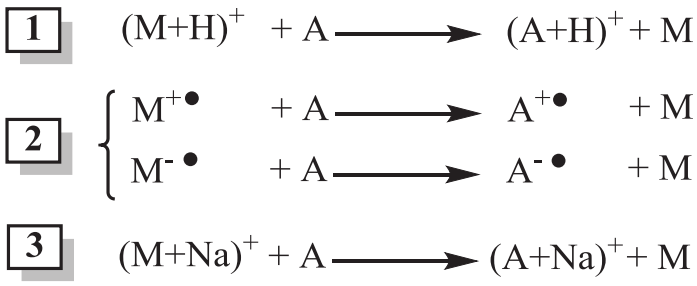


Figure 98 : Réactions de formation d'ions lors de l'étape d'ionisation secondaire par transfert de proton (1), transfert d'électron (2) ou transfert de cation (3), où A est la molécule d'analyte et M la matrice

Les nombreuses collisions alors en jeu tendent vers un équilibre thermique local lié à l'agitation moléculaire, avec pour conséquence le fait que les ions présents à la fin de l'expansion du nuage particulaire soient les plus favorables thermodynamiquement. Le point significatif pour une bonne compréhension des spectres MALDI est la thermodynamique des réactions matrice-analyte et analyte-analyte sous formes ioniques et moléculaires. En effet, le nuage particulaire en expansion est le siège de nombreuses collisions bimoléculaires et, à cause de la diminution de la densité de ce nuage, celles-ci vont diminuer. La matrice étant en large excès par rapport à l'analyte, les dernières collisions se passent alors, de manière très probable, entre une molécule d'analyte et une molécule de matrice, ce qui signifie que la cinétique et la thermodynamique de réactions bimoléculaires matrice-analyte sont la clé de cette étape d'ionisation secondaire.

Pour un nombre important de molécules comme les peptides et les protéines, les réactions de protonation sont dominantes (voir 1, Figure 98 ci-dessus). Intuitivement les peptides présentant des résidus basiques seront mieux détectés grâce à une affinité protonique largement supérieure à celle des matrices (voir Tableau 17 ci-dessous) qui peut aller jusqu'à 175 $kJ.mol^{-1}$ en faveur de la déprotonation des molécules de matrice, rendant ces peptides beaucoup plus facilement détectables.

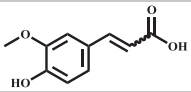
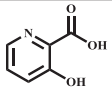
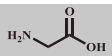
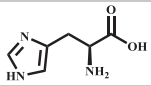
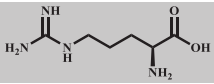
	Composé	Structure	Affinité protonique (kJ.mol^{-1})
Matrice			
	HCCA	Voir Tableau 16 p.162	841 ; 933±9 ; 841,5
	2,5-DHB	Voir Tableau 16 p.162	855±8 ; 853,5±16,7 ; 854±14 ; 850,4 ; 855,8
	Acide férulique		879
	Acide sinapinique	Voir Tableau 16 p.162	887 ; 894,5±13,5 ; 875,9
	Acide 3-hydroxypicolinique (3-HPA)		896 ; 898,5
	HABA (acide 2-(4'-Hydroxybenzèneazo)benzoïque)	Voir Tableau 16 p.162	943 ; 950
	Dithranol	Voir Tableau 16 p.162	874,5±8,4 ; 885,53
	THAP	Voir Tableau 16 p.162	882 ; 893
Analyte			
	Glycine		885±13 ; 859,9 ; 863
	Histidine		955±9 ; 969,2 ; 937
	Arginine		> 1 016
	Gramicidine S	-	> 1 018,0
	Bradykinine	-	> 1 025,1
	Leucine-enképhaline	-	967,8±2,1
	Cytochrome C	-	(ion pentaprotoné) 735, (ion tétraprotoné) 722, (ion triprotoné) 673

Tableau 17 : Affinités protoniques (AP) de matrices et d'analytes[452]

Pour d'autres molécules qui affichent une affinité protonique plus faible comme des polymères synthétiques, le mécanisme d'ionisation par transfert cationique est beaucoup plus favorable que les deux autres (voir 3, Figure 98 p.166). Cependant l'exothermicité des réactions de transfert cationique est beaucoup plus faible pour plusieurs types de biomolécules (peptides, nucléobases et sucres) avec 1 kJ.mol^{-1} dans le cas du sodium et des réactions endothermiques avec le potassium (voir les deux dernières colonnes, Tableau 18 ci-dessous). Ce qui est en accord avec les observations faites selon lesquelles les massifs isotopiques d'analytes cationisés sont d'intensité relative plus faible que leurs analogues protonés, rapport pouvant varier en fonction de la concentration en cation.

[452] R. Knochenmuss, can be found under http://www.rknochenmuss.ch/MALDI/MALDIpage_3b.html

	Composé	Structure	Affinité pour H^+ ($kJ.mol^{-1}$)	Affinité pour Na^+ ($kJ.mol^{-1}$)	Affinité pour K^+ ($kJ.mol^{-1}$)
Matrice	2,5-DHB	Voir Tableau 16 p.162			
	Acide sinapinique	Voir Tableau 16 p.162	860	159	104
	Dithranol	Voir Tableau 16 p.162	860	158	99
	THAP	Voir Tableau 16 p.162	878	154	97
	Dithranol	Voir Tableau 16 p.162	874	150	94
Analyte					
	Dipeptides	-	-	> 160	-
	Nucléobases	-	-	165 - 190	-
	Sucres	-	-	> 160	-

Tableau 18 : Affinités cationiques de matrices et de biomolécules[453]

II.C. L'expression quantitative du modèle CPCD

II.C.1. Modélisation de l'ionisation primaire

Dans un article de 2002, le Dr. Knochenmuss a publié une approche quantitative de son modèle CPCD en ayant recours à des équations différentielles pour modéliser le phénomène de désorption/ablation/ionisation en considérant l'échantillon MALDI comme un milieu continu dans lequel la température est bien définie et la description microscopique des évènements moléculaires inutile.[454] Grâce à cela, il a été possible d'obtenir l'évolution de la quantité relative de molécules de matrice dans l'état excité S_1, S_n, totalement ionisées ainsi que la quantité relative d'ions d'analyte (voir Figure 99 p.169).

Parmi les conclusions les plus importantes de cette étude, notons la dépendance du résultat d'une analyse MALDI par rapport à la fluence du laser, à la longueur d'onde de ce dernier, l'effet de la taille du dépôt et le seuil apparent de fluence nécessaires à l'obtention d'un spectre de qualité.

Concernant ce dernier point, il a souvent été observé qu'à de faibles fluences laser, aucun signal MALDI n'était observé qui, en revanche, pouvait laisser l'impression d'apparaître subitement dès le franchissement d'un seuil pour augmenter rapidement avec la fluence. Etant donné qu'un grand nombre d'excitations sont nécessaires pour obtenir une ionisation, cette dernière peut difficilement dépendre de la fluence de manière linéaire ; ce qui peut expliquer ce seuil apparent. De plus, lorsqu'une faible fluence est utilisée, l'onde thermoélastique et la vague d'expansion deviennent trop faibles pour provoquer une ablation de matière qui passe d'un état condensé à gazeux de manière plus douce par désorption, de la matière en surface de surcroît. Et ce n'est que

[453] R. Knochenmuss, can be found under http://www.rknochenmuss.ch/MALDI/MALDIpage_3b.html
[454] R. Knochenmuss, *Journal of Mass Spectrometry* **2002**, *37*, 867–877

lorsque la fluence atteint une valeur suffisamment forte qu'une assistance pneumatique provoque l'ablation de matière pour arracher des molécules d'analytes présentes en profondeur.

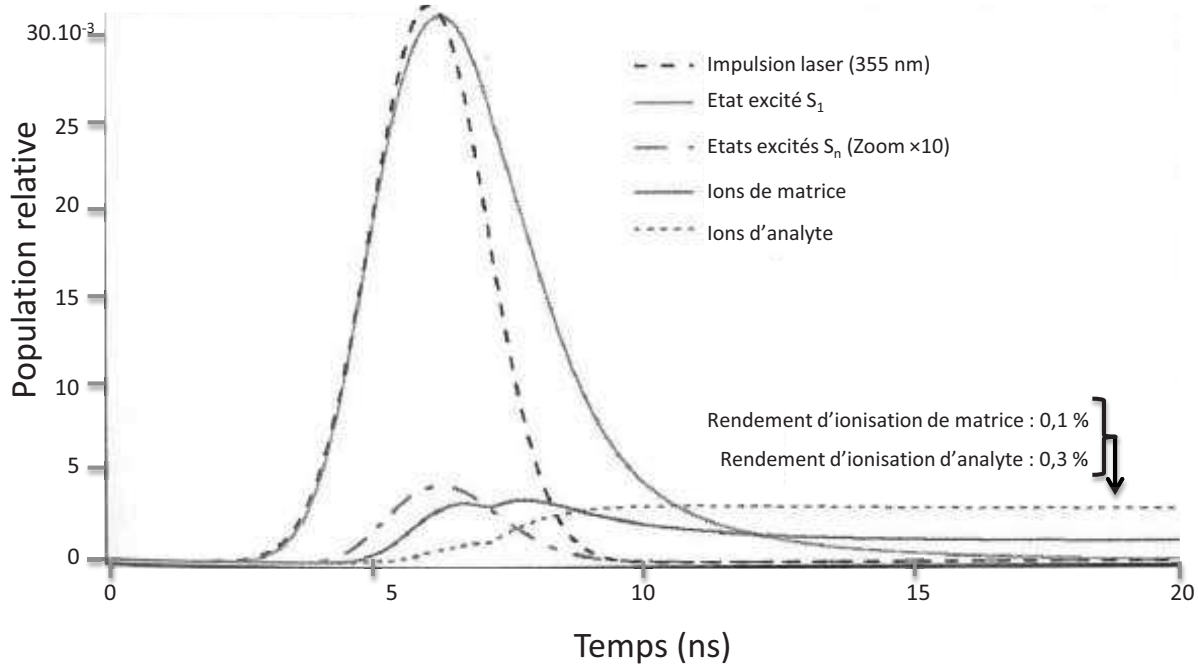


Figure 99 : Illustration de l'évolution d'un échantillon MALDI prédite par une simulation obtenue grâce au modèle CPCD quantitatif. La fusion énergétique des états S_1 en quantité relative abondante permet d'atteindre les états excités supérieurs S_n, puis la fusion énergétique des états S_1 et S_n permet d'obtenir les ions de matrice (ionisation primaire), qui par la suite réagiront avec l'analyte neutre pour former les ions d'analyte (ionisation secondaire)

Le deuxième point soulevé par cette étude est la dépendance du MALDI à la longueur d'onde qui donne de meilleurs résultats si la matrice absorbe correctement l'impulsion lumineuse. Cela revient à dire que le signal des ions de matrices augmentera plus rapidement pour une fluence donnée. En effet, si le nombre de molécules de matrice excitées dans un volume donné augmente, autrement dit une meilleure absorption de l'impulsion laser grâce à un coefficient d'absorption molaire plus important, la vitesse de fusion énergétique et d'ionisation augmentera d'autant plus que la densité de molécules capables de prendre part à ces mécanismes s'accroîtra. Cela engendrera également une élévation plus rapide de la température par désexcitations non radiatives consécutives d'un plus grand nombre de molécules dans un état excité S_1, montrant la bonne influence d'une meilleure absorption de l'impulsion laser sur l'ionisation et la désorption/ablation qui se renforcent mutuellement (voir Figure 100 p.170).

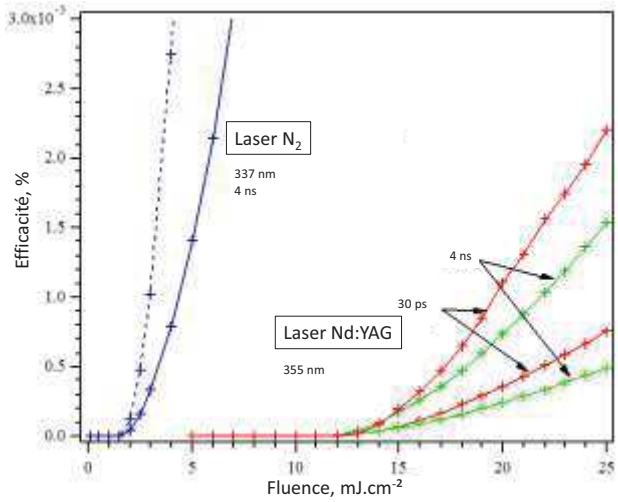


Figure 100 : Représentation de l'efficacité d'ionisation par rapport à la longueur d'onde et à l'impulsion laser en fonction de la fluence pour une matrice DHB. Les courbes supérieures pour chaque paramètre (i.e : chaque couleur) représentent le rendement correspondant à la couche supérieure de l'échantillon, tandis que la courbe inférieure correspond aux rendements intégrés de toutes les particules émises

Troisième point mis en avant par ces travaux de modélisation, l'effet de la taille du dépôt sur l'ionisation MALDI. Bien qu'intuitivement, la formation d'un plus petit dépôt laisse deviner une plus faible quantité d'ions (voir Figure 101 p.170), l'avantage de systématiquement travailler avec de très larges dépôts ne présente pas d'avantage significatif. En effet, d'un point de vue de l'efficacité d'ionisation lors d'une expansion rapide du nuage particulaire, sa densité diminue rapidement et les ions formés à cet instant ont de plus en plus de chances de survivre en évitant des chocs avec d'autres molécules qui pourraient avoir pour conséquence de les désexciter. L'expansion semble être plus lente pour des dépôts plus larges, ce qui diminue la probabilité de survie des ions formés et donc le rendement ionique par rapport à un dépôt de petite taille dont la rapide expansion radiale du nuage particulaire évitera cet écueil ionique.

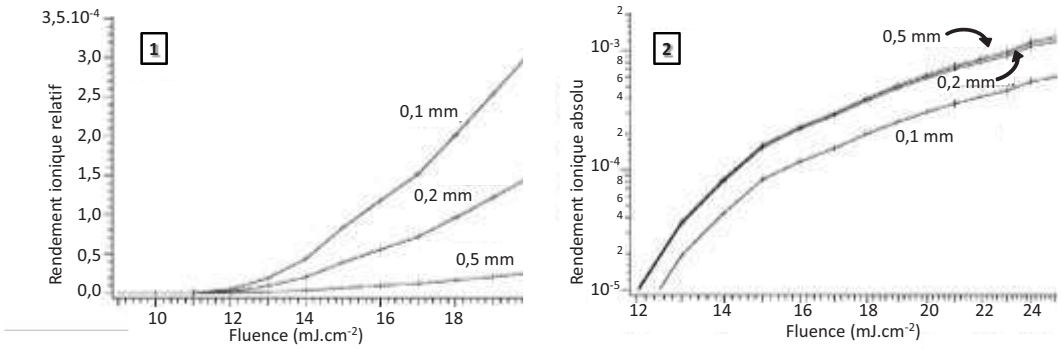


Figure 101 : Représentation du rendement ionique en fonction de la fluence de l'impulsion laser et pour différentes tailles de dépôt. Le graphique 1 montre le rendement relatif au volume de matière irradiée tandis que le graphique 2 illustre le rendement ionique absolu pour ces mêmes tailles de dépôt qui est plus important mais moins efficace, point vérifié expérimentalement[455,456]

[455] K. Dreisewerd, M. Schürenberg, M. Karas, F. Hillenkamp, *International Journal of Mass Spectrometry and Ion Processes* **1995**, *141*, 127–148

Enfin, la dernière conclusion intéressante de l'étude concerne la faible dépendance de l'ionisation MALDI par rapport à l'irradiance ($W.m^{-2}$) contrairement à la fluence ($J.m^{-2}$). En effet, il a été observé une faible dépendance du MALDI par rapport à la période de l'impulsion laser qui pouvait varier de quelques femtosecondes à plusieurs centaines de nanosecondes sans différence significative tant au niveau du résultat que de la nature des ions observés. En revanche, une variation de la fluence de l'impulsion laser peut grandement changer la donne, comme cela est subtilement insinué par l'existence d'un pseudo seuil de fluence. Ce qui implique, premièrement, que l'ionisation MALDI dépend de la fluence laser et non de son irradiance et, deuxièmement, qu'une absorption directe et consécutive de 3 photons pour dépasser le potentiel d'ionisation des matrices n'est pas la voie de formation des ions primaires. Dans le cas inverse, l'augmentation de la puissance, autrement dit de la quantité d'énergie par unité de temps, aurait eu une influence marquée sur l'ionisation MALDI. Au lieu de cela, le modèle démontre l'importance des différents états excités des molécules de matrice via la fusion et les sauts énergétiques. Et, grâce à la désexcitation de ces molécules de façon non radiative, cela engendre une élévation de température significative (voir Figure 102 p. 171) qui fournit l'énergie nécessaire à la désorption/ablation de matière. Ainsi l'ionisation et la désorption/ablation dépendent de la persistance de l'état excité S_1 des molécules de matrices : l'ionisation se déroule tant que ce dernier existe tandis que sa disparition entraîne l'augmentation de la température.

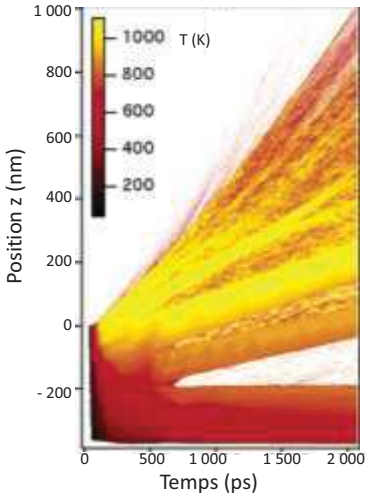


Figure 102 : Illustration de l'élévation de température en fonction du temps lors de l'ionisation MALDI avec la représentation de la position des particules suivant l'axe z en fonction du temps

[456] D. Feldhaus, C. Menzel, S. Berkenkamp, F. Hillenkamp, K. Dreisewerd, *Journal of Mass Spectrometry* **2000**, *35*, 1320–1328

II.C.2. Mise en lumière de problématiques liées à l'ionisation secondaire

En ce qui concerne les mécanismes d'ionisation secondaire, les effets de suppression de matrice et d'analyte (discutés au paragraphe II.E.3 p.181), sont des exemples extrêmes d'un problème analytique majeur qui n'est autre que la réponse d'analytes en mélange.

En général, un fort rapport matrice/analyte permet d'obtenir de bonnes intensités relatives. La sensibilité de détection, à la lumière de l'étude de l'ionisation secondaire, sera meilleure et plus reproductible pour un analyte donné si la thermodynamique des réactions d'ionisation secondaire lui est plus favorable qu'à un autre analyte. Ainsi la faveur de ces réactions secondaires dépendra du choix de la matrice et de ses propriétés thermodynamiques (affinité protonique, cationique, basicité en phase gazeuse …) au même titre que la cationisation des analytes.

II.C.3. Le contre coup de l'ionisation secondaire : la dilution énergétique

Ces réactions de désexcitation de molécules de matrice/analyte sont tout aussi importantes que celles qui forment les ions étant donné qu'elles ont la capacité de limiter le rendement ionique par ce processus de désexcitation, si bien que les molécules de matrice/analyte perdront leur capacité à être ionisées. Suite à l'impulsion laser qui apparaît comme un brutal déséquilibre, celle-ci va engendrer une multitude de molécules excitées qui vont pouvoir interagir entre elles. Bien entendu, une fraction importante pourra élever son niveau énergétique grâce aux mécanismes de fusion et de saut énergétique, mais cela signifie également que certaines molécules vont abaisser leur niveau énergétique. Il est alors tout à fait possible que, plus tard et de manière parallèle aux réactions d'ionisation secondaires, ces molécules remontent à un niveau énergétique supérieur par des chocs avec d'autres entités davantage chargées en énergie mais proche de l'ionisation, leur rabaissant leur niveau d'excitation et les éloignant de l'état ionique final recherché (A, Figure 103 ci-dessous) ou même en les neutralisant (B, Figure 103 ci-dessous). D'où l'intérêt de rechercher une expansion du nuage particulaire la plus rapide possible pour diminuer le plus rapidement les probabilités de chocs désactivant aussi bien pour les molécules de matrice que pour le(s) analyte(s). A noter que de telles réactions désactivantes sont soumises à l'efficacité des chocs intermoléculaires mais aussi au caractère favorable du transfert énergétique du point de vue thermodynamique illustré par une enthalpie libre de réaction négative.

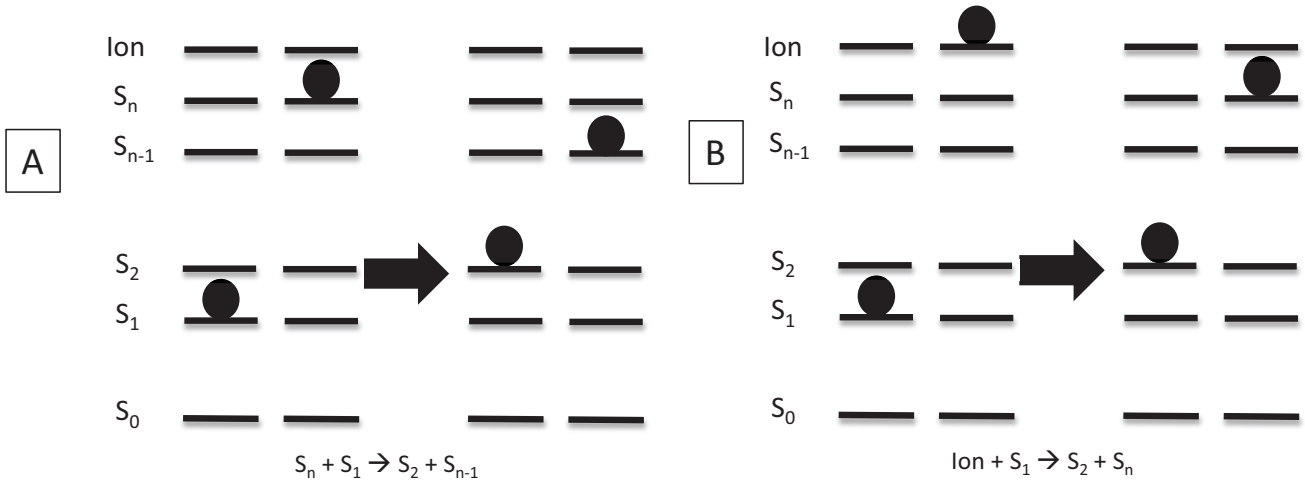


Figure 103 : Illustration proposée de l'impact des réactions de désexcitation des molécules proches de l'état d'ionisation (A) ou même déjà ionisée (B) dans le cas où le transfert énergétique est thermodynamiquement favorable ($\Delta_r G < 0$ kJ.mol^{-1})

En résumé, le modèle quantitatif CPCD permet de modéliser de nombreux processus opérant lors de l'ionisation MALDI tels que :

- L'amplitude des rendements ioniques : de 0,01 à 1 %.
- La dépendance de l'efficacité d'ionisation vis-à-vis de la fluence et non de l'irradience de l'impulsion laser.
- L'évolution de la température du nuage particulaire : de 500 à 1 000 K.
- L'existence d'un pseudo seuil de fluence et l'effet de la taille du dépôt sur ce dernier.
- La dépendance de ce pseudo seuil et du rendement ionique vis-à-vis de la longueur d'onde de l'impulsion laser.
- L'annulation de la fluorescence en fonction de la fluence de l'impulsion laser.
- L'existence des effets de suppression de matrice et d'analyte.

II.D. L'arrivée d'une nouvelle dimension du modèle CPCD : la dynamique moléculaire

L'ajout d'une composante de dynamique moléculaire est nécessaire car cela permettrait une compréhension beaucoup plus fine au niveau de la mécanique moléculaire des processus en jeu dans l'ionisation MALDI.

II.D.1. L'apport de la dynamique moléculaire

Cette volonté de rajouter une composante moléculaire au modèle CPCD s'inscrit dans le développement de celui-ci car, à l'heure actuelle, le modèle quantitatif du CPCD se base sur deux hypothèses simplificatrices, à savoir un changement de phase total d'une couche d'un échantillon MALDI une fois une certaine température requise atteinte, ce qui revient à un traitement similaire à

celui d'un gaz en expansion ; et la réduction par un facteur du rendement ionique conçu pour prendre en compte la fraction de composés qui restent en phase condensée.

Cet aspect moléculaire a été étudié jusqu'en 2005 avec la publication d'un modèle combiné et des simulations basées sur celui-ci en 2010. [457,458] Mais c'est en 2003 qu'ont été proposé les premiers aspects mécanistiques de cet aspect de dynamique moléculaire par Zhigilei et Garrison.[459] Le point fort de ce modèle est la définition de la plus petite particule comme étant une molécule et non un atome. Cette définition a été choisie après avoir compris que les vibrations intramoléculaires dans le nuage particulaire n'influaient que très peu sur le processus global et qu'il suffisait d'inclure un degré de liberté moléculaire pour pouvoir modéliser l'interconversion des énergies translationnelles et vibrationnelles en collisions. L'intérêt d'une telle modélisation réside dans la possibilité ultérieure d'effectuer des simulations sur une échelle temporelle et spatiale beaucoup plus importantes. Typiquement, les simulations conduites l'ont été sur un bloc de 10 × 10 × 360 nm en prenant en considération un support élastique pour permettre la simulation de la propagation d'une onde de pression et de vagues de rebond ultérieures. Le temps des simulations correspond à une échelle de quelques femtosecondes pour un temps de calcul de quelques semaines à plusieurs mois sur un ordinateur de bureau qui gagneraient à être exécutés dans des supercalculateurs à hautes performances à la manière des études en chimioinformatique.

L'inconvénient de la modélisation moléculaire dynamique est la nécessité de convertir les processus lors de l'ablation/ionisation sous une forme de probabilité, ce qui revient à spécifier les interactions moléculaires entre matrice (en l'occurrence le DHB) et analyte rendant la modélisation moins générale. A titre d'exemple le phénomène de fusion énergétique serait issu d'une interaction entre les dipôles moléculaires des matrices de manière similaire au FRET où le potentiel d'interaction varie en $1/R^6$ avec R la distance intermoléculaire. Pour mener à bien ces simulations un certain nombre de paramètres sont nécessaires dont certains sont spécifiques à ce modèle, d'autres obtenus de manière expérimentale et d'autres encore dérivés du modèle CPCD quantitatif (voir Tableau 19 ci-dessous). Au final on pourra décrire ce modèle suivant le sigle CPCMD pour « Coupled Physical, Chemical and Molecular Dynamic model ».

[457] R. Knochenmuss, L. V. Zhigilei, *The Journal of Physical Chemistry B* **2005**, *109*, 22947–22957
[458] R. Knochenmuss, L. V. Zhigilei, *Journal of Mass Spectrometry* **2010**, 333–346
[459] L. V. Zhigilei, E. Leveugle, B. J. Garrison, Y. G. Yingling, M. I. Zeifman, *Chemical Reviews* **2003**, *103*, 321–348

Source	Paramètre	Unité/dimension
Résultat expérimental	Constante diélectrique effective de la matrice utilisée	$F.m^{-1}$ / $T^4.I^2.L^{-3}.M^{-1}$
	Barrière d'activation énergétique pour le transfert de charge intermoléculaire	$kJ.mol^{-1}$ / $M.L^2.T^{-2}.N^{-1}$
	Enthalpie libre de la réaction de transfert de charge	$kJ.mol^{-1}$ / $M.L^2.T^{-2}.N^{-1}$
Modèle CPCD	Persistance de l'état S^1 d'une molécule de matrice en phase gaz, isolée	s / T
	Persistance de l'état S^n d'une molécule de matrice en phase gaz, isolée	s / T
	Constante de fusion énergétique $S_1 + S_1$ pour un potentiel en $1/R^6$	s^{-1} / T^{-1}
	Constante de fusion énergétique $S_1 + S_n$	s^{-1} / T^{-1}
	Constante de saut énergétique des molécules excitées S0 et S1	s^{-1} / T^{-1}
	Constante de désactivation par collision de l'état S1	s^{-1} / T^{-1}
	Section efficace de capture d'électron	$Å^2$ / L^2
Modèle CPCMD	Constante de recombinaison ion-ion	s^{-1} / T^{-1}
	Section efficace de collision pour une absorption énergétique $S_0 \rightarrow S_1$	$Å^2$ / L^2
	Section efficace de collision pour une absorption énergétique $S_1 \rightarrow S_n$	$Å^2$ / L^2

Tableau 19 : Paramètres utilisés pour les simulations du modèle « Coupled Physical, Chemical and Molecular Dynamics » (CPCMD)

II.D.2. Une réaction parasite modélisée : la recombinaison d'ion par effet tunnel

Comme il en a été question dans le modèle CPCD, les mécanismes de perte de signal sont très importants dans la détermination du rendement ionique final, et c'est tout naturellement que le modèle CPCMD s'est attelé à leur description.[460]

Les simulations de dynamique moléculaire ont montré que la densité de charges dans l'échantillon juste avant l'ablation de matière est très élevée, ce qui signifie que les premiers ions formés peuvent être très proches les uns des autres. Ils n'auront donc aucun mal à rentrer en collision les uns envers les autres. La problématique en suspens concerne alors le mode de transfert de la charge : si les ions sont des radicaux, ce sera un transfert d'électron ; mais s'il s'agit d'un adduit protoné ou cationisé, le mécanisme n'est plus évident. Toutefois les fonctions d'ondes électroniques, qui permettent de décrire le comportement d'un électron, sont les premières à interagir entre elles et même à « longue » distance, bien avant un quelconque contact entre molécules, car un électron a une portée d'effet tunnel en mécanique quantique bien plus importante qu'un atome ; ce qui a permis de supposer que le processus le plus probable pour les adduits (protonés et cationisés) se

[460] R. Knochenmuss, L. V. Zhigilei, *Analytical and Bioanalytical Chemistry* **2012**, *402*, 2511–2519

déroule en deux temps, le premier étant la neutralisation des ions et le second, le réarrangement des atomes au sein des molécules (voir Figure 104 ci-dessous).

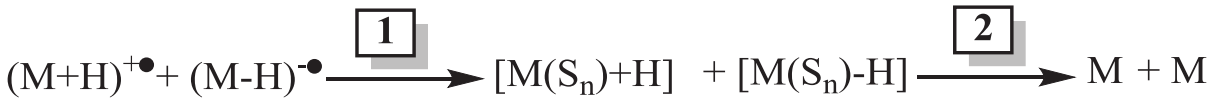


Figure 104 : Illustration de la recombinaison d'ions par effet tunel. Le processus le plus probable débute par un transfert électronique d'un ion à l'autre (1) par saut énergétique suivit d'un réarrangement pour s'adapter à leur nouvelle distribution d'énergie (2)

Il existe une importante littérature à propos de la description des processus de transfert électronique au niveau quantique, dont certains ont été utilisés par le Dr. Knochenmuss et appliqués au modèle de dynamique moléculaire. Parmi les nombreux aspects de ces processus, l'effet tunnel électronique, notamment, est décrit comme un processus qui varie de façon exponentielle avec la distance intermoléculaire. L'adaptation de ces aspects ont permis développer une relation qui modélise la constante de recombinaison ion-ion (voir Equation 6 ci-dessous). Dans cette relation, le facteur de Franck-Condon (K_v) est impliqué dans la description quantique de l'intensité des transitions vibroniques (modifications simultanées d'un niveau d'énergie électronique et de vibration d'un objet chimique).

$$log_{10}(constante\ de\ recombinaison) = \alpha - \beta R - K_v(\Delta G + \lambda)^2/\lambda$$

Equation 6 : Relation permettant d'accéder à la constante de recombinaison ion-ion par effet tunnel dans le modèle CPCMD. Cette constante varie en fonction d'un paramètre de fréquence α, d'un facteur de décroissance β lui-même dépendant de la barrière énergétique ΔG de la réaction de recombinaison, d'une énergie de réorganisation λ, de la distance intermoléculaire R et du facteur de Franck-Condon K_v

Grâce à cette même étude, la variation des paramètres de l'effet tunnel a montré un impact significatif sur la constante de temps de l'ablation de matière à partir du dépôt MALDI et de la vague d'expansion. Ce qui suggère, d'après les auteurs, que des expérimentations avec des sondes photo-acoustiques permettraient d'affiner la compréhension du phénomène et de potentiellement valider et caractériser expérimentalement cet aspect du MALDI. Et dans l'optique où ce concept serait vérifié, une des propriétés les plus pertinentes vis-à-vis de leur performance serait leur engagement dans l'effet tunnel électronique : une faible constante de recombinaison signifierait un effet tunnel prononcé et une forte probabilité de recombinaisons impliquant un faible rendement ionique ; tandis qu'une constante de recombinaison élevée signifierait à l'inverse une faible probabilité que ces réactions aient lieu impliquant ainsi un nombre potentiellement beaucoup plus important d'ions survivant et donc un rendement ionique plus élevé. La problématique qui se posera alors sera d'évaluer la reproductibilité de tels rendements quantiques.

II.E. Les aspects partagés par les modèles d'ionisation MALDI

Bien que les deux modèles portés par le Pr. Karas et le Dr. Knochenmuss tendent à s'opposer, quelques points font néanmoins consensus.

II.E.1. L'ionisation de la matrice et l'observation d'adduits

L'ionisation de la matrice et la formation des différents adduits possibles est le premier des trois points sur lesquels s'accordent les deux théories qui décrivent le phénomène MALDI sur le plan fondamental.

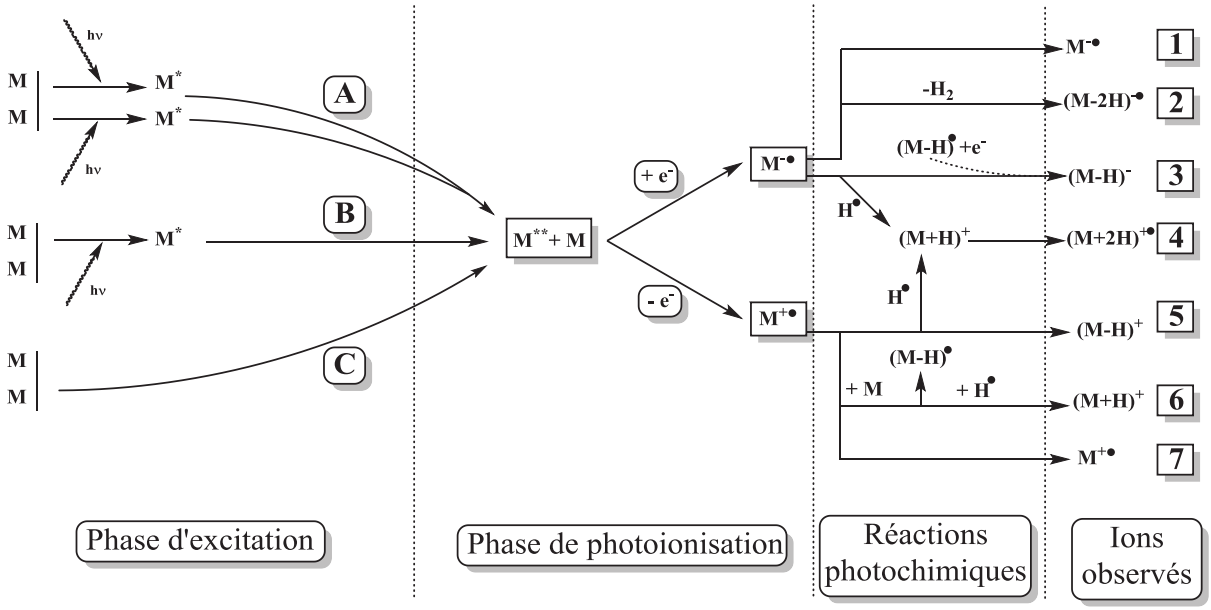


Figure 105 : Diagramme schématique représentant la photoionisation et les différentes réactions photochimiques consécutives pour de petites molécules organiques telles que les matrices

La clé de ces modèles réside dans le fait que l'ionisation de composés capables d'absorber l'énergie laser UV est initiée par une photoionisation qui entraîne la formation de radicaux moléculaires photoioniques.[461] Ce principe est particulièrement pertinent en ce qui concerne les matrices qui ont des potentiels d'ionisation compris entre 7,5 et 9 eV en phase gaz. Cette énergie est diminuée par l'énergie de solvatation d'un photoélectron et par l'affinité électronique d'une molécule neutre. L'énergie résultante requise peut être fournie de plusieurs manières. La première est constituée par l'absorption résonnante de deux photons (E_{hv} =4,6 eV à 266 nm ; E_{hv} =3,7 eV à 337 nm) consécutivement (voie B de la Figure 105 ci-dessus) ou par un partage d'énergie entre deux molécules excitées par un photon chacune (voie A de la Figure 105 ci-dessus). Il existe également la possibilité d'une absorption non linéaire (voie C de la Figure 105 ci-dessus) de deux photons qui est très peu probable en raison des faibles irradiances utilisées en MALDI.

[461] H. Ehring, M. Karas, F. Hillenkamp, *Organic Mass Spectrometry* **1992**, *27*, 472–480

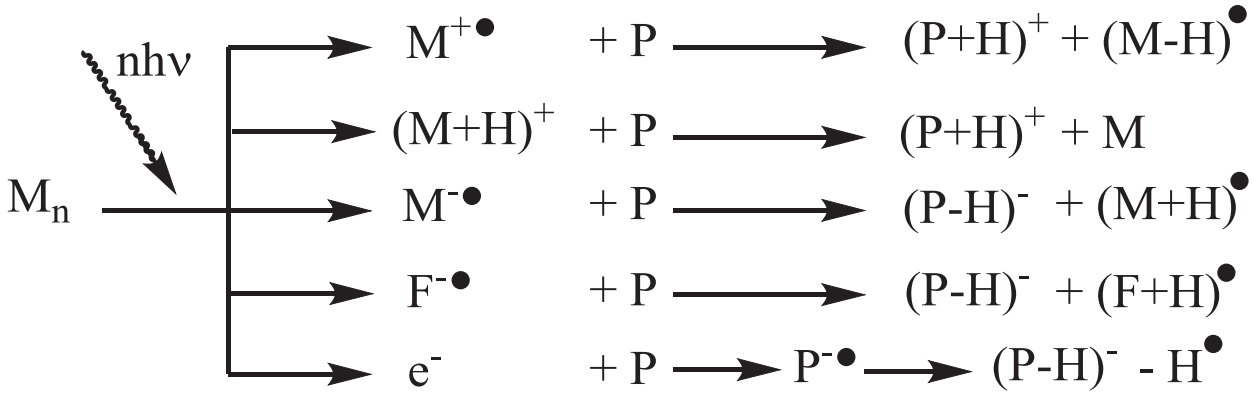


Figure 106 : Processus photochimiques d'ionisation pour des analytes en MALDI, où M est la matrice, F un fragment de matrice et P la protéine ou le peptide analysé

Bien que le mode positif soit, en général, largement décrit et le plus souvent utilisé en pratique, le mode négatif est tout aussi important avec des comportements différents. A titre d'exemple les acides carboxyliques sont peu capables de former des ions négatifs (le pic de base n'est pas observé), mais vont avoir tendance à se fragmenter spontanément à cause de leur faible stabilité en séries de fragments pour ensuite réagir avec l'analyte (P, voir Figure 106 ci-dessus).

II.E.2. Les phénomènes de surface

Les phénomènes de surface font également partie de ces points acceptés par la communauté scientifique notamment ceux créés par les surfaces métalliques ou les surfaces structurées.

II.E.2.a. Impact des surfaces métalliques sur l'ionisation des échantillons

Un des phénomènes les plus connu lorsqu'il est question de surface métallique est un effet découvert par Albert Einstein en 1905 : l'effet photoélectrique. Ce concept est caractérisé par l'émission d'un électron lorsqu'une radiation lumineuse frappe une surface métallique.[462]

Cependant dans le cas du MALDI et des lasers utilisés (N_2, 337 nm et 3,7 eV ; Nd:YAG, 355 nm et 3,5 eV) l'énergie requise pour obtenir cet effet n'est pas atteinte ni pour une surface en acier (4,5 eV) ni pour une surface en or (5,1 eV). Ce qui ne rend toutefois pas le phénomène impossible puisqu'il a pu être mesuré et modélisé. C'est l'explication fondamentale du processus qui reste problématique. La solution provient de l'interface matrice-métal qui permet l'émission de deux photoélectrons qui vont initier les réactions d'ionisation de la matrice si le niveau énergétique de sa LUMO (pour « Lowest Unoccupied Molecular Orbital ») se trouve sous le niveau de Fermi. Ce dernier correspond à l'énergie nécessaire pour ajouter un électron à un corps, en l'occurrence la matrice MALDI. Et c'est cet ajout pour un photon d'un électron dans l'orbitale d'une molécule de matrice qui rend possible par la suite l'absorption consécutive de deux photons pour initier l'excitation aux états S_1 puis S_n par fusion et saut énergétique pour aboutir à l'ionisation de la molécule de matrice. Dans le

[462] R. Knochenmuss, G. McCombie, M. Faderl, *The Journal of Physical Chemistry A* **2006**, *110*, 12728–12733

cas où le niveau de Fermi est plus bas comme pour une surface en or, le niveau énergétique requis pour l'ionisation reste équivalent à l'absorption de 3 photons (voir Figure 107 ci-dessous).

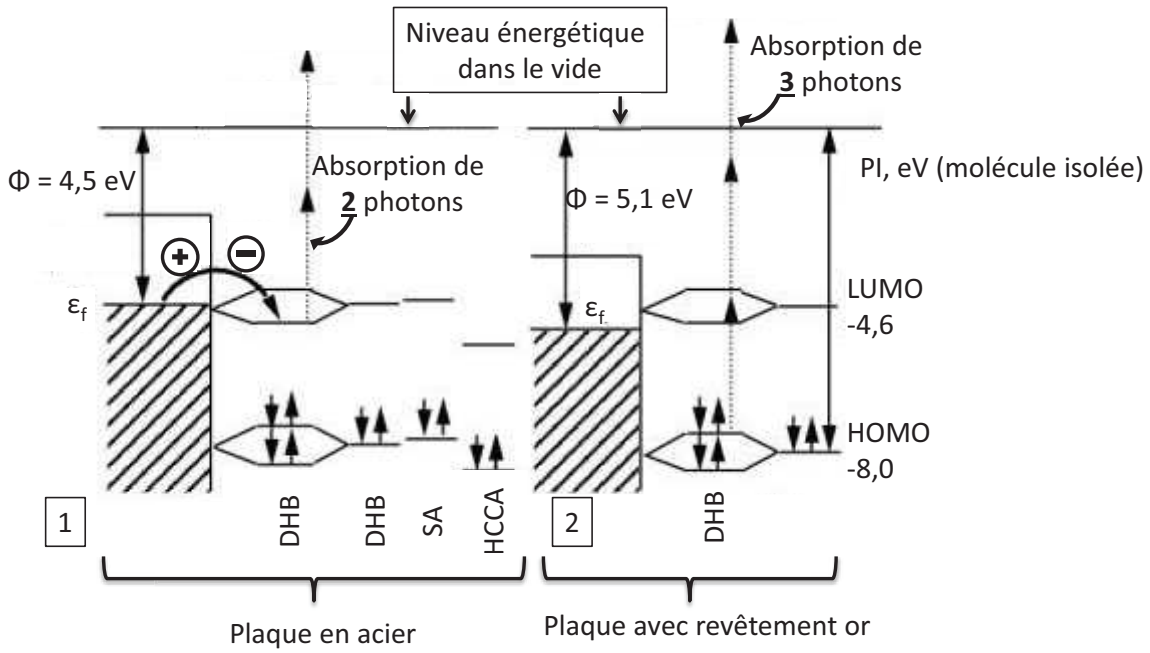


Figure 107 : Représentation simplifié d'un diagramme d'orbitales molécules de matrices MALDI usuelles adsorbées sur une surface d'or ou d'acier. Avec un niveau de Fermi (ε_f) inférieur au niveau énergétique de la LUMO, le photon absorbé par le métal est transféré à la matrice dans sa LUMO sous forme d'un électron qui va pouvoir par la suite absorber l'énergie laser. Le niveau énergétique alors requis équivaut à l'absorption consécutive de deux photons pour atteindre directement un état ionisé

C'est un phénomène qui se déroule uniquement lors de l'irradiation laser et qui va avoir tendance à augmenter la quantité d'ions primaires de matrices très rapidement au début de la phase d'ablation/ionisation. Cela permet, à partir d'analytes neutres, d'obtenir très vite des ions ablatés également très rapidement car issus d'une zone de faible épaisseur où la vague d'expansion pneumatique va pouvoir agir (voir Figure 108 p.180). [463] Celle-ci libèrera ces ions qui auront une probabilité de survie beaucoup plus importante car issus d'un nuage particulaire composé, pour une forte proportion, d'ions.

[463] G. McCombie, R. Knochenmuss, *Journal of the American Society for Mass Spectrometry* **2006**, *17*, 737–745

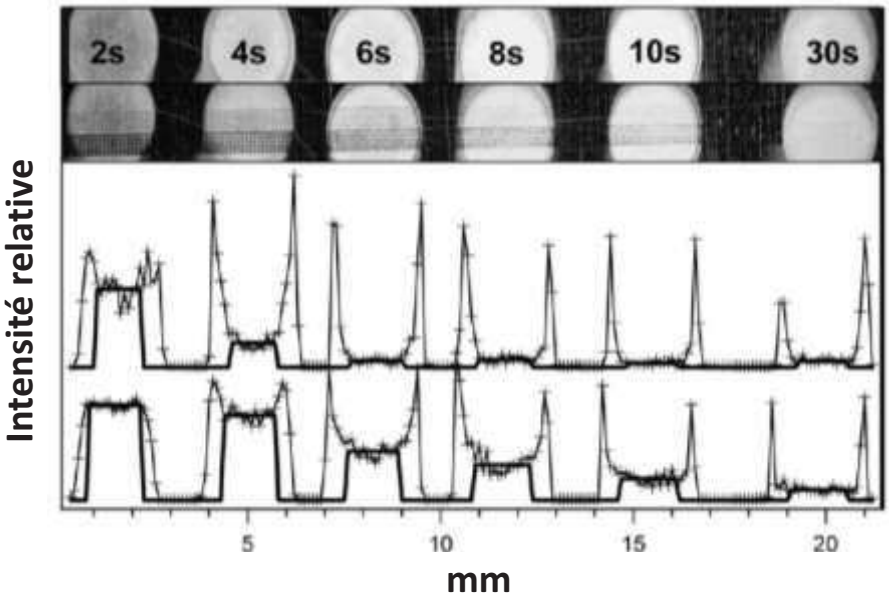


Figure 108 : Illustration de l'effet photoélectrique sur les bords de dépôts de plus en plus épais (de gauche à droite) obtenus par la technique de l'électrospray. Les résultats supérieurs correspondent à une accumulation de 5 impulsions laser, et ceux en-dessous à 50 impulsions laser sur un dépôt de substance P. Les points expérimentaux sont représentés par les croix tandis que la ligne continue représente le signal moyen dans la zone la plus uniforme du dépôt

II.E.2.b. L'influence de la structuration de surfaces

Brièvement, ce type de surface peut affecter de façon non négligeable les processus d'ionisation MALDI. En effet, sur une telle surface (voir Figure 109 ci-dessous), le postulat d'un nuage particulaire en expansion libre ne s'applique plus à cause de l'environnement relativement confiné dû à des nanocolonnes de silicone.[464] Cela entraîne une expansion forcée suivant l'axe z uniquement, et donc une accélération plus importante de ce mouvement de dilatation. La conséquence directe pour le nuage particulaire MALDI est une fréquence de collisions plus importante, ce qui signifierait une dissipation énergétique plus rapide et un refroidissement du nuage plus important pour, *in fine*, une diminution du nombre de collisions entraînant la formation d'ions mais surtout de réactions de recombinaison pour aboutir à une augmentation du rendement ionique. Malheureusement c'est le contraire qui a été observé.[465]

La conclusion de cette étude est donc de privilégier des surfaces denses pour éviter ces phénomènes d'expansion axiale qui nuisent au rendement ionique et *in fine* à la sensibilité en détection.

[464] B. N. Walker, T. Razunguzwa, M. Powell, R. Knochenmuss, A. Vertes, *Angewandte Chemie International Edition* **2009**, *48*, 1669–1672
[465] R. Knochenmuss, *European Journal of Mass Spectrometry* **2009**, *15*, 189

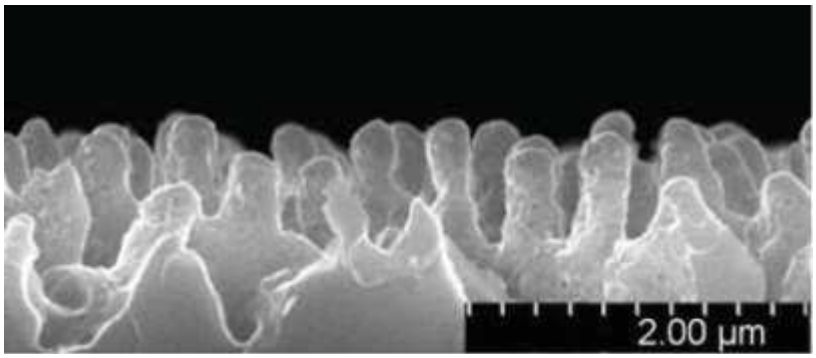


Figure 109 : Cliché de microscopie électronique à balayage d'une surface siliconnée présentant des colonnes de 600 nm de haut pour 300 nm de diamètre et une distance inter colonne évaluée à 200 nm

II.E.3. Les effets de suppression de matrice et d'analyte

Enfin, les effets de suppression de matrice et d'analyte, souvent observés, sont le dernier de ces trois points sur lesquels s'accordent les chercheurs.[466,467]

Les preuves que la matrice et l'analyte subissent ce type de phénomène ne manquent pas et d'importantes variations au niveau des signaux relatifs peuvent apparaître lorsqu'un simple paramètre expérimental évolue comme le rapport molaire matrice/analyte (voir Figure 110 ci-dessous) ou l'intensité laser. Les ions d'analytes A à E sont formés grâce à un transfert électronique (voir Figure 93 p.159, Figure 98p.166 et Figure 106 p.178) et peuvent donc amener à la suppression du signal de matrice et même d'un autre analyte sous forme protonée et/ou cationisée, ce qui va dans le sens de la complexité des interconversions possibles en jeu dans le nuage particulaire en expansion. Dans le cas de l'analyte A, il a été montré que celui-ci possédait le potentiel d'ionisation le plus faible et donc la capacité la plus forte, thermodynamiquement parlant, de conserver un électron suite à un transfert par collision.[468] Ainsi, quand la quantité d'analyte sous forme ionique est plus importante que celle des ions primaires, l'effet de suppression apparaît comme une conséquence des réactions d'ionisation secondaire

[466] R. Kratzer, C. Eckerskorn, M. Karas, F. Lottspeich, *Electrophoresis* **1998**, *19*, 1910–1919.
[467] G. McCombie, R. Knochenmuss, *Analytical Chemistry* **2004**, *76*, 4990–4997
[468] A. Hoteling, W. Nichols, D. Giesen, J. Lenhard, R. Knochenmuss, *European Journal of Mass Spectrometry* **2006**, *12*, 345

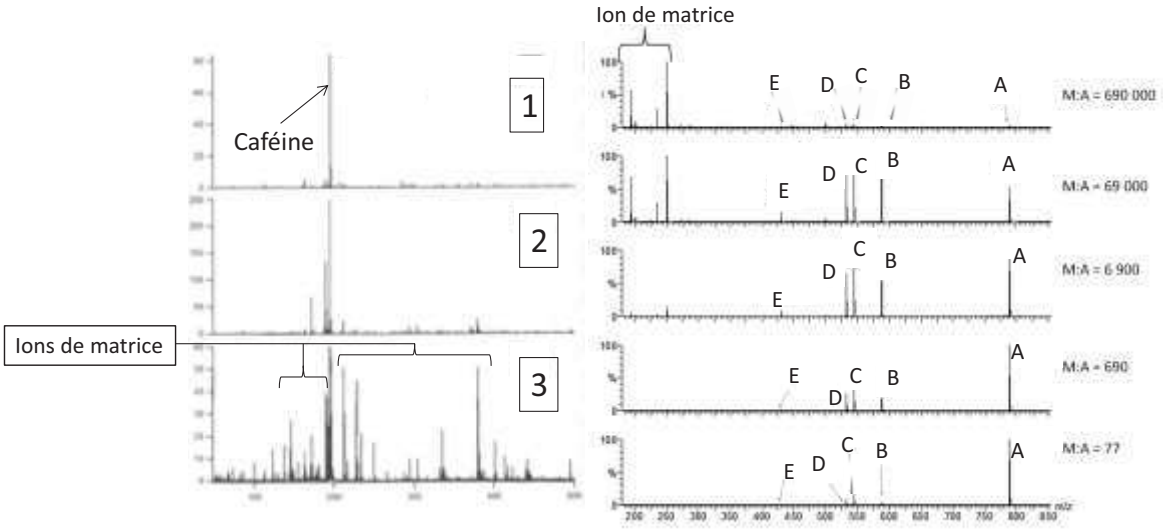


Figure 110 : Spectres MALDI-ToF de la caféine avec une matrice HCCA (à gauche) et de différents analytes dans une matrice DCTB (à droite). L'effet de suppression de matrice est presque total dans le spectre 1 à gauche où le rapport matrice/analyte est faible avec une valeur proche de 3. Lorsque le rapport est plus important, à 27 par exemple dans le spectre 2 à gauche, les signaux de matrice apparaissent. En revanche il est possible de détecter des signaux de matrice même avec un rapport de 3 lorsque l'énergie de l'impulsion laser est plus importante comme dans le spectre 3. Cela engendre plus d'ions primaires provenant de la matrice qui devient alors visible

III. La quantification en spectrométrie de masse MALDI-ToF

Le chapitre 2 nous a permis d'approcher les différentes techniques de quantification en SID-MS, parmi lesquelles la majorité est basée sur l'utilisation de quadripôles et le suivi de transitions avec séparation chromatographique en amont à une ou deux dimensions selon la complexité de l'échantillon à analyser. Les méthodes de quantifications en SID-MS utilisent toutes, que ce soit par marquage métabolique ou chimique, des isotopes du carbone et de l'azote voire de l'oxygène pour la quantification en raison, parfois, de déplacements en temps d'élution induis par un marquage au deutérium.

Cela n'est pas du tout une source de problème en MALDI étant donné qu'il n'y a pas d'étape de séparation chromatographique en amont et qu'un échantillon complexe est analysé dans son ensemble. Cela permet d'effectuer du marquage isotopique par deutérium, plus simple et bon marché que le marquage aux isotopes du carbone, de l'azote et de l'oxygène grâce à des couplages de fragments marqués au deutérium sur les chaînes latérales des résidus d'une protéine analysée. C'est l'approche utilisée par Schmidt et al en 2005 et la technique ICPL (pour « Isotope-Coded Protein Labelling »), abordée au paragraphe suivant. Un autre avantage est la possibilité de se servir des propriétés d'échanges proton/deutérium (H/D) de la SID-MS pour mesurer des cinétiques d'échange en fonction de paramètres expérimentaux (échantillon, nature et forme de la biomolécule analysée etc…) et de les relier à des constantes thermodynamiques. C'est le cas des approches SUPREX et PLIMSTEX qui seront abordées dans un second temps.

III.A. La dilution isotopique en MALDI-ToF-MS

Il existe des travaux qui visent à accéder à la quantification par dilution isotopique en MALDI-MS. Habituellement, le MALDI n'est pas particulièrement adapté à la quantification à cause de la forte dépendance, de la part du signal obtenu, envers les conditions de co-cristallisation analyte/matrice. Un certain nombre d'études en protéomique et qui ont eu recours à l'analyse par MALDI-ToF-MS se servent de relations semi-quantitatives. Cela mis à part, les hauteurs de pics sur un spectre MALDI ne sont pas nécessairement le reflet exact de la concentration de l'analyte dans l'échantillon et ce pour plusieurs raisons. Tout d'abord le rendement d'ionisation ; celui-ci serait de 0,01 à 0,1 % d'après les études menées par R. KNOCHENMUSS, d'où une faible représentativité de la quantité de molécules présentes dans un dépôt. Deuxièmement, il peut exister des compétitions à l'ionisation entre plusieurs composés au sein de l'échantillon et, en fonction de la cristallisation des différents composés, cet effet peut être plus ou moins important et donc créer une certaine dispersion dans les résultats observés. Cet aspect de cristallisation est directement relié à l'homogénéité du dépôt et donc à une représentativité de la zone analysée pour l'ensemble du dépôt qui est primordiale. Enfin, si les hauteurs de pics sont sujettes à d'importantes variations, il est plus judicieux de s'intéresser aux aires sous les pics et d'avoir recours à la technique de la dilution isotopique pour obtenir des mesures plus justes et précises.[469] Une différence par rapport à l'ionisation ESI est la présence dans la région des « basses » masses (en deçà de 1 000 Th) d'un nombre important d'ions provenant de la matrice et d'adduits ou fragments de clusters à base de matrice. La coexistence de ces ions de haute intensité, particulièrement dans des conditions d'analyse avec une faible quantité d'analyte, peut interférer avec la détection de composés cibles lorsque la masse de ceux-ci se rapproche des interférences sus-citées. La distinction entre le bruit de fond et les ions d'intérêt est donc primordiale.

La plus directe des méthodes applicables en MALDI-ToF-MS reste l'option qui consiste simplement en le couplage d'un marqueur isotopique sur la molécule à analyser qui sera utilisée en tant qu'étalon interne. C'est celle utilisée par Schmidt et al. en 2005 pour la publication d'une méthode de protéomique quantitative baptisée ICPL (voir Figure 111 p.184).[470] Elle est basée sur le marquage de groupements amines libre. Le marquage en question est effectué après dénaturation de la protéine et réduction des ponts disulfure dans le but d'atteindre le plus de sites aminés libres possible. La méthode a été appliquée à l'analyse du protéome d'*E. coli*. L'inconvénient majeur de cette approche est l'obligation de passer par une étape de vérification de la complétion du marquage chimique qui nécessite l'emploi de nicotinyle d'N-hydroxysuccinimide. Ce dernier permet de modifier

[469] S. S. Bansal, J. M. Halket, J. Fusova, A. Bomford, R. J. Simpson, N. Vasavda, S. L. Thein, R. C. Hider, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **2009**, *23*, 1531–1542
[470] A. Schmidt, J. Kellermann, F. Lottspeich, *PROTEOMICS* **2005**, *5*, 4–15

le pI (pour « Point isoélectrique ») des protéines partiellement marquées pour les séparer de celles qui le sont totalement. Cette méthode permet d'obtenir des résultats justes, précis et reproductibles tout en fournissant d'importantes données sur la séquence de la protéine, PTM et isoformes comprises. Cependant le nombre de tirs LASER utilisés (2 500 par peptide analysés) force un temps d'analyse important pour l'ensemble du protéome.

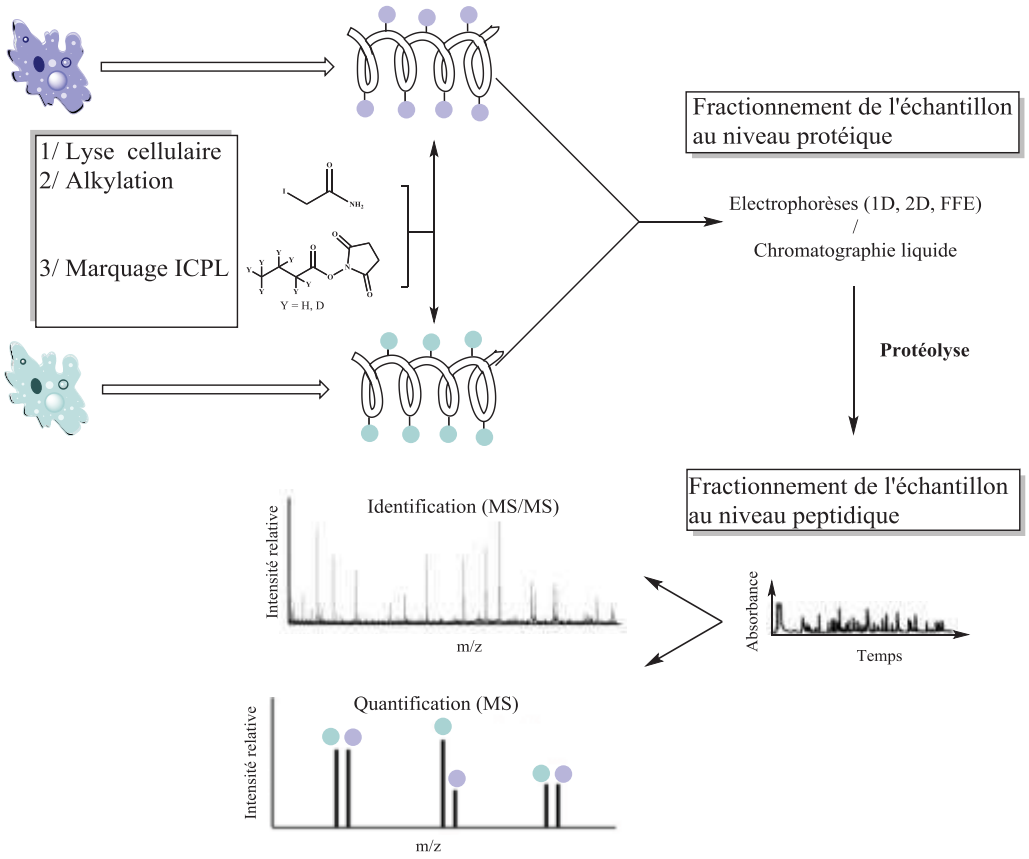


Figure 111 : Schéma général pour la méthode de marquage de protéine ICPL. L'alkylation se fait par l'iodoacétamide et le marquage par le butyrate d'N-hydroxysuccinimide directement après lyse de la cellule. Vient ensuite le marquage grâce à un groupement sous forme légère ou lourde qui affiche un ester d'N-hydroxysuccinimide. Après rassemblement des deux échantillons, la réduction de la complexité protéique de l'échantillon passe par des méthodes de type FFE (pour « Free Flow Electrophoresis »), LC ou encore Electrophorèse 1D ou 2D. Une étape supplémentaire de séparation est effectuée au niveau peptidique par chromatographie 2D. Les peptides marqués apparaissent par paires séparées par une différence de masse constante en mode MS pour permettre la quantification. Le spectre MS/MS sert, quant à lui, à identifier les peptides

Une seconde étude se servant d'un marquage chimique ciblant une protéine a été présentée par Sogawa et al. en 2011 dans laquelle l'équipe mesure des fragments α de chaîne C de fibrinogène (FIC 5.9).[471] La même équipe avait déjà publié l'observation de changements dans l'abondance de FIC 5.9 pendant une période de sobriété donnée. Ces variations étaient détectables par des méthodes conventionnelles sans avoir recours à la SID-MS. En revanche, dans le cas d'une hépatite C chronique, les différences entre les niveaux d'expression de FIC 5.9 d'une part des patients, d'autre part du

[471] K. Sogawa, Y. Kodera, K. Noda, Y. Ishizuka, M. Yamada, H. Umemura, K. Maruyama, T. Tomonaga, O. Yokosuka, F. Nomura, *Clin. Chim. Acta* **2011**, *412*, 1094–1099

groupe contrôle étaient si faibles que les mesures effectuées n'étaient pas significatives par méthode conventionnelle. D'où le recours particulièrement adapté de la SID-MS à ces groupes de personnes. Le suivi de transitions par SRM/MRM a été largement utilisé et validé pour la quantification comme alternative aux expérimentations immunologiques en faisant appel à la SID-MS pour la découverte de biomarqueurs. C'est dans ce contexte que la technique MALDI est introduite pour être validée de la même manière grâce au recours à la SID-MS. Bien entendu, il est possible de refléter l'abondance de la protéine FIC 5.9 sans recours à l'addition d'un étalon, comme cela a été publié.[472] C'est oublier le fait que l'ajout de cet étalon (i.e : un fragment peptidique de 5,9 KDa de FIC 5.9 marqué par un isotope) combiné au système ClinProt utilisé en diagnostic clinique, permet d'améliorer la fiabilité de la mesure, en l'occurrence des intensités des signaux MS, de ce fragment ciblé en tant que biomarqueur. De plus, cela facilitera par la même occasion la comparaison inter laboratoire, condition *sine qua non* à une validation clinique d'une méthode pour une application à grande échelle.

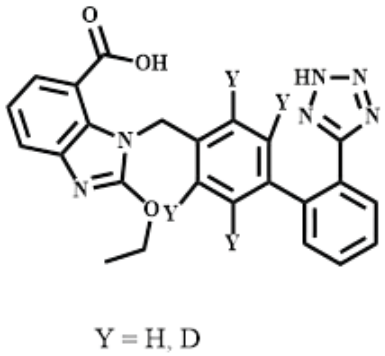


Figure 112 : Structure du Candesartan (CAD) sous forme légère (Y = H) ou lourde (Y=D, CAD-d_4)). C'est un antagoniste des récepteurs de l'angiotensine II impliqué dans le traitement l'hypertension artérielle et de l'insuffisance cardiaque avec disfonction cystolique ventriculaire gauche

Enfin, une troisième étude publiée en 2013 par Nakanishi et al. utilise la SID-MS combinée à la technique MALDI pour quantifier le Candesartan (voir Figure 112 p.185) dans du plasma de souris et même dans des coupes de tissus par imagerie MALDI en mode SRM grâce à la fragmentation d'ions métastables par PSD (pour « Post Source Decay, voir Figure 113 p.186).[473] Un étalon deutéré a été utilisé dans cette étude en tant qu'étalon interne.

[472] K. Sogawa, S. Itoga, T. Tomonaga, F. Nomura, *Alcohol. Clin. Exp. Res.* **2007**, *31*, S22–S26
[473] T. Nakanishi, S. Takai, D. Jin, T. Takubo, *Mass Spectrom.* **2013**, *2*, A0021–A0021

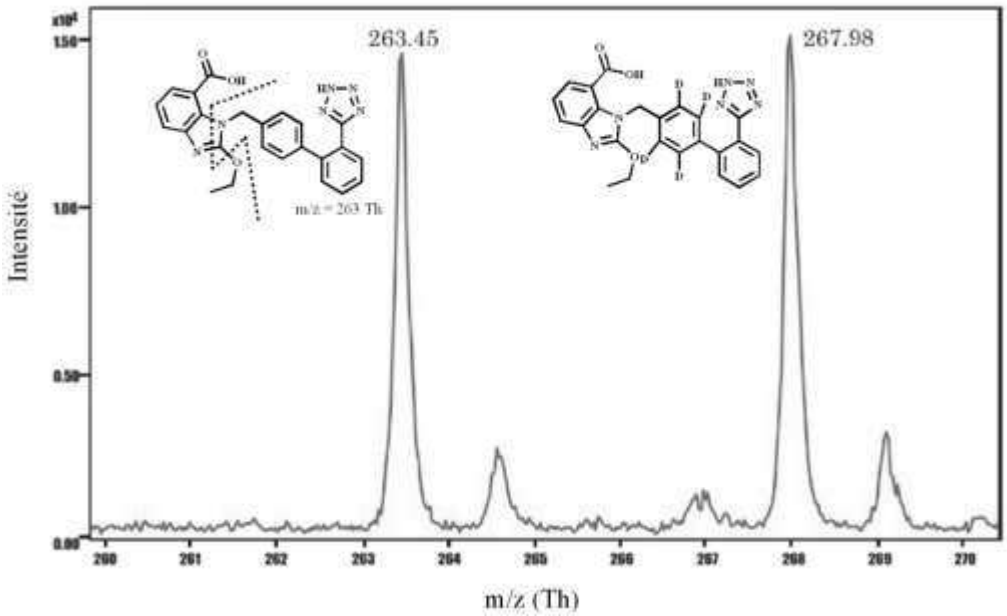


Figure 113 : Spectre MALDI PSD des molécules CAD et CAD-d_4 obtenue par Nakanishi et al. en 2013

Cette étude a montré un très bon étalonnage avec une pente de 0,91 et une ordonnée à l'origine proche de l'origine à 0,02 tout en affichant des coefficients de variation de 3,4 à 17,3 %. L'intérêt de cette étude réside également dans la capacité de la technique MALDI combinée à la SID-MS pour caractériser la répartition spatiale de la protéine aussi bien dans les vaisseaux sanguins que dans le plasma.

Actuellement, l'utilisation du MALDI-ToF-MS pour la quantification de biomolécules est restée très limitée en se cantonnant à de la mesure d'abondances relatives dans des échantillons biologiques de protéines à travers l'analyse par MS et MS^2 des peptides protéolytiques et à la mesure de petites molécules par PSD. Cela ouvre la voie à de prometteuses investigations pour développer des méthodologies innovantes de quantification de peptides en complémentarité des techniques existantes principalement appropriées aux études protéomiques de type « shotgun ».

III.B. Les approches par étude thermodynamique : SUPREX et PLIMSTEX

Les techniques SUPREX et PLIMSTEX sont deux techniques particulièrement adaptées à la spectrométrie de masse étant donné qu'elles permettent un suivi de variations de masse en fonction de la charge en deutérium d'une protéine donnée. Ces études ont été menées en MALDI-MS et d'un point de vue thermodynamique. Ces deux techniques détaillées dans ce paragraphe, contrairement aux méthodologies décrites au chapitre 2 p.61, permettent d'évaluer la stabilité des protéines *in vitro* et *in vivo* ainsi que des constantes de dissociation de complexes protéines-ligand.[474] Pour parvenir à cela, elles utilisent les propriétés de l'échange H/D et une analyse par spectrométrie de masse. En effet, l'échange H/D est plus ou moins rapide selon l'acidité plus ou moins prononcée d'un proton

[474] K. D. Powell, T. E. Wales, M. C. Fitzgerald, *Protein Sci. Publ. Protein Soc.* **2002**, *11*, 841–851

considéré. Ainsi un proton amide s'échangera beaucoup plus rapidement qu'un proton porté par un carbone aliphatique sans hétéroélément électronégatif proche. Généralement les échanges H/D pour les approches SUPREX et PLIMSTEX se font dans différents tampons d'échange deutérés.

La première technique à avoir été développée est l'approche SUPREX par Powell et al. en 2002,[475] illustrant la sensibilité et la spécificité de la spectrométrie de masse en recherche vis-à-vis des protéines. Cette approche permet en premier lieu d'éviter certaines limitations des traditionnelles techniques de calorimétrie et de spectroscopie comme la quantité importante de protéine nécessaire ou l'impossibilité d'effectuer des mesures de criblage à haut débit ni même l'analyse de complexes en mélange.[476,477,478,479] L'équipe a étudié quatre modèles protéines-ligands dont un complexe formé entre une protéine G et un anticorps de mammifère,[480,481] un complexe formé entre deux protéines identiques,[482,483,484,485] un complexe tertiaire d'ADN[486,487] et un complexe protéase-inhibiteur.[488] Pour chacun de ces complexes l'échange H/D a été rendu possible grâce à des tampons d'échange deutérés contenant également des dénaturants à différentes concentrations et la proportion de deutérium déterminée par MALDI-MS. Ainsi, la différence de masse observée après dénaturation en fonction de la concentration en dénaturant permet d'accéder via une équation thermodynamique à l'enthalpie libre de repliement (« folding » en Anglais). Par la suite, l'étude des variations de ces énergies, traduisant une variation dans la stabilité du complexe protéine-ligand, a permis à l'équipe de remonter jusqu'aux constantes de dissociation des complexes.

Equation 7 : Relation thermodynamique reliant l'enthalpie libre d'un complexe protéine-ligand à la concentration en agent dénaturant correspondant au point d'inflexion de la courbe représentant la différence de masse en fonction de la concentration en agent dénaturant utilisée

$$-\Delta G_f^0 = mC_{SUPREX}^{1/2} + RT\left[\frac{\ln(\frac{< k_{int} > t -}{0.693} - 1}{\frac{N^n}{2^{1n-1}}[P]^{n-1}}\right]$$

[475] K. D. Powell, S. Ghaemmaghami, M. Z. Wang, L. Ma, T. G. Oas, M. C. Fitzgerald, *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 10256–10257
[476] J. A. Schellman, *Biopolymers* **1975**, *14*, 999–1018
[477] C. N. Pace, T. McGrath, *J. Biol. Chem.* **1980**, *255*, 3862–3865
[478] J. F. Brandts, L. N. Lin, *Biochemistry (Mosc.)* **1990**, *29*, 6927–6940
[479] B. W. Sigurskjold, *Anal. Biochem.* **2000**, *277*, 260–266
[480] T. Gallagher, P. Alexander, P. Bryan, G. L. Gilliland, *Biochemistry (Mosc.)* **1994**, *33*, 4721–4729
[481] D. J. Sloan, H. W. Hellinga, *Protein Sci.* **1999**, *8*, 1643–1648
[482] F. M. Richards, P. J. Vithayathil, *J. Biol. Chem.* **1959**, *234*, 1459–1465
[483] J. M. Sturtevant, R. P. Hearn, F. M. Richards, G. D. Watt, *Biochemistry (Mosc.)* **1971**, *10*, 806–817
[484] A. A. Schreier, R. L. Baldwin, *J. Mol. Biol.* **1976**, *105*, 409–426
[485] J. M. Goldberg, R. L. Baldwin, *Biochemistry (Mosc.)* **1998**, *37*, 2546–2555
[486] J. J. He, K. S. Matthews, *J. Biol. Chem.* **1990**, *265*, 731–737
[487] V. LeTilly, C. A. Royer, *Biochemistry (Mosc.)* **1993**, *32*, 7753–7758
[488] T. Lee, G. S. Laco, B. E. Torbett, H. S. Fox, D. L. Lerner, J. H. Elder, C. H. Wong, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1998**, *95*, 939–944

Avec :

- m, la variation infinitésimale d'enthalpie libre en fonction de la concentration en dénaturant $\delta \Delta G_f^0 / \delta [dénaturant]$.
- $C_{SUPREX}^{1/2}$, la concentration de dénaturant pour laquelle une inversion de courbe de type sigmoïde est observée.
- R, la constante des gaz parfaits.
- T, la température en K.
- $< k_{int} >$, le taux d'échange moyen intrinsèque d'un proton amidique.
- t, le temps d'échange H/D utilisé.
- n, le nombre de sous-unités dans la protéine.
- [P], la concentration en protéine exprimée en équivalents N-mères.

Une seconde étude proposée par la même équipe a démontré la justesse et la précision de la technique par des mesures de constantes de dissociations de complexes formés à partir de deux protéines (abl SH3 et la protéine S) et de différents ligands peptidiques.[489] Les résultats obtenus sont en majorité en bonne corrélation avec les données tirées de la littérature (e.g : 28 ± 8 µM versus 28,8 µM pour le complexe abl SH3 – peptide 2) malgré certaines valeurs clairement différentes (e.g : 400 ± 70 nM versus 41 nM pour le complexe S-protein – peptide 8).

Equation 8 : Relation thermodynamique pour le calcul des constantes de dissociation par la méthode SUPREX

$$\Delta \Delta G_f^0 = -nRTln[1 + ([L]/K_d)]$$

Avec :

- n, le nombre de sites de liaison indépendants.
- R, la constante des gaz parfaits.
- [L], la concentration en ligand libre.
- T, la température en K.

Ces travaux ont permis de montrer que l'approche SUPREX est tout à fait applicable à l'analyse thermodynamique de complexes protéines-ligands y compris des complexes formés avec des petites molécules et des peptides. Cette approche permet notamment de prédire des constantes de dissociation de tels systèmes avec une bonne justesse (valeurs comprises dans un intervalle de facteur 2 à 3). Elle offre également quelques avantages non négligeables comme la capacité à effectuer des mesures pour du criblage à haut débit et de manière automatisée, la capacité à analyser de très faibles quantités de matériel biologique (de l'ordre de la picomole), et enfin la

[489] K. D. Powell, M. C. Fitzgerald, *Biochemistry*, **2003**, *42*, 4962–4970

possiblité d'analyser aussi bien des complexes protéines-ligands purs ou en mélange *in vivo* et *in vitro*.

L'approche PLIMSTEX (pour « Protein-Ligand Interactions in solution by MS Titration and H/D EXchange ») a été développée après la technique SUPREX en 2003 par Zhu et al.[490] Elle est peu sujette aux limitations sus-citées à propos des techniques calorimétriques et spectroscopiques et ne requiert pas l'utilisation de dénaturant, à l'inverse de SUPREX. En outre, cette technique est capable de suivre non seulement des complexes protéine-ligand mais également des états intermédiaires sans interférence de la part de variations de protéines, de ligand, de tampon, de concentrations de sels, de pH ni même de température. L'essence de la technique repose sur l'apparition d'un changement dans l'échange H/D au cours du titrage et sur un déplacement spectral (ΔD_i) plutôt que sur une variation d'amplitude spectrale comme c'est le cas pour la mesure d'absorbances.

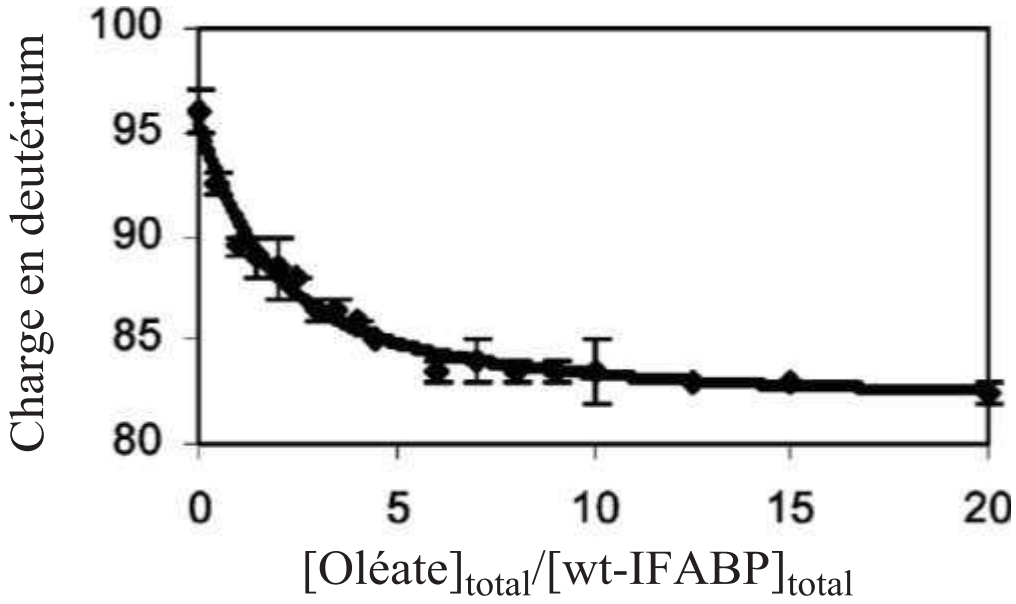


Figure 114 : Courbe PLIMSTEX obtenue avec la protéine I-FABP « wild-type » (pour « Intestinal Fatty Acid Binding Protein ») à 0,3 µM titrée avec l'oléate de potassium dans un tampon contenant 95 % de D_2O après 3 h d'échange H/D. La courbe en trait plein correspond à la modélisation mathématique avec une interaction à 2 éléments (protéine et ligand) dans un rapport 1:1 et un modèle à 3 paramètres : une constante d'équilibre (K_1), une valeur de masse (D_0) pour la protéine nue et une différence de masse (ΔD_1) correspondant à la charge en deutérium

Le principe est d'équilibrer la protéine d'intérêt avec différentes concentrations d'un ligand choisi dans un tampon aqueux avant d'initier l'échange H/D par ajout de D_2O. Après avoir atteint un état d'équilibre, l'échange est stoppé puis les sites non amidiques de la protéine immobilisée sont rétro échangés par dessalage sur Zip-Tip greffé en C18. Cette étape a pour conséquence majeure la dissociation du ligand qui va ainsi libérer la protéine chargée en deutérium pour pouvoir être mesurée par LC-MS. Cela permet de tracer la différence de masse observée entre la protéine deutérée et non deutérée, autrement dit la charge en deutérium, en fonction de la concentration

[490] M. M. Zhu, D. L. Rempel, Z. Du, M. L. Gross, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 5252–5253

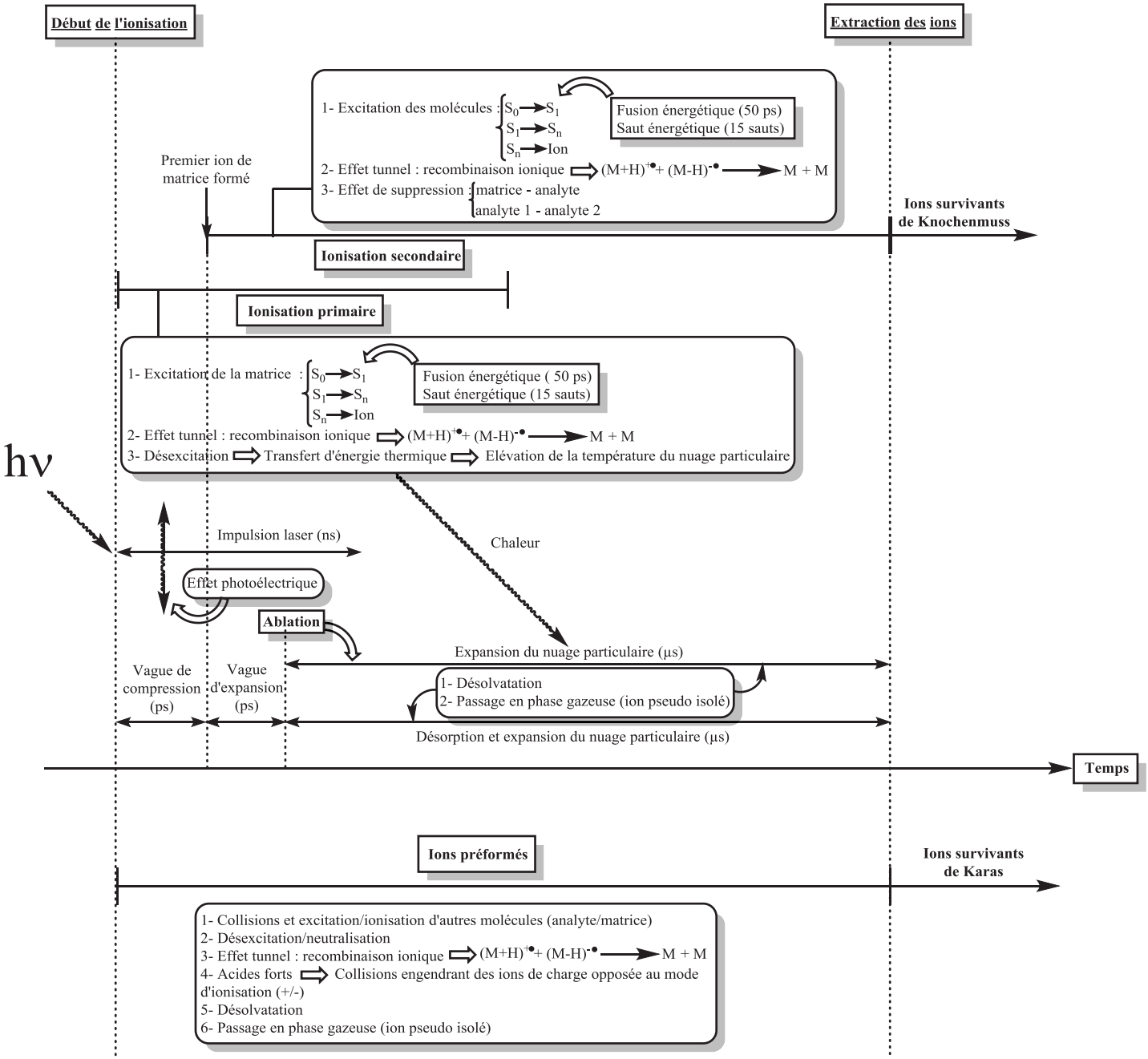
totale en ligand pour obtenir une courbe PLIMSTEX (voir Figure 114 p.189). Un modèle mathématique d'équations différentielles reliant les concentrations en ligand, les concentrations en protéines et les constantes d'équilibre pour chaque site de liaison de la protéine est utilisé et résolu pour correspondre à l'évolution des valeurs de la courbe PLIMSTEX et en extraire les différentes constantes de dissociation. Un intérêt particulier de la méthode PLIMSTEX réside dans le signe attribué à la grandeur ΔD_i : si celle-ci est positive, cela indique que la liaison de « i » ligands aboutit à une sorte de fermeture de la protéine et donc à une charge en deutérium moins importante que pour sa forme nue ; si le déplacement spectral est négatif, cela signifie au contraire que la protéine adopte une structure plus ouverte ; enfin, si la valeur est proche de zéro, cela signifie peu de changements dus à l'interaction avec le ligand.

La méthode a été appliquée sur quatre modèles protéine-ligand incluant des protéines et des métaux et ne requiert que quelques picomoles de matériel biologique. De plus, avec quelques ajustements sur le procédé en fonction des systèmes étudiés, la technique peut tout à fait être automatisée et adaptée pour le criblage à haut débit.

Au final, ces deux techniques, SUPREX et son évolution PLIMSTEX, sont deux méthodes très intéressantes pour la mesure d'interactions protéine-ligand dans la mesure où elles ne requièrent que très peu de matériel biologique ainsi qu'un nombre de composés limité (une solution de deutérium, la protéine cible, son ligand et un tampon) pour le bon déroulement des analyses. De plus, elles permettent l'accès à la fois aux constantes de dissociation, mais également à des grandeurs thermodynamiques pour caractériser les différentes interactions. Leur procédé peut également être automatisable notamment la partie concernant le traitement informatique de résolution des équations grâce à des modèles qui peuvent être mis au point et développés au sein de bases de données à inclure dans des solutions logicielles typiquement. A ce stade, un terminal informatique relié directement à l'appareil effectuant les mesures d'incréments de masse permettrait un traitement efficace, rapide et routinier des analyses.

Conclusion

L'ionisation MALDI est une technique moderne d'ionisation largement utilisée pour de la caractérisation de biomolécules qui arrive à un niveau de développement et de compréhension fondamental poussé. Voici une proposition de schéma pour conclure sur les modèles qui décrivent l'ionisation MALDI et qui, bien qu'en apparence s'opposent, pourraient gagner à se rassembler.


Début de l'ionisation
Extraction des ions
1- Excitation des molécules : $S_0 \rightarrow S_1$, $S_1 \rightarrow S_n$, $S_n \rightarrow$ Ion
Fusion énergétique (50 ps)
Saut énergétique (15 sauts)
2- Effet tunnel : recombinaison ionique $(M+H)^{+\bullet} + (M-H)^{-\bullet} \rightarrow M + M$
3- Effet de suppression : matrice - analyte ; analyte 1 - analyte 2
Premier ion de matrice formé
Ions survivants de Knochenmuss
Ionisation secondaire
Ionisation primaire
1- Excitation de la matrice : $S_0 \rightarrow S_1$, $S_1 \rightarrow S_n$, $S_n \rightarrow$ Ion
Fusion énergétique (50 ps)
Saut énergétique (15 sauts)
2- Effet tunnel : recombinaison ionique $(M+H)^{+\bullet} + (M-H)^{-\bullet} \rightarrow M + M$
3- Désexcitation ⇨ Transfert d'énergie thermique ⇨ Elévation de la température du nuage particulaire
hν
Impulsion laser (ns)
Chaleur
Effet photoélectrique
Ablation
Expansion du nuage particulaire (µs)
Vague de compression (ps)
Vague d'expansion (ps)
1- Désolvatation
2- Passage en phase gazeuse (ion pseudo isolé)
Désorption et expansion du nuage particulaire (µs)
Temps
Ions préformés
Ions survivants de Karas
1- Collisions et excitation/ionisation d'autres molécules (analyte/matrice)
2- Désexcitation/neutralisation
3- Effet tunnel : recombinaison ionique ⇨ $(M+H)^{+\bullet} + (M-H)^{-\bullet} \rightarrow M + M$
4- Acides forts ⇨ Collisions engendrant des ions de charge opposée au mode d'ionisation (+/-)
5- Désolvatation
6- Passage en phase gazeuse (ion pseudo isolé)

Du point de vue de la quantification, l'utilisation du MALDI-ToF-MS reste limitée à la mesure d'abondances relatives de petites molécules et commence à être appliqué à la mesure de protéines via leurs peptides protéolytiques marqués (ICPL). En outre, deux techniques (SUPREX / PLIMSTEX) se révèlent très riches pour la mesure d'interactions protéine-ligand en requérant peu de matériel biologique, un nombre limité de composés tout en permettant l'accès à des constantes cinétiques de dissociation et aux grandeurs thermodynamiques associées. Autre point fort : la possibilité d'automatiser le procédé et notamment le traitement informatique de résolution des équations.

Après avoir traité l'ionisation MALDI sur le plan fondamental et l'aspect quantification basé sur celle-ci il sera question dans le chapitre suivant du sujet d'application, à savoir les peptides et leur synthèse depuis les premiers pas de ce domaine de la chimie organique jusqu'aux technologies modernes.

Chapitre 4 : La synthèse peptidique en quatre points : principe, stratégies, agents de couplages et choix pour les peptides synthétisés

Dans ce chapitre nous allons aborder la synthèse peptidique sous un aspect historique et fondamental avant de se focaliser sur les stratégies de synthèse et les récentes protections mises en place pour la synthèse peptidique puis sur les différentes avancées en termes d'agents de couplage développés.

Approche historique de la synthèse peptidique

Historiquement, le premier à avoir synthétisé un peptide est Théodore Curtius dans les années 1880 pendant ses études de doctorat avec H. Kolbe.[491] Il a réussi à obtenir le premier dipeptide avec protection en N-ter (benzoylglycylglycine) en faisant réagir un sel d'argent de glycine avec du chlorure de benzoyle (voir Schéma réactionnel 1 ci-dessous).[492] Quelques années après cela, le premier papier scientifique faisant état de la synthèse d'un dipeptide a été publié en 1901 par Emile Fischer en collaboration avec Ernest Fourneau.[493] L'idée développée a été de préparer la glycylglycine par hydrolyse acide de dicétopipérazine (voir Schéma réactionnel 1 ci-dessous). Cela marquât le début de la chimie des peptides.[494,495]

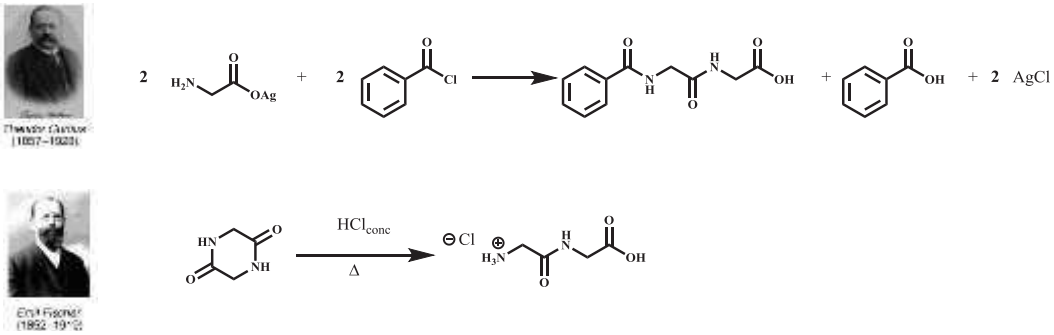


Schéma réactionnel 1 : Premières synthèses de dipeptides par T. Curtius suivit par E. Fischer en 1901

Les problèmes majeurs des méthodes développées par T. Curtius et E. Fischer étaient l'obtention des acides aminés de série L énantiomériquement purs sans oublier l'absence de groupes protecteurs d'amines. Une partie du problème a été résolu par M. Bergmann (un étudiant d'E. Fischer) et L. Zervas qui ont introduit le groupement carbobenzoxy (Cbz, également connu sous le nom « benzyloxycarbonyle », Boc) en 1932.[496,497,498] Ce groupement a par la suite été désigné par la

[491] T. Kimmerlin, D. Seebach, *The Journal of Peptide Research* **2008**, *65*, 229–260
[492] T. Curtius, *Journal für Praktische Chemie* **1882**, *26*, 145–208
[493] E. Fischer, E. Fourneau, *Berichte der deutschen chemischen Gesellschaft* **1901**, *34*, 2868–2877
[494] T. Curtius, *Journal für Praktische Chemie* **1904**, *70*, 57–72
[495] E. Fischer, *Berichte der deutschen chemischen Gesellschaft* **1905**, *38*, 605–619
[496] M. Bergmann, L. Zervas, *Berichte der deutschen chemischen Gesellschaft (A and B Series)* **1932**, *65*, 1192–1201

lettre « Z » en hommage à son inventeur, L. Zervas. Ils ont montré que ce groupement protecteur empêchait l'épimérisation pendant la formation de la liaison peptidique contrairement aux protections de type N-acyle et N-benzoyle. Par la suite, cette stabilité a été démontrée pour toutes les protections de type uréthane comme propriété de ces dernières. L'utilisation de ces protections a marqué le départ de la synthèse peptidique alors florissante par des petites molécules comme le glutathion et la carnosine et son point d'orgue, 20 ans plus tard, avec la synthèse d'une hormone active l'oxytocine (octapeptide) par V. du Vigneaud en 1953 qui obtint le prix nobel de chimie 2 ans plus tard pour ces travaux (voir Figure 115 ci-dessous).[499]

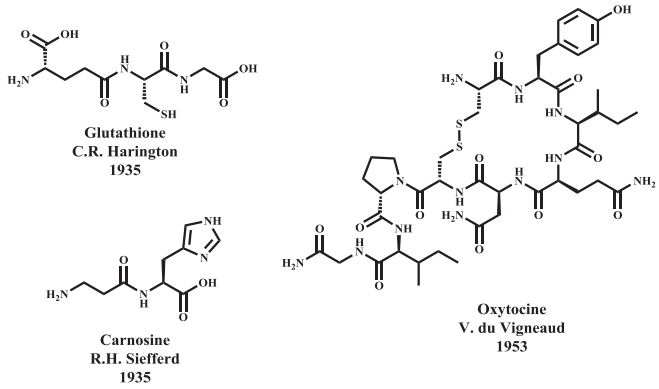


Figure 115 : Structures des peptides parmi les premiers à avoir été synthétisés et ayant une activité biologique, dont l'oxytocine qui présente une structure proche de celle de l'AVP

I. Principes fondamentaux de la synthèse peptide

I.A. Les acides aminés protéogènes, structure et nomenclature

La particule élémentaire de la synthèse peptidique et de manière plus générale de la protéogénèse, à savoir l'acide aminé, fait partie de l'ensemble des 20 acides aminés naturels dits protéogènes, menant à la fabrication de protéines ; sachant qu'une chaîne polypeptidique est considérée comme étant une protéine à partir d'une masse de 5 000 Da, ce qui correspond à une cinquantaine de résidus.[500]

Les 20 acides aminés protéogènes sont tous composés d'un carbone intermédiaire (C_α) portant la chaîne latérale et étant asymétrique mis à part la glycine qui possède deux hydrogènes sur son carbone alpha (voir Figure 116 ci-dessous).Il a été convenu de différencier les deux familles d'acides aminés en série L et D selon la représentation de Fischer. La série L étant la série naturelle la plus répandue et la série D étant beaucoup plus discrète dans le monde vivant. A titre d'exemple, il

[497] M. Bergmann, L. Zervas, *Berichte der deutschen chemischen Gesellschaft (A and B Series)* **1932**, *65*, 1201–1205
[498] M. Bergmann, L. Zervas, J. P. Greenstein, *Berichte der deutschen chemischen Gesellschaft (A and B Series)* **1932**, *65*, 1692–1696
[499] V. du Vigneaud, C. Ressler, J. M. Swan, C. W. Roberts, P. G. Katsoyannis, *Journal of the American Chemical Society* **1954**, *76*, 3115–3121
[500] G. A. Petsko, D. Ringe, D. Charmot-Bensimon, *Structure et fonction des protéines*, De Boeck, Bruxelles, **2009**

n'a été que récemment montré que les acides aminés D étaient impliqués dans certaines maladies comme le D-aspartate qui serait impliqué dans la formation des plaques β-amyloïdes de la maladie d'Alzheimer.[501,502]

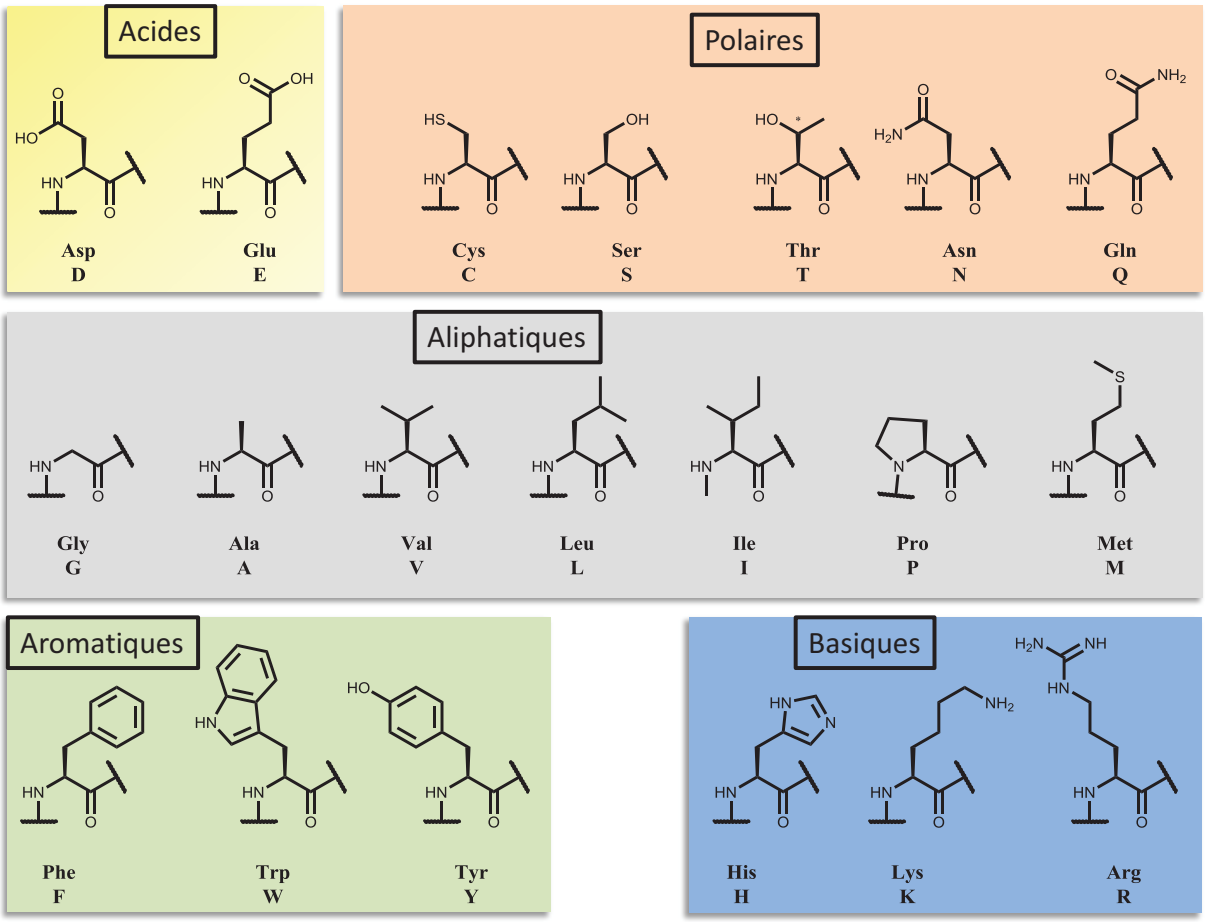


Figure 116 : Structures des résidus des 20 acides aminés protéogènes regroupés par leur caractère polaire, aliphatique, aromatique, acide et basique. Chaque acide aminé protéogène naturel s'est vu attribué un code trois lettres et un code une lettre

I.B. Principe de base

La synthèse peptidique en laboratoire, que ce soit en solution ou sur support solide, se fait dans le sens inverse de la biosynthèse, c'est-à-dire de l'extrémité C-ter vers l'extrémité N-ter.[503] En effet, la synthèse artificielle de peptides requiert une activation de l'acide aminé couplé qui, si elle est faite côté C-ter sur un peptide en cours de construction aura pour conséquence l'épimérisation du carbone alpha de l'acide aminé en bout de chaîne notamment par formation d'oxazolone (voir Schéma réactionnel 2 ci-dessous). C'est la raison pour laquelle les synthèses se sont rapidement tournées vers une construction dans le sens C-ter vers N-ter en utilisant des acides aminés protégés

[501] H. Mori, K. Ishii, T. Tomiyama, Y. Furiya, N. Sahara, S. Asano, N. Endo, T. Shirasawa, K. Takio, *Tohoku J. Exp. Med.* **1994**, *174*, 251–262
[502] Y. Mori, K. Aki, K. Kuge, S. Tajima, N. Yamanaka, Y. Kaji, N. Yamamoto, R. Nagai, H. Yoshii, N. Fujii, et al., *J. Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.* **2011**, *879*, 3303–3309
[503] M. Bodanszky, A. Bodanszky, *The Practice of Peptide Synthesis*, Springer-Verlag, Berlin ; New York, **1994**

sur leur amine libre et par activation de la fonction acide carboxylique pour former par substitution nucléophile la liaison amide plus souvent connue sous le nom de liaison peptidique.

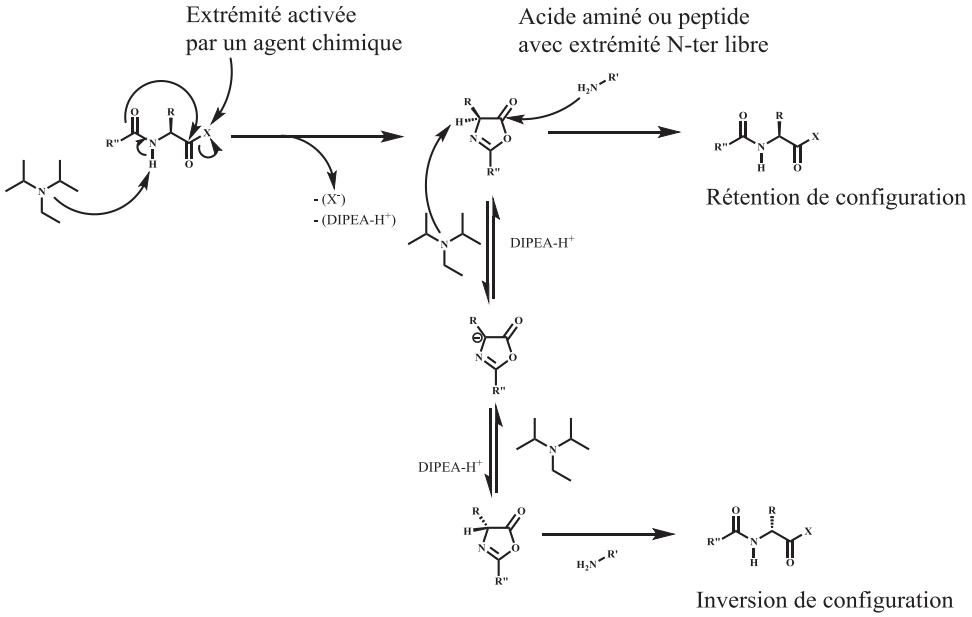


Schéma réactionnel 2 : Inversion de configuration absolue du C_α un acide aminé par formation d'oxazolone protonée. Cela se produit lorsque la fonction acide carboxylique est activée sur un dipeptide (ou plus) dont l'avant-dernier acide aminé n'est pas une glycine pour la formation d'une liaison peptidique

II. La protection des acides aminés au service des stratégies de synthèse en phase liquide et solide

Dans ce paragraphe nous allons dans un premier temps aborder l'importance des groupements protecteurs en synthèse peptidique avant de passer aux avancées les concernant pour finir avec les deux stratégies de synthèse peptidique.

II.A. De l'utilité des groupements protecteurs

Il existe différentes protections des acides aminés qui peuvent être regroupées en fonction de leur cible : l'amine portée par le carbone α, la fonction acide carboxylique portée par ce même carbone et la chaîne latérale. Historiquement, en chimie organique, une protection efficace est un groupement qui va réagir sur une fonction organique de manière à la masquer face à des conditions réactionnelles ultérieures qui pourraient la modifier ; le deuxième critère étant le retrait de ce groupement chimique. Le rôle des protections en synthèse peptidique est légèrement différent. En effet, elles vont non pas protéger des fonctions d'une dégradation chimique mais plutôt empêcher ces fonctions de réagir lors de la formation de liaisons peptidiques. Cela permet d'éviter des réactions secondaires comme la formation de δ-lactame à partir d'une arginine.

La raison d'être de protections dites orthogonales en synthèse peptidique est par extension la possibilité de choisir quelle protection retirer à quel endroit du peptide en croissance pour achever la synthèse en cours sans redouter de réactions parasites qui mettraient en danger l'obtention du

produit final. On retrouve donc des protections de type uréthane – dont les plus connus sont le groupement Fmoc et le Cbz, carbonate ou carbamate (selon la fonction protégée) comme le ^{t}Boc ou encore de type allylique. Ces trois types de protections illustrent l'orthogonalité requise pour la synthèse peptidique puisqu'elles peuvent être retirées respectivement en milieu basique, acide ou sous action de dihydrogène/palladium. Récemment, un article a été publié au sein de l'IBMM par M. BERTHET présentant une nouvelle méthode chimiosélective de déprotection aussi bien sur la chaîne latérale que sur l'amine et l'acide carboxylique portés par le carbone α.[504] Cela ouvrant de nouvelles perspectives de protection/déprotection en rebattant les cartes de l'orthogonalité des protections d'acides aminés et de la compatibilité avec les différentes résines commerciales.

II.B. Avancées à propos des protections de chaînes latérales

Les principales avancées relatives aux chaînes latérales des acides aminés en concernent certains qui possèdent des groupements potentiellement réactifs comme l'acide aspartique. En effet cet acide aminé tend à former un aspartimide pendant le couplage peptidique qui peut conduire à plusieurs sous-produits (voir Figure 117 ci-dessous). Les premières protections étaient faites à base d'ester tertiobutylique ou de dérivé benzylique.[505] Récemment de nouvelles protections à base d'esters trialkylés de type 1,1-diisopropyléthyle ont été mises au point avec l'avantage d'une très bonne protection à haute température grâce aux degrés de liberté supplémentaires et particulièrement pour les séquences contenant un enchaînement « Asp-Gly », sujet à la formation de l'aspartimide.[506]

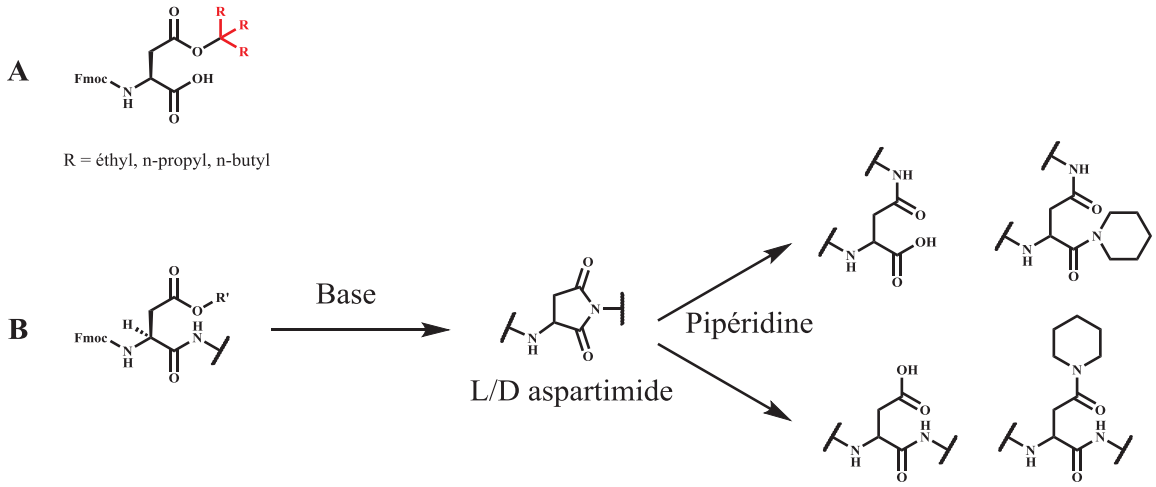


Figure 117 : Structure d'une nouvelle protection de l'acide aspartique (A) et réactions secondaires de formation d'aspartimide (B) conduisant à l'épimérisation de l'acide aspartique et à la formation de 9 produits en prenant en compte les formes L et D

[504] M. Berthet, F. Davanier, G. Dujardin, J. Martinez, I. Parrot, *Chemistry - A European Journal* **2015**, *21*, 11014–11016
[505] M. Quibell, D. Owen, L. C. Packman, T. Johnson, *Journal of the Chemical Society, Chemical Communications* **1994**, 2343
[506] R. Behrendt, S. Huber, R. Martí, P. White, *Journal of Peptide Science* **2015**, *21*, 680–687

Un second acide aminé potentiellement source de produits indésirables s'il n'est pas correctement protégé est l'arginine. Usuellement c'est le groupement Pbf (pour « (2,2,4,6,7-pentamethyl-2,3-dihydrobenzofuran-5-yl)-l5-sulfanedione ») qui est présent sur l'arginine commerciale en série Fmoc. Néanmoins la durée nécessaire à la déprotection totale de l'arginine peut aller de 1 à 2 h voire plus si plusieurs arginines sont présentes dans la séquence. Récemment un nouveau groupement protecteur a été développé ; il s'agit du MIS (pour « 1,2-Dimethylindole-3-sulfonyle ») qui possède un gros avantage par rapport à son prédécesseur, à savoir la possibilité d'être clivé totalement dans un mélange TFA/DCM 1:1 (v/v) en seulement 30 minutes alors que dans les mêmes conditions le groupement Pbf n'était clivé qu'à 4 % (voir Schéma réactionnel 3 ci-dessous). [507]

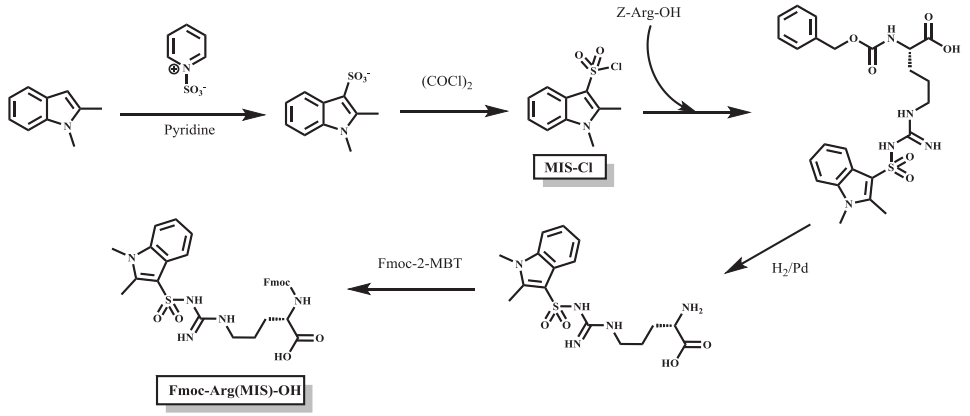


Schéma réactionnel 3 : Schéma réactionnel de préparation du chlorure de 1,2-dimethylindole-3-sulfonyle (MIS-Cl) et de la protection de la Fmoc-Arg(MIS)-OH à partir d'une Z-Arg-OH commerciale

Un troisième acide aminé relativement problématique en synthèse peptidique automatisé est la cystéine. En effet, lorsque cet acide aminé est préparé en solution pour une synthèse sur robot, sa conservation en solution peut s'avérer incertaine à long terme. Le groupement protecteur usuel de cet acide aminé est le fragment polyaromatique trityle, protection qui a depuis été améliorée avec la publication en 2015 d'un groupement non aromatique : le THP (pour « Tétra Hydro Pyranyle », voir Figure 118 ci-dessous). L'avantage de ce dernier est de limiter davantage l'épimérisation de la cystéine, une propension moindre à former des produits secondaires comme l'adduit 3-(1-pipéridyl)alanine (voir Schéma réactionnel 4 p.199)[508] tout en offrant une meilleure solubilité du peptide protégé comparé au groupe trityle, point important pour la synthèse de peptides naturels riches en cystéines.[509]

[507] A. Isidro, D. Latassa, M. Giraud, M. Álvarez, F. Albericio, *Organic & Biomolecular Chemistry* **2009**, *7*, 2565
[508] J. Lukszo, D. Patterson, F. Albericio, S. A. Kates, *Letters in Peptide Science* **1996**, *3*, 157–166
[509] I. Ramos-Tomillero, H. Rodríguez, F. Albericio, *Organic Letters* **2015**, *17*, 1680–1683

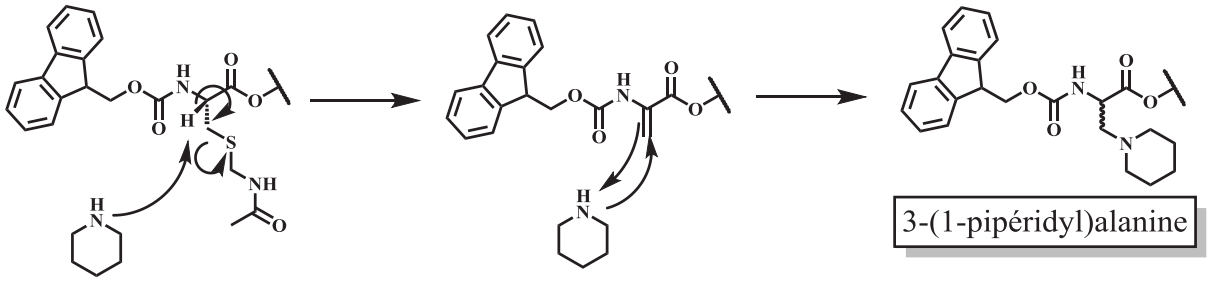


Schéma réactionnel 4 : Réaction de formation de 3-(1-pipéridyl)alanine à partir d'une cystéine protégée sur sa chaîne latérale par le groupement Acm (pour « Acétamidométhyle »)

Ce groupement protecteur acido labile peut être retiré très facilement et rapidement en 5 minutes avec plus de 99 % de cystéine déprotégée avec un mélange TFA/TIS/DCM à 10/1.5/88.5 (v/v/v).

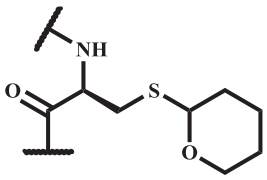


Figure 118 : Protection de chaîne latérale de cystéine par un groupement tétrahydropyrane (THP) acido labile

II.C. L'approche en solution pour la synthèse peptidique

La synthèse en phase liquide est l'approche classique et historique de la synthèse peptidique. En effet, comme pour toute réaction chimique il s'agissait alors de mettre en présence l'une de l'autre dans un solvant une molécule portant une fonction amine libre et une autre comportant une fonction acide carboxylique libre pour former la liaison peptidique.

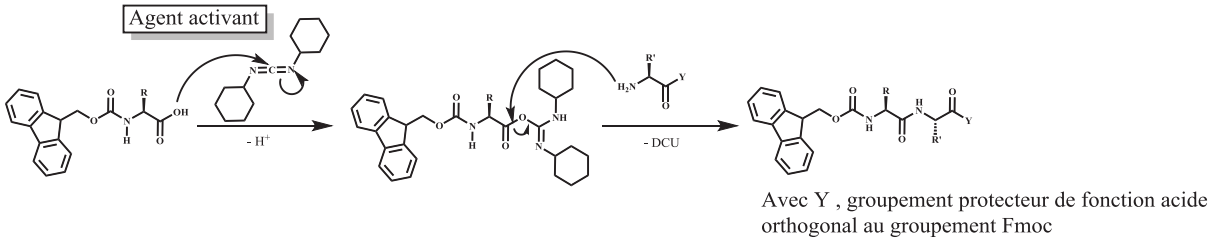


Schéma réactionnel 5 : Formation d'une liaison peptidique en solution dans le cas où la synthèse est effectuée en stratégie « Fmoc/tBu »

Le principe moderne est de mettre en jeu un acide aminé dont la fonction acide carboxylique sera activée par un agent dit « d'activation » (voir Schéma réactionnel 5 ci-dessus). La fonction amine de la seconde molécule sera alors apte à former la liaison peptidique par substitution nucléophile. La synthèse en solution a été supplantée progressivement en laboratoire par la synthèse sur support solide. En effet, celle-ci n'est devenue que rarement une alternative à la SPPS en raison de sa lenteur, des problèmes de racémisation rencontrés sans oublier la problématique de la solubilité des intermédiaires de synthèse et de leur purification.

II.D. La synthèse peptidique en phase solide (SPPS)

Depuis les premières synthèses de peptide par E. Fischer et T. Curtius au début du XX^{è} siècle, ce champ de recherche a énormément évolué tout particulièrement après la première publication de synthèse de peptides en phase solide par B. Merrifield.[510] Au cours des 10 dernières années les méthodes de synthèse par micro-onde ont démontré leur utilité en chimie organique avec une synthèse de peptides effectuée dans un four à micro-ondes domestique.[511,512] Malheureusement, cela ne permet pas seulement d'accélérer la synthèse peptidique, mais également les réactions secondaires et peut être aussi nuisible pour certains acides aminés sensibles à la chaleur. Cela n'a pas empêché le développement avec succès de nombreux appareils commerciaux utilisant les micro-ondes qui restent tout de même très efficaces en SPPS.[513,514] A noter cependant qu'une méthode de synthèse par micro-onde à basse température (LTMT pour « Low Temperature Microwave Technique ») a été optimisée pour un certain nombre de réactions sensibles à la chaleur comme la synthèse d'α-cétoamide ou l'hydrolyse de protéines.[515] Cette technique pourrait être étendue à l'ensemble des réactions de formation de liaison peptidique en SPPS.

A l'heure actuelle, la synthèse de peptides se fait aisément sur des automates spécialement conçus pour gérer les cycles de déprotection/couplage successifs avec des solutions de peptides en excès pour assurer un couplage quantitatif. En revanche certains acides aminés particuliers (souvent non naturels) d'un coût particulièrement élevé ne sont pas toujours adaptés à ce type de synthèse qui peut se faire à grande échelle. C'est la raison pour laquelle les acides aminés utilisés en synthèse peptidique doivent être bon marché, facile à utiliser et à manipuler, stables en solution pendant plusieurs jours et donc solubles dans les solvants usuels de SPPS sans oublier la possibilité de conduire des synthèses rapides.

II.D.1. La construction du peptide

Le récent succès des médicaments à base de peptides comme, par exemple des agonistes de type glucagon qui est impliqué dans la régulation de la glycémie, ont redonné un nouveau souffle et de l'attractivité à la synthèse peptidique,[516,517] auxquels s'ajoute l'émergence des matériaux biocompatibles à partir de peptides.[518]

---

[510] R. B. Merrifield, *Journal of the American Chemical Society* **1963**, *85*, 2149–2154
[511] P. Lidström, J. Tierney, B. Wathey, J. Westman, *Tetrahedron* **2001**, *57*, 9225–9283
[512] H. M. Yu, S. T. Chen, K. T. Wang, *The Journal of Organic Chemistry* **1992**, *57*, 4781–4784
[513] A. S. Galanis, F. Albericio, M. Grøtli, *Organic Letters* **2009**, *11*, 4488–4491
[514] S. Gunasekera, T. L. Aboye, W. A. Madian, H. R. El-Seedi, U. Göransson, *International Journal of Peptide Research and Therapeutics* **2013**, *19*, 43–54
[515] X. X. Tong Xing, *Progress in Chemistry* **2010**, *22*, 2462–2468
[516] K. Fosgerau, T. Hoffmann, *Drug Discovery Today* **2015**, *20*, 122–128
[517] A. A. Kaspar, J. M. Reichert, *Drug Discovery Today* **2013**, *18*, 807–817
[518] A. L. Boyle, D. N. Woolfson, *Chemical Society Reviews* **2011**, *40*, 4295

Deux stratégies principales coexistent en synthèse sur support, à savoir la stratégie Fmoc/^{t}Bu et la stratégie Boc/Bzl. A l'heure actuelle, une importante quantité de peptides sont synthétisés en stratégie Fmoc, souvent pratique, efficace, rapide et peu dangereuse (pas de HF), tandis que la stratégie Boc/Bzl est plutôt réservée à la préparation de composés particuliers et nécessite l'utilisation de HF pour le clivage des peptides accrochés aux encres. L'engouement engendré par cette voie (Fmoc/^{t}Bu) est illustré par la possibilité d'automatiser la production car ne faisant pas intervenir d'agent corrosif comme le TFA dans le processus de synthèse, mis à part l'étape terminale de clivage de la résine qui se fait hors automate. La construction du peptide peut être suivie par le relargage d'un composé fortement visible par UV pour le suivi des réactions de déprotection (voir Schéma réactionnel 6 ci-dessous).[519] Cette stratégie a aussi l'avantage d'afficher des conditions de clivage compatibles avec les protections de chaînes latérales des peptides et avec des modifications comme la phosphorylation et la glycosylation ouvrant ainsi l'accès à des peptides mimes de PTM (pour « Post Translational Modification »). L'autre avantage du groupement Fmoc est, comme pour les autres protections de type uréthane, l'effet électrodonneur produit sur l'azote qui empêche les réactions de racémisation par formation d'oxazolone lors des étapes de couplage.

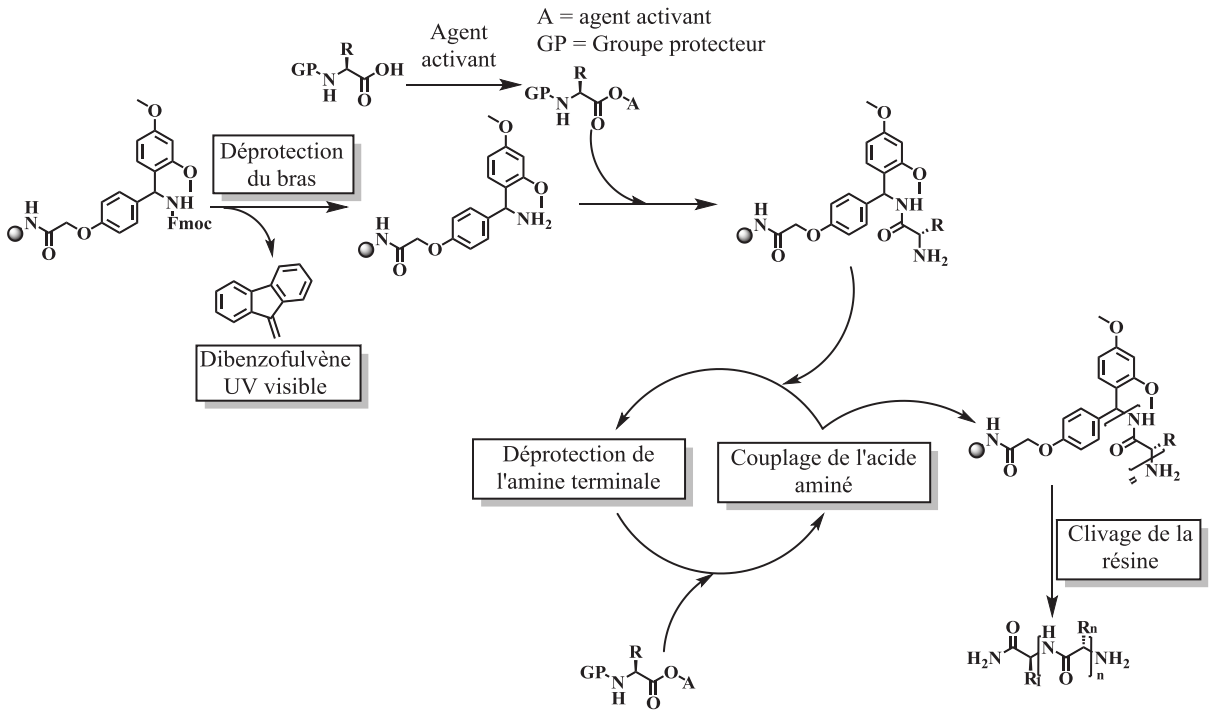


Schéma réactionnel 6 : Formation de liaison amide sur support solide. En l'occurrence, il s'agit de l'ancrage du premier acide aminé d'une chaîne de peptide amide (bras rink amide)

La synthèse sur support solide, comme son nom l'indique, s'effectue sur des billes de résine insolubles, la plupart du temps composées de polystyrène copolymérisé avec du divinylbenzène. Plus précisément, ce sont les billes de résine qui portent une « ancre » sur laquelle va pouvoir venir se

[519] A. Dryland, R. C. Sheppard, *Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions 1* **1986**, 125

greffer le premier acide aminé de la chaîne peptidique à construire. Par la suite les acides aminés sont couplés les uns à la suite des autres avec activation de la fonction acide carboxylique. La spécificité de la synthèse sur support provient de l'étape finale de clivage du peptide pour le décrocher des billes de résine. Celle-ci diffère en fonction de la résine utilisée et permet d'obtenir un peptide acide, amide, ester, alcool ou thioester en fonction de l'ancrage choisi et de la méthode de clivage. Il est alors important de choisir une résine dont les conditions de clivage sont compatibles avec la stratégie de synthèse envisagée. En effet, la plupart des acides aminés ayant des chaînes latérales protégées pour éviter les réactions parasites, le choix des protections et d'une stratégie donnée va être important au regard du type de résine choisie en particulier dans le cas où, par exemple, des réactions intramoléculaires sur support sont prévues.

II.D.2. Ancres et bras représentatifs greffés sur billes de résine

Il existe un grand nombre de différentes ancres liées aux billes de résine par des liens pour la synthèse sur support. Celles-ci permettent soit d'obtenir des peptides acides, amides, ester par exemple en position C-ter en fonction du groupement qui va se lier au premier acide aminé de la chaîne en construction mais aussi de la stabilité du carbocation formé lors du clivage (e.g : ancre HMP versus HMBA, voir Tableau 20 ci-dessous). La diversité des ancres disponibles commercialement sur support solide est extrêmement variée permettant ainsi d'obtenir n'importe quel type de fonction terminale ou d'ancrage (C-ter ou chaîne latérale).[520]

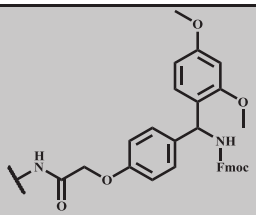
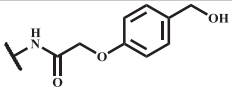
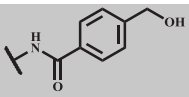
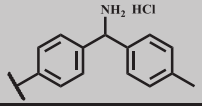
Ancres et liens sur résine	Structure	Conditions de clivage	Type de peptide obtenu	Stratégie(s) de synthèse possible(s)
Rink amide		TFA_{aq} 95%	Amide	Fmoc/^{t}Bu
HMP (pour « 4-Hydroxymethyl-phenoxyacetic acid »)		TFA_{aq} 95%	Acide	Fmoc/^{t}Bu
HMBA (pour « 4-Hydroxymethylbenzoic acid »)		ROH/DIPEA ; $NaBH_4$/EtOH	Ester/alcool	Fmoc/^{t}Bu ou Boc/Bzl
Merrifield		HF	Acide	Boc/Bzl
MBHA (pour « 4-Methyl-benzhydrylamine »)		HF	Amide	Boc/Bzl

Tableau 20 : Résumé d'ancres et de liens représentatifs greffés sur les billes de résine utilisées en synthèse peptidique sur support regroupées par compatibilité envers les deux stratégies de synthèse (Fmoc/^{t}Bu et Boc/Bzl), et par type de peptide produit après clivage

[520] P. Cherkupally, G. A. Acosta, S. Ramesh, B. G. De la Torre, T. Govender, H. G. Kruger, F. Albericio, *Amino Acids* **2014**, *46*, 1827–1838

III. Agents de couplages historiques et récentes avancées

Parmi l'ensemble des agents de couplage développés jusqu'à aujourd'hui, il en ressort deux classes tout particulièrement qui d'un côté activent l'acide carboxylique *in situ*, il s'agit des carbodiimides, ou qui jouent sur la préactivation d'acides aminés tels que les sels de phosphonium et d'uronium qui contiennent en eux-mêmes l'agent permettant la formation de l'ester activé (HOAt, HOBt pour « 1-Hydroxy-7-azabenzotriazole » et « 1-Hydroxybenzotriazole » respectivement).

En ce qui concerne les réactions pouvant nuire à une synthèse peptidique, la majorité ont pu être résolues par l'introduction des protections de chaînes latérales et d'amine terminale (discuté précédemment au paragraphe II, p.196). Il est malheureusement toujours possible de subir des réactions secondaires même pour des petites séquences, comme il en sera discuté pour les familles d'agent de couplage décrites ci-dessous. On peut citer par exemple des déprotections incomplètes ou encore le double couplage d'acides aminés. Ce dernier se produit souvent à cause de solutions d'acides aminés partiellement déprotégés provenant de traces d'amines libres présentes dans les pots de produits, mais également dans le cas de réactions longues. Bien entendu, ce type de déconvenues devient de plus en plus sérieux à mesure que la taille des molécules augmente.

III.A. Les agents historiques de couplage peptidique, les carbodiimides

III.A.1. Utilisation en synthèse : formation d'O-acylisourée

Historiquement, les carbodiimides ont été les premiers agents d'activation utilisés en synthèse peptidique ; ils sont aussi largement utilisés en synthèse organique et bien caractérisés.[521] C'est donc tout naturellement qu'ils ont été utilisés en synthèse peptidique sur une large période d'une vingtaine d'année au cours de laquelle ils ont dominé la synthèse peptidique. Le carbodiimide va réagir sur l'acide carboxylique qui sera activé en formant avec ce dernier une *O*-acyliosurée qui sera capable de réagir avec un nucléophile, en l'occurrence l'amine libre du peptide en croissance pour former la liaison amide correspondante. Dans le cas où deux équivalents d'acides carboxyliques sont mis en jeu par rapport à la quantité de carbodiimide, l'anhydride correspondant sera formé avant de subir une substitution nucléophile provenant de l'amine libre (voir Schéma réactionnel 7 p.204). Dans le cas où une hydroxylamine est également présente dans le milieu réactionnel (e.g : HOAt, HOBt) celle-ci va conduire à la formation d'un ester activé. Le principal avantage d'utiliser ce type d'additif est la réduction de la perte de configuration au niveau du résidu portant l'acide carboxylique. L'HOAt en particulier améliore la vitesse de formation de la liaison peptidique tout en diminuant ce risque de racémisation grâce à la formation d'un ester activé (voir Schéma réactionnel

[521] A. Williams, I. T. Ibrahim, *Chemical Reviews* **1981**, *81*, 589–636

7 ci-dessous) et à sa structure qui comporte un atome d'azote en position 7 du système aromatique[522,523]

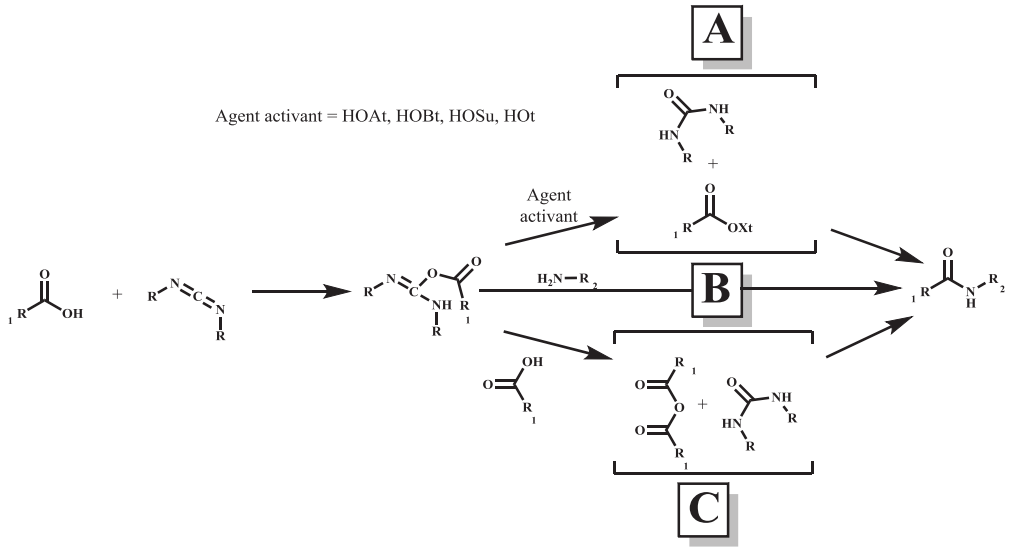
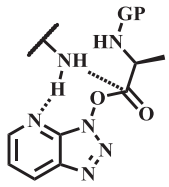


Schéma réactionnel 7 : Schéma réactionnel de formation de liaison peptidique *in situ* à l'aide de carbodiimides. Trois voies mécanistiques sont possibles parmi lesquelles la formation de l'ester activé après attaque de l'acide carboxylique de l'acide aminé à coupler sur le carbodiimide (A) ; la formation directe de la liaison peptidique par réaction de l'amine libre du peptide en croissance sur l'O-acylisourée (B) ; la formation d'un anhydride de l'acide aminé à coupler suivie de la formation de la liaison peptidique par attaque nucléophile de l'amine libre (C)

Cet atome est doublement utile grâce à deux effets (voir Figure 119 p.205): le premier est électroattracteur par induction qui a pour conséquence de stabiliser le groupe partant et donc d'augmenter la réactivité de l'intermédiaire réactionnel ; deuxièmement, cet atome d'azote supplémentaire en position 7 permet de former une liaison hydrogène entre ce dernier et l'amine libre du peptide en croissance pour augmenter la cinétique de réaction tout en réduisant l'épimérisation. Des études sur les positions 4, 5 et 6 pour l'azote n'ont montré aucune amélioration en comparaison avec l'HOBt. A noter que les meilleurs rendements ont été obtenus en préactivant l'acide carboxylique en présence de bases non nucléophiles telles que la triéthylamine et la *N*-méthylmorpholine combinées à des conditions standards. Concernant une application à plus grande échelle, de l'ordre de la dizaine de millimole ou plus, il devient nécessaire d'opérer cette préactivation à basse température (4 °C) à cause de l'exothermicité de cette étape pour éviter l'épimérisation qui peut avoir lieu même en présence de groupe protecteur de type uréthane.

[522] L. A. Carpino, A. El-Faham, C. A. Minor, F. Albericio, *Journal of the Chemical Society, Chemical Communications* **1994**, 201
[523] L. A. Carpino, A. El-Faham, *Tetrahedron* **1999**, *55*, 6813–6830



GP = Groupe protecteur

Figure 119 : Représentation de l'avantage de l'HOAt par rapport à l'HOBt grâce aux liaisons hydrogènes qui créent un état de transition rapproché et favorable à une formation de liaison amide plus rapide

III.A.2. Réaction parasite : le passage d'une O-acylisourée à une N-acylurée

Dans le cas des carbodiimides, le risque majeur est de former des dérivés *N*-acylés qui sont totalement inactifs vis-à-vis du couplage peptidique (voir Schéma réactionnel 8 ci-dessous). Un moyen efficace d'éviter de genre de déconvenue est d'ajouter une base non nucléophile pour accélérer l'attaque nucléophile de l'amine libre à coupler sur l'acide carboxylique activé par un carbodiimide.

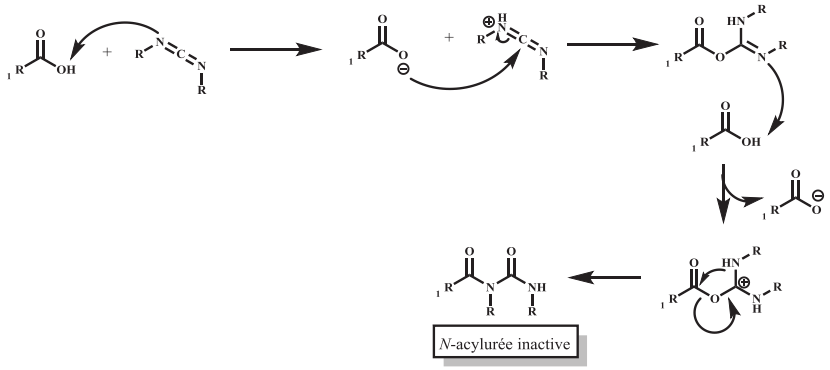


Schéma réactionnel 8 : Mécanisme de formation de *N*-acylurée inactive lors d'un couplage peptidique avec des carbodiimides en tant qu'agent activant

III.B. Une première alternative aux carbodiimides, les sels de phosphoniums et d'uroniums

III.B.1. Les sels de phosphoniums

Les sels de phosphoniums ont été introduits en synthèse peptidique pour la première fois en 1969 par Gawne et al. en tant qu'agents de couplage.[524] Ils ont par la suite été largement popularisés auprès de la communauté peptidique dans les années 1970.[525] Le plus connu d'entre eux, le BOP, a été très vite adopté pour la synthèse peptidique grâce à sa facilité d'utilisation (voir Schéma réactionnel 9 ci-dessous). En revanche, un inconvénient de taille est la production d e triamide hexaméthylphosphorique HMPT (pour « hexamethylphosphoric triamide »), classé en 1995 parmi les composés carcinogène (voir Schéma réactionnel 9 ci-dessous). La solution est venue du PyBOP comme substitut avec les mêmes avantages que le BOP sans ses inconvénients de sous-produits

[524] G. Gawne, G. W. Kenner, R. C. Sheppard, *Journal of the American Chemical Society* **1969**, *91*, 5669–5671
[525] J.-R. Dormoy, B. Castro, *Tetrahedron Letters* **1979**, *20*, 3321–3322

nocifs.[526] Caractéristiques que partage le PyAOP analogue du PyBOP avec un azote en position 7 de l'hétérocycle à la manière du HOAt associé à une meilleure réactivité.

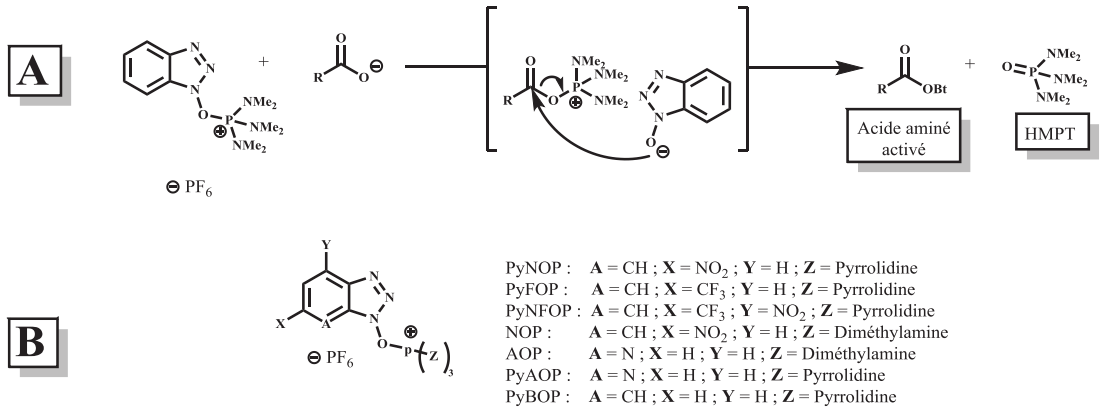


Schéma réactionnel 9 : Formation de liaison peptidique à l'aide de sels d'uroniums (A) et structures d'agents activant alternatifs (B)

III.B.2. Les sels d'uroniums

Les sels d'uronium ont été à l'origine décrits de manière similaire aux sels de phosphonium avant que des études par cristallographie aux rayons X ne démontrent une structure différente (voir Schéma réactionnel 10 ci-dessous).[527,528] Mécanistiquement parlant, le comportement des uroniums, appelés aussi imminiums en raison de leur structure cristallographique, est similaire à celui des phosphoniums en ce sens qu'ils subissent une attaque nucléophile de l'acide carboxylique du résidu à coupler, avec assistance d'une base aminée tertiaire (DIEA, NMM), avant l'activation de ce dernier par un fragment OXt (voir Schéma réactionnel 10 ci-dessous) et finalement l'attaque nucléophile de l'amine libre du peptide en croissance ;[529] l'action efficace du fragment HOAt permettant, ici aussi, de diminuer davantage le risque de racémisation par rapport à l'HOBt.[530]

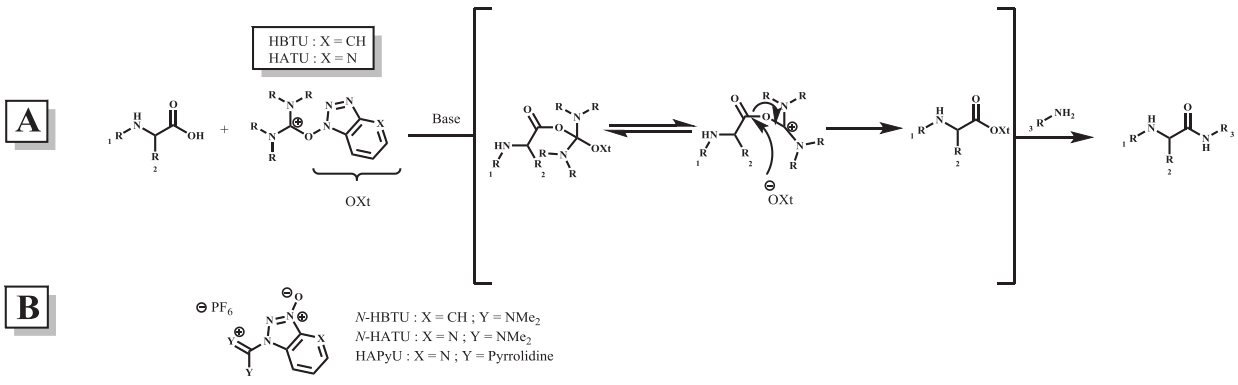


Schéma réactionnel 10 : Formation de liaison peptidique à l'aide de sels d'uroniums (A) et structures des uroniums après études cristallographiques (B). Celles-ci ont montré l'existence de sels d'imminiums

[526] J. Coste, D. Le-Nguyen, B. Castro, *Tetrahedron Letters* **1990**, *31*, 205–208
[527] I. Abdelmoty, F. Albericio, L. A. Carpino, B. M. Foxman, S. A. Kates, *Letters in Peptide Science* **1994**, *1*, 57–67
[528] L. A. Carpino, P. Henklein, B. M. Foxman, I. Abdelmoty, B. Costisella, V. Wray, T. Domke, A. El-Faham, C. Mügge, *J. Org. Chem.* **2001**, *66*, 5245–5247
[529] L. A. Carpino, D. Ionescu, A. El-Faham, *The Journal of Organic Chemistry* **1996**, *61*, 2460–2465
[530] L. A. Carpino, A. El-Faham, F. Albericio, *Tetrahedron Letters* **1994**, *35*, 2279–2282

III.B.3. La principale déconvenue des sels d'uroniums : la guanidination

Il existe un inconvénient majeur des agents activant de type uronium, à savoir leur capacité à guanidiner la chaîne peptidique en croissance, particulièrement lorsque l'acide aminé à coupler est très encombré (voir Schéma réactionnel 11 ci-dessous).[531] Ce qui, d'un point de vue pratique, entraîne un ajout d'agent activant en défaut par rapport à l'acide aminé introduit mais toujours en excès par rapport à la quantité théorique de peptide en croissance.

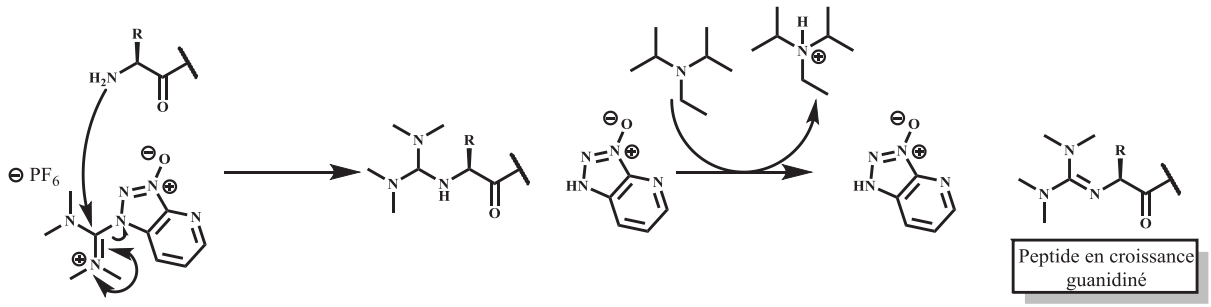


Schéma réactionnel 11 : Mécanisme réactionnel de guanidination d'un peptide en croissance lors de l'utilisation de sels d'uroniums comme l'HATU marquant l'arrêt de la construction peptidique

III.B.4. Une troisième génération de sels d'uronium, le COMU®

L'agent de couplage COMU (pour « (1-cyano-2-ethoxy-2-oxoethylidenaminooxy)dimethylamino-morpholino-carbenium hexafluorophosphate ») a été développé par A. El-Faham et F. Albericio en 2009.[532,533] Sa structure diffère des précédentes générations de sels d'uronium en ce sens que l'uronium est lié à l'oxygène de l'Oxyma et non à l'azote comme c'est le cas pour les agents HBTU et HATU (voir Figure 120 p.207), ce qui donne une réactivité augmentée.

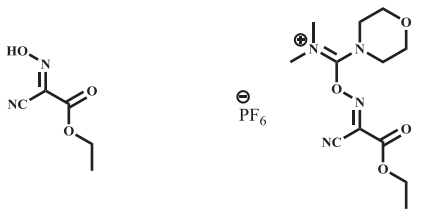


Figure 120 : Structure de l'oxyma (2-cyano-2-(hydroxyimino)acétate d'éthyle) à la base de l'agent de couplage COMU

Un point intéressant soulevé par les auteurs est la possibilité d'obtenir de très bons rendements de couplage peptidique avec un seul équivalent de base et même en utilisant une molécule moins basique que la classique DIEA (pour « Diisoprpylethylamine ») comme le TMP (pour « 2,4,6-trimethylpyridine).Le COMU est également très stable (93 % au bout de 48h contre 86 et 76 % pour HBTU et HATU respectivement) en solution dans le DMF. Ce qui est un point crucial pour

[531] M. del Fresno, A. El-Faham, L. A. Carpino, M. Royo, F. Albericio, *Organic Letters* **2000**, *2*, 3539–3542
[532] A. El-Faham, R. S. Funosas, R. Prohens, F. Albericio, *Chemistry - A European Journal* **2009**, *15*, 9404–9416
[533] A. El-Faham, F. Albericio, *Journal of Peptide Science* **2010**, *16*, 6–9

l'étape de couplage car plus l'activation de l'acide carboxylique sera longue et plus l'agent de couplage aura le temps de se dégrader devenant ainsi inactif vis-à-vis du couplage et faisant chuter les rendements. C'est aussi un agent qui présent des taux de racémisation similaires aux agents de couplages qui comportent des fragments de type HOBt avec des rendements supérieurs.

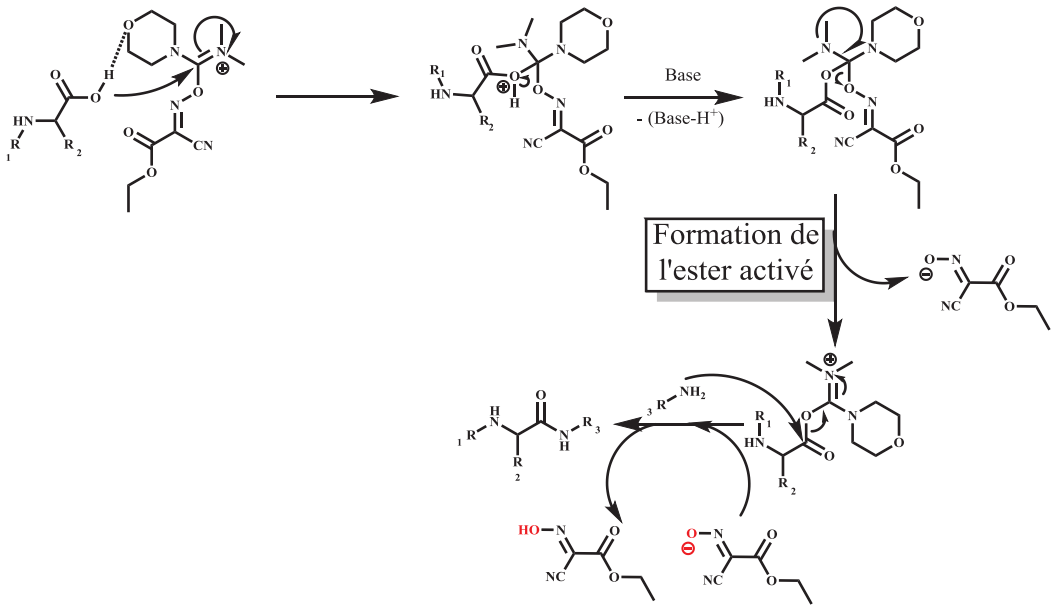


Schéma réactionnel 12 : Mécanisme de formation de liaison peptidique en utilisant le COMU et un équivalent de base. Il est aussi possible d'introduire un deuxième équivalent de base qui agira au niveau de la substitution nucléophile de l'amine libre du peptide en croissance pour la déprotoner

Le mécanisme réactionnel impliquant le COMU, proposé en Figure 120 ci-dessus fait intervenir l'oxygène de l'Oxyma en tant qu'accepteur de liaison hydrogène, décrit par les auteurs comme une explication de l'efficacité de ce groupement pour la formation d'une liaison peptidique.[534,535] L'autre avantage de l'oxyma est la présence de deux groupements attracteurs (nitrile et carboxyle) faisant de lui un excellent groupe partant pour la formation de l'ester activé, également capable d'assister la formation de la liaison peptidique en déprotonant l'amine libre du peptide en croissance.[536] Un autre très récent exemple de l'utilisation de l'oxyma en synthèse peptidique est la publication d'un ^{t}Boc-Oxyma en tant qu'agent de couplage par Thalluri et al. en 2013. L'avantage de ce dernier par rapport au COMU® est sa facilité d'utilisation ainsi que la possibilité de le régénérer très facilement à partir d'Oxyma formé en tant que produit secondaire et récupéré par extraction du milieu réactionnel.[537]

[534] A. El-Faham, F. Albericio, *Organic Letters* **2007**, *9*, 4475–4477
[535] A. El-Faham, F. Albericio, *The Journal of Organic Chemistry* **2008**, *73*, 2731–2737
[536] D. H. Ripin, D. A. Evans, "pKa's of Inorganic and Oxo-Acids," can be found under http://evans.rc.fas.harvard.edu/pdf/evans_pKa_table.pdf, **2005**
[537] K. Thalluri, K. C. Nadimpally, M. P. Chakravarty, A. Paul, B. Mandal, *Advanced Synthesis & Catalysis* **2013**, *355*, 448–462

III.C. Le phosphore neutre créateur de liaison peptidique, les agents organophosphorés

III.C.1. Application en synthèse peptidique

Le premier agent de couplage de ce type a été proposé par Yamada en 1972 avec le diphénylphosphorazidate (DPPA, voir Figure 121 ci-dessous).[538,539] Depuis, de nombreux autres composés organophosphorés ont été proposés en tant qu'agents de couplage pour la synthèse peptidique comme le composé introduit par Fan et al. en 1996.[540] Celui-ci portant un groupement similaire à l'HOAt, on retrouve son effet local qui assiste la molécule organophosphorée et augmente son efficacité en tant qu'agent activant. Ces molécules sont stockées sous forme cristallines et sont stables sur de longues périodes. Le mécanisme d'action de ces molécules est très similaire aux sels de phosphoniums avec une attaque nucléophile de l'acide carboxylique assisté par une base sur le phosphore suivie d'une élimination d'un groupe partant qui va par la suite réagir avec l'amine pour faciliter la formation de la liaison peptidique. L'intérêt du groupement HODhat (3-Hydroxy-4-oxo-3,4-dihydro-1,2,3-benzotriazine, voir Figure 121 ci-dessous) est la possibilité de suivre l'avancement de la réaction de couplage visuellement par changement de couleur du jaune clair au rouge orangé.

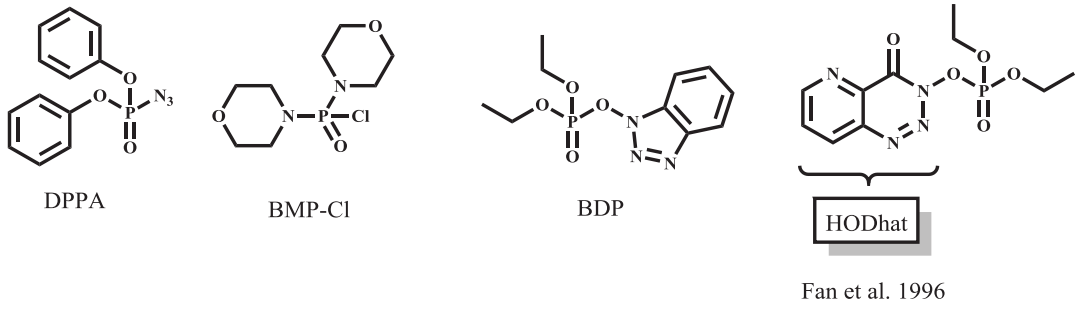


Figure 121 : Structures de composés organophosphorés utilisés en tant qu'agents de couplage pour la formation de liaisons peptidiques

III.C.2. Réaction parasite des agents de couplage organophosphorés : cas du HODhbt

Elle est connue depuis 1970, année pendant laquelle elle a été décrite la première fois par König et al en présence de carbodiimide.[541,542] Cette réaction parasite est également visible sur l'HODhat, ce dernier partageant une structure très similaire à l'HODhbt (3-Hydroxy-4-oxo-3,4-dihydro-1,2,3-benzotriazine). Le danger dans le cas des composés organophosphorés est similaire au problème d'excès de sel d'imminium en ce sens qu'un excès de composé organophosphoré va entraîner une réaction sur lui-même pour aboutir à la formation d'une triazine aromatique (voir Schéma réactionnel 13 ci-dessus).

[538] T. Shioiri, K. Ninomiya, S. Yamada, *Journal of the American Chemical Society* **1972**, *94*, 6203–6205
[539] T. Shioiri, S. Yamada, *CHEMICAL & PHARMACEUTICAL BULLETIN* **1974**, *22*, 849–854
[540] C.-X. Fan, X.-L. Hao, Y.-H. Ye, *Synthetic Communications* **1996**, *26*, 1455–1460
[541] W. König, R. Geiger, *Chemische Berichte* **1970**, *103*, 2024–2033
[542] L. A. Carpino, A. El-Faham, F. Albericio, *The Journal of Organic Chemistry* **1995**, *60*, 3561–3564

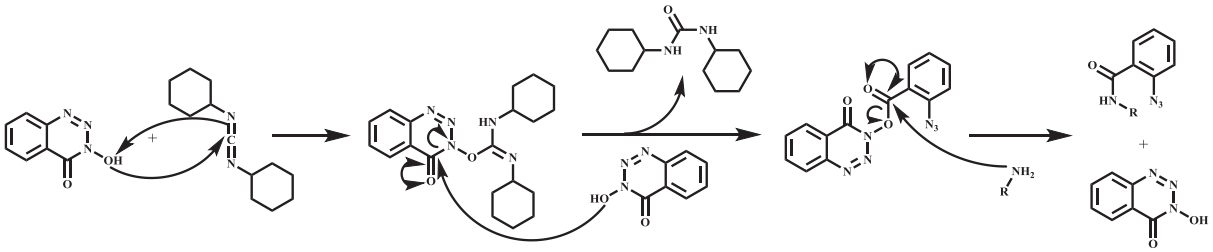


Schéma réactionnel 13 : Mécanisme d'arrêt de la croissance d'un peptide dû à l'action de l'HODhbt sur lui-même dans le cadre de l'utilisation conjointe de DCC. L'HODhbt réagit sur lui-même pour donner une triazine aromatique

III.D. L'avancée constituée par les agents de type fluoroformamidinium

III.D.1. Une forte réactivité en synthèse peptidique

Ces agents forment des acides aminés activés in situ sous forme de fluorure qui sont parmi les intermédiaires les plus réactifs.[543] La manière la plus efficace de former de tels intermédiaire est de recourir au 1,1,3,3-tetraméthylfluoroformamidinium hexafluorophosphate (TFFH, voir Schéma réactionnel 14 ci-dessous).[544,545] Néanmoins, ce type d'agent activant nécessite une attention toute particulière envers l'amine tertiaire utilisée et au temps de préactivation. En effet, lors de l'utilisation conjointe d'un fragment HOXt, l'ester activé est obtenu presque instantanément après la formation du fluorure d'acide tant ce dernier est réactif. C'est la raison pour laquelle la préactivation doit être la plus courte possible pour éviter que les fluorures d'acides ne restent sous cette forme trop longtemps, auquel cas le risque de réaction parasite augmente fortement à mesure que le temps passe.

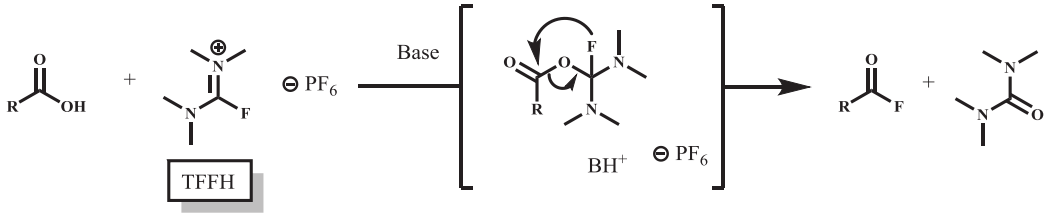


Schéma réactionnel 14 : Activation d'un acide aminé sous forme de fluorure à partir de fluoroformamidinium pour la formation d'une liaison peptidique

III.D.2. Les réactions secondaires des fluoroformamidinium : spécificité selon l'acide aminé

Bien que l'utilisation de fluoroformamidinium soit très intéressante pour la formation de liaison peptidique, la réactivité particulièrement forte des fluorures d'acides n'est pas sans conséquences sur certains acides aminés ; révélant ainsi quelques réactivités particulières. On peut citer par exemple le cas de la thréonine non protégée qui peut subir une réaction intramoléculaire du fluorure d'acide pour former un dérivé α-aminocrotonique en raison de la réactivité de ce dernier

[543] G. Prabhu, N. Narendra, B. Basavaprabhu, V. Panduranga, V. V. Sureshbabu, *RSC Adv.* **2015**, *5*, 48331–48362
[544] L. A. Carpino, M. Beyermann, H. Wenschuh, M. Bienert, *Accounts of Chemical Research* **1996**, *29*, 268–274
[545] L. A. Carpino, A. El-Faham, *Journal of the American Chemical Society* **1995**, *117*, 5401–5402

(voir Schéma réactionnel 15 ci-dessous).[546,547] Un autre exemple est le cas de l'arginine qui peut former un δ-lactame,[548] problématique non spécifique au fluorure d'acide mais particulière en raison de la réactivité de l'intermédiaire.

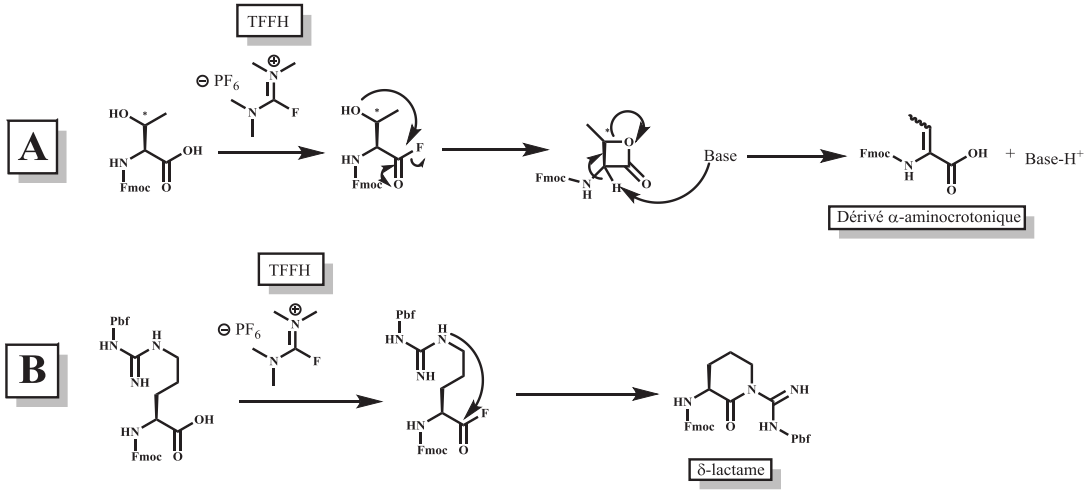


Schéma réactionnel 15 : Mécanisme proposé de formation d'un dérivé α-aminocrotonique (A) par activation au fluoroformamidinium de la thréonine et de δ-lactame dans le cas de l'arginine (B). La réactivité du fluorure d'acide facilite la formation du cycle à 4 chaînons avant l'ouverture du cycle par abstraction du proton porté par le C_α

III.E. Les triazines comme plate-forme de création de liaison peptidique

Parmi ces composés, un des plus récents pour la synthèse de peptides est le CDMT (2-chloro-4,6-dimethoxy-1,3,5-triazine). Son mécanisme d'action repose sur un principe similaire aux molécules organophosphorées avec une première étape d'addition/élimination qui sert à faciliter l'addition de l'acide carboxylique pour l'activer en remplaçant le chlore par la NMM pour former un meilleur groupe partant et former des esters « superactivés ». Par la suite, l'acide carboxylique activé peut subir l'attaque nucléophile de l'amine libre du peptide en cours d'assemblage là aussi assisté par une base, en l'occurrence la NMM qui joue un double rôle, minimisant ainsi le nombre d'éléments à ajouter au mélange pour la formation de la liaison peptidique (voir Schéma réactionnel 16 ci-dessous).

En revanche, cet agent de couplage est sensible à l'encombrement stérique des amines tertiaires utilisées qui peut fortement diminuer la réactivité de l'agent de couplage. A titre d'exemple, la TEA est totalement incapable de substituer le chlore de la triazine, alors que la NMM le peut.[549] De plus, le désavantage majeur de ce type d'agents activants comme la triazine trichlorée est bien sa réactivité excessive compromettant son utilisation pour la synthèse de composés multifonctionnels comme la synthèse de peptides. C'est la raison pour laquelle des variations autour

[546] J. V. Bazurto, K. R. Farley, D. M. Downs, *mBio* **2016**, *7*, e01840-15
[547] A. El-Faham, F. Albericio, *Journal of Peptide Science* **2010**, *16*, 6–9
[548] M. H. Cezari, L. Juliano, *Pept. Res.* **1996**, *9*, 88–91
[549] Z. J. Kamiński, P. Paneth, J. Rudziński, *The Journal of Organic Chemistry* **1998**, *63*, 4248–4255

de cette molécule ont continué d'être développés en un groupe de réactifs TBCR pour « Trazine-based Condensing reagents » comme agents efficaces d'acylation.[550]

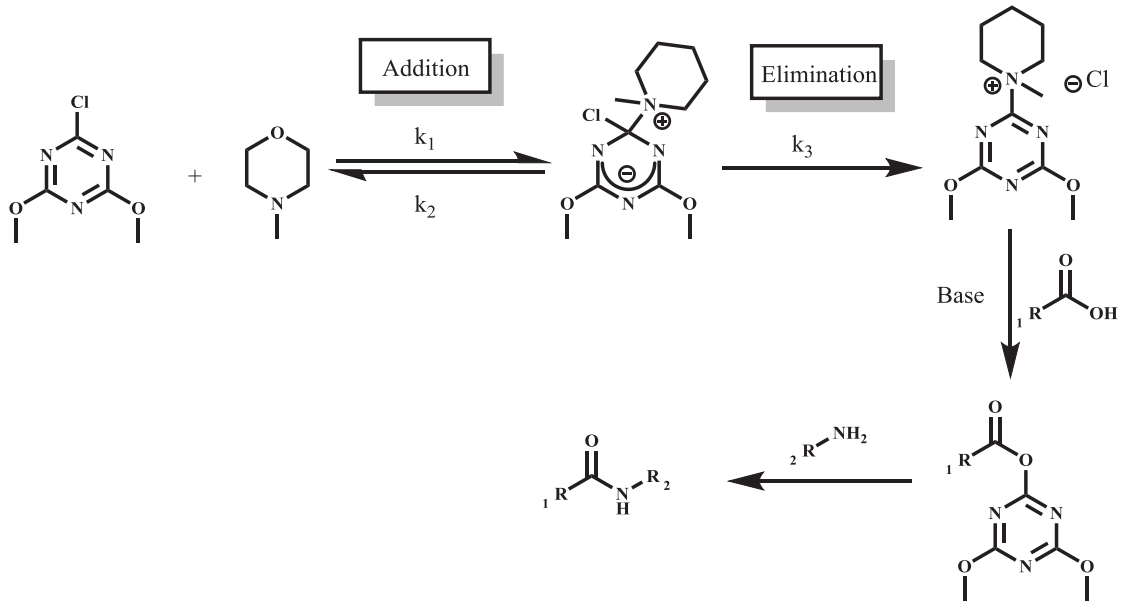


Schéma réactionnel 16 : Schéma réactionnel de formation d'une liaison peptidique grâce à un agent activant de type triazine en présence de NMM

IV. Présentation des peptides synthétisés dans le cadre de ces travaux de thèse

Parmi les stratégies de synthèses et les familles d'agents activant présentés, ce qui a été choisi pour la synthèse des peptides conçus pour ces travaux de thèse a été la synthèse sur support solide (manuelle et automatisée) en stratégie Fmoc/^{t}Bu en utilisant le couple HATU/DIEA comme système de formation de liaison peptidique. Les peptides (voir Tableau 21 ci-dessous) ont été obtenus à partir de structures naturelles comme l'AVP ou synthétiques comme le JMV4640-2NaL.

[550] Z. J. Kamiński, *Tetrahedron Letters* **1985**, *26*, 2901–2904

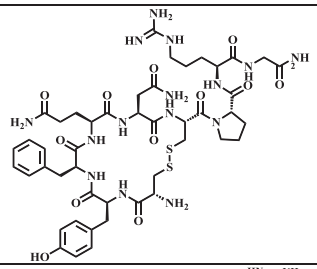
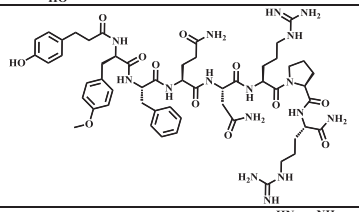
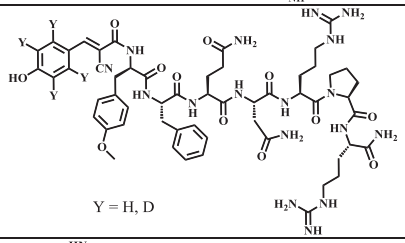
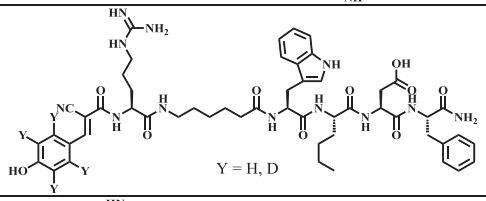
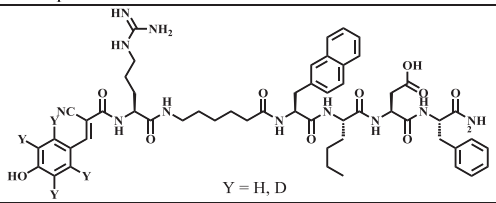
Nom	Structure	M_{mono} (g.mol^{-1}) / M_w (g.mol^{-1})	Référence
AVP –MR 4		1 083,4 / 1 084,2	Littérature[551]
Homo-HO-LVA – MR 5		1 140,6 / 1 1,41,2	Littérature[552]
MR 6-D_0 / MR 6-D_4		1 163,6 (1 167,6) / 1 164,3 (1 168,3)	Thèse de G. MIRALLES[553]
MR 9-D_0 /MR 9-D_4		1 018,5 (1 022,6) / 1 019,2 (1 023,2)	Thèse de G. MIRALLES
MR 10-D_0 / MR 10-D_4		1 029,5 (1 033,6) / 1 030,2 (1 034,2)	Thèse de G. MIRALLES

Tableau 21 : Présentation des différents peptides synthétisés pour ces travaux de recherche

Conclusion

La synthèse peptidique a énormément évolué depuis les premières expériences pionnières de Curtius et Fischer où le tâtonnement était de rigueur dans un champ de recherche complètement nouveau à cette époque. Les avancées successives en termes de protections dans le seul but de limiter les réactions parasites, de stratégies de synthèses (phase liquide ou solide) et d'agents de formation de liaison peptidique ont amené au contrôle quasi total de la réaction qui n'est autre que la création d'une liaison carbone/azote et qui a pourtant nécessité une centaine d'années de

[551] N. Cotte, M. N. Balestre, A. Aumelas, E. Mahé, S. Phalipou, D. Morin, M. Hibert, M. Manning, T. Durroux, C. Barberis, et al., *Eur. J. Biochem.* **2000**, *267*, 4253–4263

[552] M. Thibonnier, J. A. Preston, N. Dulin, P. L. Wilkins, L. N. Berti-Mattera, R. Mattera, *Endocrinology* **1997**, *138*, 4109–4122

[553] Guillaume MIRALLES, « Conception et synthèse de nouveaux outils chimiques pour l'étude des phosphoprotéines et la caractérisation de la liaison d'un ligand à son récepteur par spectrométrie de masse MALDI-TOF », Thèse de doctorat en ingénierie moléculaire, sous la direction de Gilles Subra, Montpellier, Université de Montpellier 1, 2012.

recherche pour la maîtriser. Grâce à cela, aujourd'hui il est tout à fait possible grâce à ce contrôle presque absolu d'obtenir très rapidement et de façon totalement automatisée des peptides de taille raisonnable. Ces derniers deviennent alors des supports d'études appliquées à un aspect structural,[554] à des matériaux biocompatibles[555] tout autant qu'à des aspects plus fondamentaux en spectrométrie de masse comme leur comportement face au processus de fragmentation.[556]

C'est avec la synthèse peptidique que se clôt la première partie de ce manuscrit consacrée au contexte bibliographique de cette thèse et destinée à mettre en perspective les travaux de recherche qui seront discutés dans la seconde partie du manuscrit ; celle-ci débutera par une présentation du projet de recherche suivie d'un chapitre dédié aux travaux portant sur le système APV/V_{1A} et les développements méthodologiques puis d'un chapitre dédié au second système d'étude et à l'application des méthodologies.

[554] Loïc Mathieu, « Synthèses et analyses structurales d'oligomères d'ACTs – une nouvelle famille de γ-aminoacides hétérocycliques pour la conception de foldamères », Thèse de doctorat en Ingénérie Moléculaire, sous la direction de Vincent Lisowski, Montpellier, Université de Montpellier, 2015.
[555] Cécile Echalier, « Biomimetic Peptide Hybrid Materials », Thèse de doctorat en Ingénierie Moléculaire, sous la direction de Gilles Subra, Montpellier, Université de Montpellier, 2016
[556] Laëtitia Mouls, « Spectrométrie de masse en tandem de peptides et de peptides modifiés : contribution à l'identification structurale par une approche "De Novo" », Thèse de doctorat en Chimie organique, minérale et industrielle, sous la direction de Jean-Louis Aubagnac, Montpellier, Université Montpellier 2, 2005.

Partie B – Travaux de thèse

Chapitre 1 : Présentation du projet de recherche

I. Le contexte dans lequel s'inscrivent ces travaux de thèse

La mesure d'interaction récepteur/ligand nécessite des capacités de détection et de quantification puissants en raison des niveaux connu de telles interactions ($Ki < 10^{-8}$ $mol.L^{-1}$). Le radiomarquage de ligands de référence avec de l'iode 125 est très répandu. En revanche, le recours à la radioactivité reste particulièrement délicat et inadaptée aux stratégies à haut débit qui démultiplient le nombre d'essais et de donc, en l'occurrence, des déchets contaminés. Dans ce contexte, le développement d'une méthode alternative de détection et de quantification de ligands contenus dans des milieux biologiques complexes à des niveaux de concentration infimes par spectrométrie de masse constitue une formidable opportunité. Dans ce domaine, la fluorescence s'est imposée comme l'une des méthodes les plus adéquates pour la détection et la quantification d'interactions moléculaires notamment grâce au FRET ou à l'HTRF.

Dans ce contexte, la mise au point d'une technologie novatrice permettant la détection et la quantification d'analytes à des concentrations infimes, de l'ordre de la nanomole par litre jusqu'à la picomole par litre, représenterait une avancée pour l'étude pharmacologique de nouveaux composés d'intérêt thérapeutique. La spectrométrie de masse est capable de fournir une voie particulièrement adaptée à cette problématique. En effet, cette technique est remarquable pour sa spécificité et sa sensibilité en détection pour, notamment, l'identification et la quantification de biomolécules dans des milieux complexes.

Afin d'accéder à la mesure d'interaction de faible constante de dissociation lors des expériences de liaison entre un récepteur et son ligand, les travaux seront dédiés à favoriser la production d'ions pour la (les) molécule(s) d'intérêt, autrement dit, d'exalter la capacité d'ionisation de la molécule cible par rapport aux autres constituants en mélange lors de l'analyse en spectrométrie de masse et de fait atteindre une spécificité et sensibilité de détection à un niveau de concentration égalant les performances de la radioactivité. Cela sera possible en associant au MALDI-MS la dilution isotopique largement décrite pour de la quantification par MRM basée sur une ionisation type ESI. Ces travaux seront donc dédiés au développement de la quantification de peptides en MALDI-SID-MS.

II. Le cheminement scientifique à l'origine de ce projet de recherche

Les travaux discutés dans cette thèse sont donc orientés vers la quantification par dilution isotopique en MALDI. Ils ont été rendus possible grâce à des résultats antérieurs obtenus dans le cadre de travaux orientés, dans un premier temps sur l'amélioration du signal produit par des

biomolécules modifiées,[557] et dans un second temps sur la détection par spectrométrie de masse MALDI-ToF de molécules modifiées et internalisées par des cellules.[558]

Ces résultats ont donné lieu à une première mesure d'interaction ligand/récepteur obtenue par le Dr G. MIRALLES lors de sa thèse,[559] au cours de laquelle il a observé la possibilité de mesurer une interaction entre un peptide, l'AVP, en tant que ligand envers son récepteur V_{1A}. La constante de dissociation Ki mesurée était alors de 0,65 nmol.L^{-1} et nécessite un développement méthodologique adéquat. Devant le potentiel analytique du MALDI-MS, le projet de mesure d'interaction ligand/récepteur s'est développé autour de trois axes : la synthèse organique et peptidique des marqueurs et ligands ; la spectrométrie de masse avec le développement d'une méthodologie unique en MALDI-SID-MS, très peu utilisée pour de la quantification ; la pharmacologie avec la mise au point de protocoles expérimentaux standardisés pour la mise en œuvre des équilibres d'association/dissociation.

Fort de ce potentiel, l'idée développée au cours de cette thèse a été de démontrer la capacité de la spectrométrie de masse MALDI à, non seulement détecter des peptides à des concentrations extrêmement faibles, mais également à les quantifier de façon fiable. Le sujet de ces études s'est porté sur des expériences de pharmacologie, à savoir des expériences de saturation à l'équilibre et de liaison compétitive. Le but est alors d'atteindre des grandeurs pharmacologiques traditionnellement obtenues par les mesures de radioactivité ou de fluorescence afin d'ouvrir une voie vers une alternative à ces deux techniques. Un avantage certain de l'utilisation du MALDI-ToF étant le fait d'utiliser des récepteurs natifs et non mutants, à l'inverse des mesures par HTRF à titre d'exemple, pour lesquelles les récepteurs doivent être mutés en les marquant avec une protéine SNAP qui permet par la suite au fluorochrome receveur d'être attaché au récepteur.

Les travaux de cette thèse s'articulent donc autour de 3 défis matérialisés par la mise au point et l'optimisation d'un procédé contrôlé, rigoureux et standardisé de préparation d'échantillon et d'analyse en spectrométrie de masse ; la mise au point et le contrôle des synthèses aboutissant aux molécules recherchées pour le marquage isotopique en synthèse ; l'adaptation de protocoles de mesure d'équilibres d'association/dissociation récepteur/ligand en pharmacologie aux contraintes de la spectrométrie de masse. En effet, le défi global a été de parvenir à faire correspondre les attentes et les contraintes de chaque domaine d'expertise dans l'unique but de réussir à combiner les

[557] D. Lascoux, D. Paramelle, G. Subra, M. Heymann, C. Geourjon, J. Martinez, E. Forest, *Angewandte Chemie International Edition* **2007**, *46*, 5594–5597

[558] D. Paramelle, G. Subra, L. L. Vezenkov, M. Maynadier, C. André, C. Enjalbal, M. Calmès, M. Garcia, J. Martinez, M. Amblard, *Angewandte Chemie International Edition* **2010**, *49*, 8240–8243

[559] Guillaume MIRALLES, « Conception et synthèse de nouveaux outils chimiques pour l'étude des phosphoprotéines et la caractérisation de la liaison d'un ligand à son récepteur par spectrométrie de masse MALDI-TOF », Thèse de doctorat en ingénierie moléculaire, sous la direction de Gilles Subra, Montpellier, Université de Montpellier 1, 2012

compétences et forces de chacun d'entre eux et fournir un procédé standardisé, robuste et aisément applicable et transposable à différents systèmes d'étude grâce à ce projet de recherche interdisciplinaire à l'interface entre la chimie, la biologie et les techniques d'analyses des biomolécules. La complémentarité des thématiques de recherche des équipes est avérée comme en témoignent les publications des chercheurs impliqués sur les dernières années. Le traitement de l'échantillon sera novateur et sera à mettre au point pour satisfaire les prérogatives de l'analyse par spectrométrie de masse.

Chapitre 2 : Le projet AVP/V_{1A}

I. Introduction

L'objectif affiché de cette étape de synthèse est bien d'obtenir en quantité suffisante les peptides nécessaires aux études sur le récepteur V_{1A}. Il a fallu par la suite créer une liaison peptidique entre le fragment HCCA et la chaîne peptidique. Une fois les molécules obtenues, l'étape de contrôle qualité des différents échantillons est essentielle car elle doit permettre de caractériser le plus finement possible les peptides et leur pureté par différentes méthodes analytiques complémentaires. Néanmoins avant de pouvoir les mettre en jeu dans le processus de développement analytique, il est crucial d'étudier leur comportement dans différentes conditions proches de celles qui feront loi lors des expérimentations en pharmacologie.

La stratégie de marquage covalent de peptides par le fragment HCCA développée au sein de l'IBMM a dans un premier temps montré son efficacité en termes de détection de peptides protéolytiques dans une matrice froide, l'HCCE méthyle qui a permis de détecter des molécules non détectées sans marquage HCCA ; dans un second temps ce marquage a été appliqué à la détection de « Cell Penetrating Peptides » (CPP) en mélange complexe. Le niveau supérieur est alors de démontrer la possibilité d'utiliser cette technologie de marquage pour la quantification de peptides par spectrométrie de masse MALDI

Dans ce chapitre nous allons donc nous intéresser à la partie synthèse peptidique et conception des différents ligands pour le premier modèle d'étude, le récepteur V_{1A}. Dans un premier temps, nous nous pencherons sur les différentes méthodes de synthèse utilisées et contrôles effectués avant de passer, dans un second temps, à l'ensemble du conséquent développement méthodologique en MALDI-SID-MS. Enfin, nous développerons dans un troisième temps l'application de cette méthodologie, au travers d'un protocole global et standardisé, à la mesure d'interactions récepteur/ligand en pharmacologie par des expériences de saturation et de compétition à l'équilibre.

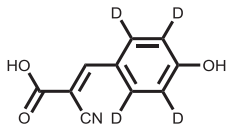
II. Les différents modes de synthèse

Ce paragraphe va nous permettre de détailler les différentes techniques de synthèse peptidique utilisées tout au long de cette thèse. Nous aborderons la synthèse manuelle en solution de fragments avant de passer à la synthèse automatisée sur support solide ainsi qu'une version accélérée de celle-ci et la synthèse d'acides aminés modifiés.

II.A. Synthèse manuelle de fragments

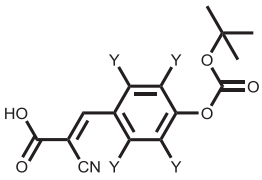
Plusieurs petites molécules organiques ont nécessité une synthèse manuelle avant de pouvoir les utiliser en synthèse peptidique pour, soit les intégrer directement à la séquence peptidique en croissance, soit en dernière étape sur la fonction amine terminale du dernier acide

aminé couplé. C'est le cas de la molécule HCCA sous sa forme hydrogénée ou deutérée. La forme deutérée de cette dernière nécessite deux étapes de synthèse compte-tenu du fait qu'elle n'est pas disponible commercialement alors que le p-hydroxybenzaldéhyde-D_4 l'est. Une réaction de Knoevenagel à 120 °C pendant 4 h en présence d'acétate d'ammonium dans le toluène permet d'obtenir la molécule correspondante (MR 1, voir ci-dessous) avec un rendement de 94 – 99 % après lavage et séchage du solide jaune obtenu sous vide.



MR 1 : Fragment HCCA-D_4, synthétisé avant la protection de la fonction alcool pour l'obtention de MR 6-D_4

Une fois la molécule d'HCCA-D_4 obtenue, il est nécessaire de protéger sa fonction phénol pour prévenir la réaction sur elle-même lors de l'étape de couplage en position N-terminale du peptide destiné à être marqué. Cette protection doit être compatible avec les conditions de couplage et éliminable dans les conditions de clivage du peptide pour libérer en une seule étape ce dernier et les différentes protections des chaînes latérales. C'est la raison pour laquelle le groupement ^{t}Boc a été choisi. La réaction pour obtenir la molécule MR 2 a été effectuée selon un protocole en phase organique (voir ci-dessous). Cela a permis d'obtenir celle-ci à hauteur de 95 % après lavage et séchage sous vide, sous forme deutérée et hydrogénée à partir d'HCCA commerciale de qualité de synthèse.

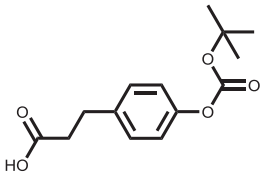


Y = H, D

MR 2 : Synthèse de ^{t}Boc-HCCA et ^{t}Boc-HCCA-d_4 pour l'obtention de MR 6-D_0 et MR 6-D_4

Une seconde petite molécule a nécessité une étape de protection pour un couplage en position N-terminale de peptide, il s'agit de l'acide 3-(4-^{t}Boc-hydroxyphényl)propanoïque. En effet, celle-ci permet d'obtenir le peptide modifié Homo-HO-LVA (voir MR 5 p.222) par couplage de la molécule protégée sur sa fonction phénol par un groupement protecteur ^{t}Boc. Dans un premier temps, le protocole utilisé pour concevoir MR 2 a été suivi en milieu homogène (voir Partie D – Partie expérimentale, paragraphe II.C.1.d p.413), sans succès. Un second mode opératoire a été utilisé par la suite en milieu biphasique avec une phase aqueuse constituée par une solution saturée d'hydrogénocarbonate de sodium ($NaHCO_3$) et une phase organique contenant le groupement protecteur sous forme d'anhydride et l'acide 3-(4-^{t}Boc-hydroxyphényl)propanoïque. Ce mode

opératoire (voir ci-dessous) a permis d'obtenir MR 3 à hauteur de 90 – 99 % après une nuit de réaction, une simple extraction, un lavage et un séchage sous vide.

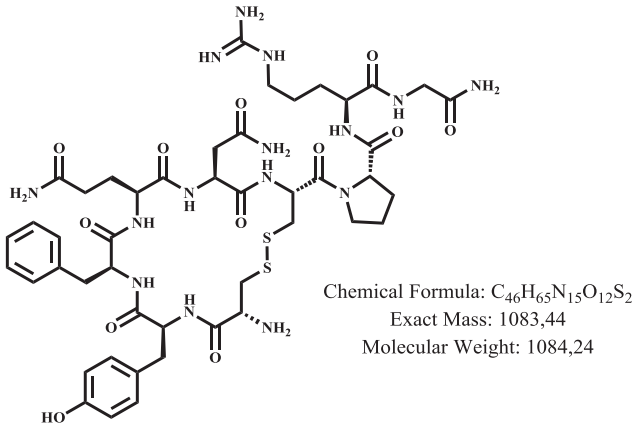


MR 3 : Synthèse du fragment acide 3-(4-^{t}Boc-hydroxyphényl)propanoïque pour l'obtention de MR 5

II.B. La synthèse sur support solide automatisée

Dans un premier temps, les peptides nécessaires à l'étude du récepteur V_{1A} ont été synthétisés sur le robot de synthèse de la plate-forme SynBio3, il s'agit de l'AVP (MR 4, voir ci-dessous), des peptides modifiés MR 5, MR 6-D_0 et MR 6-D_4. Les acides aminés ont, avant de démarrer les synthèses, été contrôlés par HPLC-UV pour confirmer leur qualité et s'assurer d'une synthèse dans de bonnes conditions.

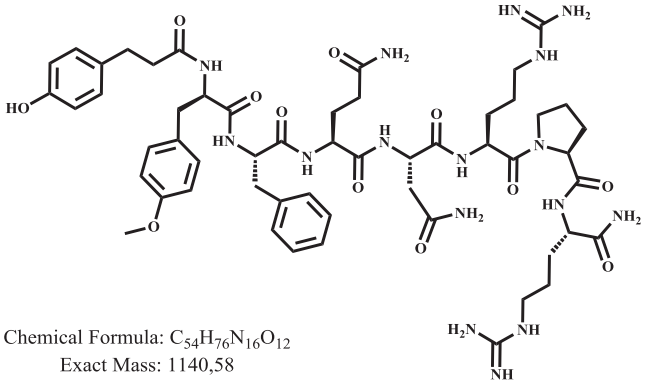
La synthèse de l'AVP a été conçue sur une échelle de 0,25 mmol, ce qui équivaut à environ 270 mg (pour un rendement théorique de 100 %) afin de préparer une quantité suffisante de peptide pour les tests de liaison compétitive sur cellules et membranes, sachant qu'un test consommera entre 0,2 et 0,3 mg de produit. La synthèse de cette molécule a été réalisée sur le robot de synthèse de la plate-forme SynBio3, le CEM Liberty®. Le peptide linéaire a été coupé de son support solide avant de subir une oxydation pour former le pont disulfure et obtenir l'AVP à hauteur de 60 mg pour un rendement de 22 %.



MR 4 : AVP

Par la suite l'Homo-HO-LVA (MR 5, voir ci-dessous) a été synthétisé suivant le même protocole et sur une échelle de 0,25 mmol. Cependant la résine a été fractionnée en trois aliquots pour pouvoir préparer à partir du même lot les peptides MR 6-D_0 et MR 6-D_4 qui ne diffèrent que par leur fragment en position N-terminale. L'étape de couplage de l'acide 3-(4-^{t}Boc-hydroxyphényl)propanoïque a été effectuée en conditions neutres via un carbodiimide (DIC pour

« DiIsopropylCarbodiimide ») et l'hydroxybenzotriazole (HOBt) pendant 4 h à température ambiante directement sur la résine. Après les étapes de couplage vient le clivage acide du peptide de sa résine qui est effectuée grâce à une solution communément utilisée de TFA/TIS/H_2O à 92,5/5/2,5 (v/v/v) du fait de la présence de cystéines, particulièrement réactives envers les carbocations des groupements protecteurs éliminés. S'en suit la purification et la lyophilisation du peptide attendu qui a été obtenu à hauteur de 28 mg pour un rendement de 29 % rapporté à la fraction de résine utilisée.



MR 5 : Homo-HO-LVA

En ce qui concerne les peptides modifiés MR 6-D_0 et MR 6-D_4, ceux-ci ont été obtenus en couplage sur les deux tiers de résine restante des fragments HCCA et HCCA-d_4 dans les mêmes conditions de neutralité. En effet, celles-ci sont primordiales en particulier pour l'HCCA qui, à cause de sa très forte conjugaison avec deux groupements électroattracteurs par effet mésomère (fonction nitrile et carbonyle), le cycle aromatique se trouve fortement appauvri en électrons. Ceci a pour conséquence immédiate une augmentation de l'acidité du proton phénolique et un affaiblissement de la liaison « H-O ». La sensibilité de ce proton face à une base n'en est que plus importante (voir **1**, Figure 122 ci-dessous). Par la suite, l'effet électroattracteur des deux groupements précédents ainsi que la stabilisation du carbocation par mésomérie facilitent l'attaque nucléophile d'une molécule d'eau (voir **2**, Figure 122 ci-dessous). Par la suite, et après différentes déprotonations, le p-hydroxybenzaldéhyde est formé et la molécule d'HCCA, point clé pour les analyses par MALDI-MS ultérieures, détruite (voir **3**, Figure 122 ci-dessous).

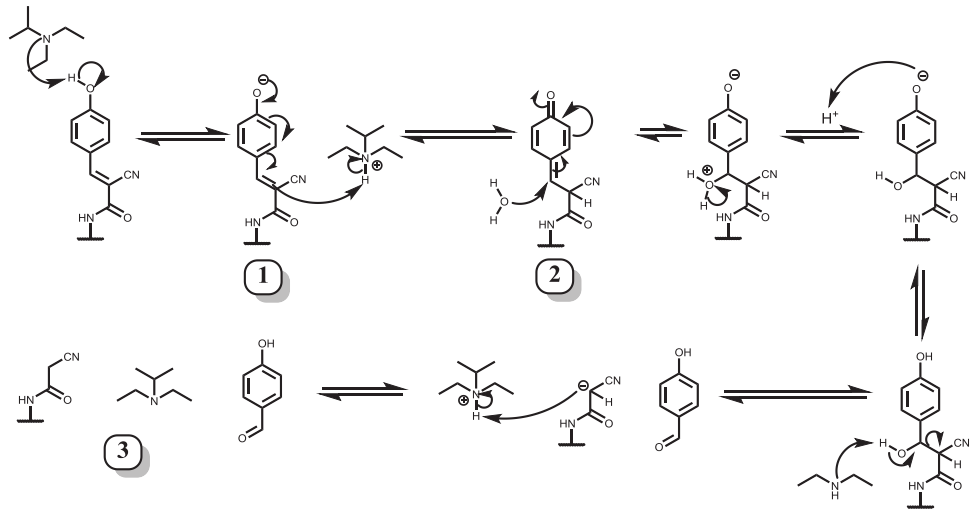
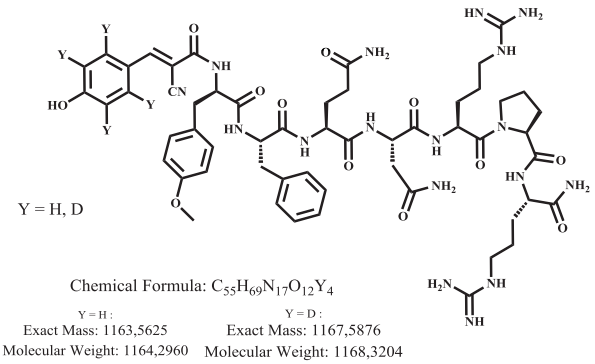


Figure 122 : Proposition de mécanisme réactionnel pour la réaction de rétro Knoevenagel en milieu basique appliqué à l'HCCA couplé sur la position N-terminale d'un peptide

La réaction de couplage a donc été effectuée grâce à la combinaison DIC/HOBt pendant 4 h à température ambiante pour arriver, après coupure de la résine par une solution 95/2,5/2,5 de TFA/TIS/H_2O, purification et lyophilisation, à des rendements pour les peptides MR 6-D_0 et MR 6-D_4 (voir ci-dessous) respectivement de 34 % (55 mg) et 27 % (43 mg).

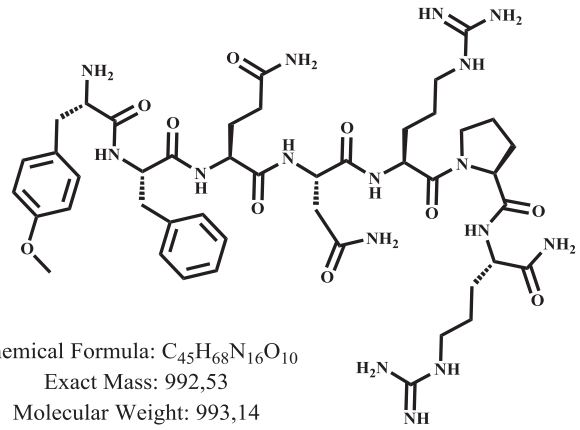


MR 6 : Ligand traceur pour le récepteur modèle V_{1A} sous forme hydrogénée (légère, D_0) et deutérée (lourde, D_4)

II.C. La synthèse ultra rapide : Fast SPPS

La synthèse de type « fast SPPS » a été mise au point au DAPP en tirant parti de la loi d'action des masses[560] qui permet d'accélérer une réaction en mettant certains réactifs en excès et en appliquant une forte agitation. La rapidité de synthèse est rendue possible également grâce à un système d'agitation et de filtration combinées qui permet d'éliminer le milieu réactionnel et de laver les billes de résine portant le peptide en croissance. Cette méthode a permis d'obtenir, à partir d'un gramme de résine chargée à 0,37 mmol.g^{-1}, le peptide MR 7 composé de 7 résidus en moins de 3 h contrairement au robot de synthèse qui a requis une nuit de synthèse.

[560] P. Érdi, J. Tóth, *Mathematical Models of Chemical Reactions: Theory and Applications of Deterministic and Stochastic Models*, Manchester Univ. Pr, Manchester, **1989**



Chemical Formula: $C_{45}H_{68}N_{16}O_{10}$
Exact Mass: 992,53
Molecular Weight: 993,14

MR 7 : Séquence peptidique modèle

III. Contrôle qualité des peptides

Dans ce paragraphe nous allons nous focaliser sur les techniques analytiques, à savoir LC-UV, LC-MS, MALDI-MS et MALDI-MS/MS, EC-UV et analyse élémentaire, mises en œuvre pour le contrôle qualité des peptides synthétisés.

III.A. L'analyse des peptides d'intérêt par MALDI-MS

III.A.1. MR 4 – AVP

Le peptide est déposé sur une plaque MALDI avec une matrice HCCA en utilisant la méthode de dépôt de la goutte séchée. Une goutte de 0,5 µL de solution de matrice est déposée sur une position proche de celle de l'étalon. Puis une goutte de 0,5 µL de l'échantillon de molécule MR 4 est déposée directement sur la goutte précédente sans séchage intermédiaire. L'analyse se fait sur un spectromètre MALDI/ToF-ToF (Ultraflex III, Bruker©).

Masse monoisotopique (Th)	Abondance Relative (%)	Type d'ion	Assignation	Séquence
1027,4	15	$[M+H]^+$	Délétion de Gly	H-cyclo(Cys-Tyr-Phe-Gln-Asn-Cys)-Pro-Arg-NH_2
1084,4	100	$[M+H]^+$	MR 4	H-cyclo(Cys-Tyr-Phe-Gln-Asn-Cys)-Pro-Arg-Gly-NH_2
1106,4	16	Adduit sodium	MR 4	H-cyclo(Cys-Tyr-Phe-Gln-Asn-Cys)-Pro-Arg-Gly-NH_2

Tableau 22 : Massifs isotopiques du spectre du peptide MR 4 avec les assignations correspondantes

Le spectre de masse en MALDI de l'AVP montre une très bonne pureté avec une seule impureté distincte du bruit de fond, ce qui assure d'une excellente qualité du lot synthétisé (voir Partie D – ***Partie expérimentale***, paragraphe II.D.1 p.427).

III.A.2. MR 5 – Homo-HO-LVA

Le peptide est déposé suivant le même protocole que celui appliqué à MR 4. Voici le tableau illustrant les principaux massifs isotopiques observés sur le spectre de masse de l'homo-HO-LVA (voir Partie D – ***Partie expérimentale***, paragraphe II.D.2 p.428).

Masse monoisotopique (Th)	Abondance Relative (%)	Type d'ion	Assignation	Séquence
1013,5	6	$[M+H]^+$	Délétion de Gln	4-hydroxyphénylpropanoyl-tyr(Me)-Phe-Asn-Arg-Pro-Arg-NH_2
1105,3	12		Non assignée	Non assignée
1126,8	18		Non assignée	Non assignée
1141,6	100	$[M+H]^+$	MR 5	4-hydroxyphénylpropanoyl - tyr(Me)-Phe-Gln-Asn-Arg-Pro-Arg-NH_2
1153,2	11		Non assignée	Non assignée
1163,6	50	$[M+Na]^+$	MR 5	4-hydroxyphénylpropanoyl - tyr(Me)-Phe-Gln-Asn-Arg-Pro-Arg-NH_2
1175,2	4	$[M+Na]^+$	Non assignée	Non assignée
1238,7	28	$[M+H]^+$	Double incorporation de Pro	4-hydroxyphénylpropanoyl - tyr(Me)-Phe-Gln-Asn-Arg-**Pro-Pro**-Arg-NH_2
1260,6	9	$[M+Na]^+$	Double incorporation de Pro	4-hydroxyphénylpropanoyl - tyr(Me)-Phe-Gln-Asn-Arg-**Pro-Pro**-Arg-NH_2
1269,7	31	$[M+H]^+$	Double incorporation de Gln	4-hydroxyphénylpropanoyl - tyr(Me)-Phe-**Gln-Gln**-Asn-Arg-Pro-Arg-NH_2
1291,6	11	$[M+Na]^+$	Double incorporation de Gln	4-hydroxyphénylpropanoyl - tyr(Me)-Phe-**Gln-Gln**-Asn-Arg-Pro-Arg-NH_2

Tableau 23 : Massifs isotopiques du spectre du peptide MR 5 avec les assignations correspondantes

On retrouve plusieurs impuretés de nature inconnue ainsi que des doubles incorporations de glutamine et de proline. Cependant ces impuretés sont également marquées par le motif HCCA et peuvent s'ioniser particulièrement aisément. D'après les nombreuses analyses effectuées à des concentrations décroissantes, ces impuretés deviennent très rapidement indétectables.

III.A.3. Les peptides MR 6 – D_0 et MR 6 – D_4

Les deux peptides sont préparés de la même manière que les deux précédents et contrôlés pour obtenir le tableau suivant basé sur les spectres obtenus (voir Partie D – ***Partie expérimentale***, paragraphe II.D.3 et II.D.4 p.428 et p.429).

Masse monoisotopique (Th)	Abondance Relative (%)	Type d'ion	Assignation	Séquence
1128,3	6		Non assignée	Non assignée
1149,8	11		Non assignée	Non assignée
1164,6	100	$[M+H]^+$	MR 6 – D_0	HCC-tyr(Me)-Phe-Gln-Asn-Arg-Pro-Arg-NH_2
1186,6	26	$[M+Na]^+$	MR 6 – D_0	HCC-tyr(Me)-Phe-Gln-Asn-Arg-Pro-Arg-NH_2
1202,5	4	$[M+K]^+$	MR 6 – D_0	HCC-tyr(Me)-Phe-Gln-Asn-Arg-Pro-Arg-NH_2
1261,6	11	$[M+H]^+$	Double incorporation de Pro	HCC-tyr(Me)-Phe-Gln-Asn-Arg-**Pro-Pro**-Arg-NH_2

Tableau 24 : Massifs isotopiques observés sur le spectre de masse du peptide MR 6 – D_0 avec leur assignation

On note dans ce spectre la présence remarquable d'une impureté provenant d'une double incorporation de proline. De plus deux impuretés (m/z = 1128,3 et 1149,8) se retrouvent dans tous les spectres de masse obtenus. Les peptides proviennent d'une synthèse utilisant des solutions d'acides aminés fraîchement préparées et contrôlées par HPLC et LC/MS. Il en ressort pour l'asparagine et la glutamine qu'il n'y a pas d'amine déprotégée visible avec la sensibilité des appareils d'analyse UV. Ce qui n'exclue pas la présence de traces qui expliqueraient les impuretés observées. Seconde hypothèse, la déprotection d'une faible quantité de l'acide aminé pendant le couplage qui induirait une double incorporation.

Voici dans un second temps le tableau illustrant les massifs isotopiques observés sur le spectre de masse du peptide MR 6 – D_4 qui ne diffère de celui de MR 6 – D_0 que de +4 u.m.a du fait des atomes de deutérium substituant les atomes d'hydrogène.

Massif isotopique (m/z)	Abondance Relative (%)	Type d'ion	Assignation	Séquence
1132,3	4		Non assignée	Non assignée
1153,8	8		Non assignée	Non assignée
1168,6	100	$[M+H]^+$	MR 6 – D_4	HCC-d_4-tyr(Me)-Phe-Gln-Asn-Arg-Pro-Arg-NH_2
1190,6	34	$[M+Na]^+$	MR 6 – D_4	HCC-d_4-tyr(Me)-Phe-Gln-Asn-Arg-Pro-Arg-NH_2
1206,6	3	$[M+K]^+$	MR 6 – D_4	HCC-d_4-tyr(Me)-Phe-Gln-Asn-Arg-Pro-Arg-NH_2
1265,7	7	$[M+H]^+$	Double incorporation de Pro	HCC-d_4-tyr(Me)-Phe-Gln-Asn-Arg-**Pro-Pro**-Arg-NH_2

Tableau 25 : Massifs isotopiques observés sur le spectre de masse du peptide MR 6 – D_4 avec leur assignation

III.A.4. Analyse des massifs isotopiques suspects à m/z = 1128,3 et 1149,8 dans le spectre de masse du MR 6 – D_0

D'après les masses observées en mode MS, plusieurs possibilités existent quant aux différences de masse par rapport à l'ion moléculaire du MR 6 –D_0 ($[M+H]^+$ = 1164,6). Celles-ci ont été déterminées grâce à une table répertoriant différentes variations de masses dans des peptides en fonction d'échanges d'acides aminés possibles.[561]

Concernant le massif à 1 149,8 Th : une différence de -14,8 Th qui peut provenir de plusieurs substitutions possibles :

- Valine à la place d'une asparagine : substitution possible.
- Leucine / Isoleucine à la place de Glutamine / Lysine : substitution possible.
- Asparagine à la place d'un acide glutamique : substitution impossible compte-tenu de la séquence.

Après avoir étudié la fragmentation de ce massif et les séries d'ions b et y, il apparaît que la solution retenue est une substitution de l'asparagine par de la valine.

Concernant le massif à 1 128,3 Th, en examinant sa fragmentation, un ion parent est visible à 1 121,8 Th et, bien qu'ayant utilisé une méthode de MS/MS adaptée aux faibles masses, la première reste indétectable. Le pic à 1 128,3 Th, quant à lui, pourrait tout à fait correspondre à un ion fragment métastable qui se fragmenterait par ISD (In Source Decay) ou PSD (Post Source Decay). Plusieurs éléments viennent renforcer cette hypothèse à commencer par la première décimale de la masse mesurée avec précision. Deuxième point, la fenêtre de masse sélectionnée pour afficher l'ion parent attendu ne permettant pas du tout de le détecter, cela irait dans le sens d'une fragmentation d'ion métastable par ISD ou PSD.

Après avoir étudié la fragmentation du massif à 1 121,8 Th, il apparaît que cette masse correspond à celle du peptide MR 6 – D_0 avec un résidu Asn substituant le second résidu Arg : HCC-tyr(Me)-Phe-Gln-Asn-**Asn**-Pro-Arg-NH_2. Cette assignation peut s'expliquer par une délétion de la seconde arginine lors du couplage de cet acide aminé sur le résidu proline associé à un double couplage de l'asparagine qui peut provenir, quant à lui, de temps de couplage longs en conditions basiques à l'origine d'une déprotection partielle des acides aminés en cours de couplage. Une autre hypothèse envisagée est une dégradation chimique d'une arginine de la séquence peptidique en ornithine qui produirait un ion de masse nominale 1 122 Th, à opposer en revanche à une différence de masse de 1 Th par rapport à la masse nominale observée de 1 221 Th.

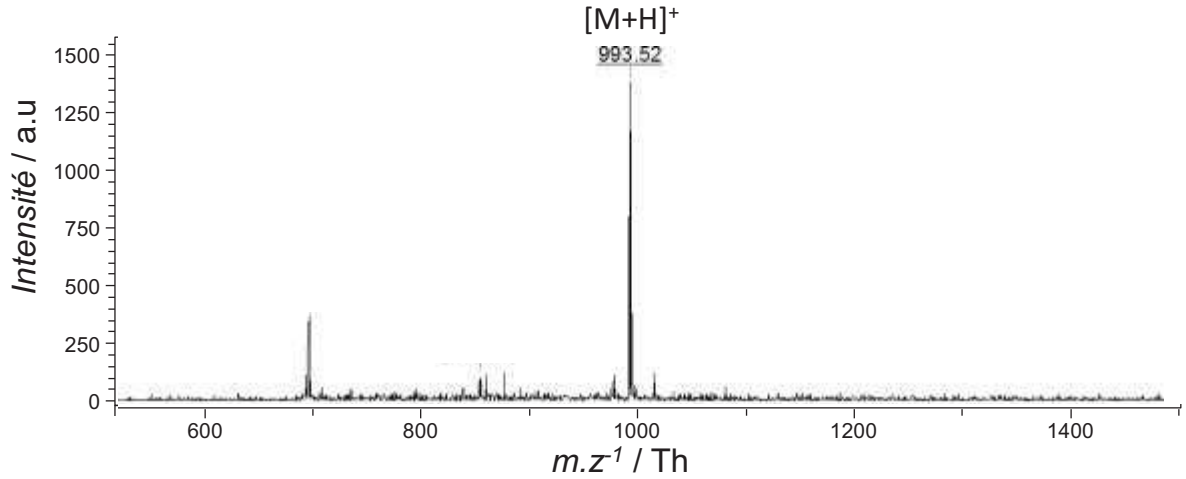
Ces deux impuretés ont donc pu être identifiées, sachant qu'à forte dilution (10^{-7}, 10^{-8}, 10^{-9} et 10^{-10} mol/L) dans la matrice HCCA et HCCE (les deux matrices utilisées) celles-ci ne sont plus visibles

[561] « Mutation Mass Shifts », can be found under http://prospector.ucsf.edu/prospector/html/misc/mutation.htm, **1995-2016**.

dans les spectres de masse. Il est important de noter que ces impuretés ont pu être détectées car leur séquence comporte également le marquage par HCCA qui va avoir pour conséquence d'abaisser grandement leur limite de détection alors que celles-ci sont à l'état de traces et absolument pas détectées par HPLC-UV.

III.A.5. Le peptide modèle – MR 7

Ce dernier a été analysé en conditions standard d'analyse de peptides par MALDI-ToF-MS avec l'HCCA en tant que matrice. Le spectre obtenu (voir Spectre 1 ci-dessous) montre un résultat tout à fait satisfaisant et intéressant compte-tenu du fait que ce peptide a été synthétisé sur une nouvelle résine.



Spectre 1 : Spectre de masse obtenu par MALDI-ToF du peptide MR 7 selon la méthode d'analyse standard de peptides

III.B. Contrôle par HPLC-UV

Les peptides analysés en HPLC-UV et présentés en Partie D – ***Partie expérimentale***, paragraphe II.F p.430 l'ont été dans le tampon d'incubation qui a servi aux expériences de pharmacologie dans le but d'écarter l'hypothèse d'un équilibre dynamique entre deux stéréoisomères *E* et *Z* dans le cas des peptides portant un fragment HCCA. Une discussion à propos de cette problématique est proposée au paragraphe IV.C p.244.

III.B.1. MR 4 – AVP

Le chromatogramme suivant a été obtenu après purification des deux peptides, leur caractérisation a été faite avec un gradient de 10 minutes de 20 à 70 % d'acétonitrile à 0,1 % de TFA et montre un échantillon d'une pureté satisfaisante compte-tenu du tampon contenant de la BSA (bosse à 5,4 min) dans lequel celui-ci a été analysé (voir Partie D – ***Partie expérimentale***, paragraphe II.F.1 p.430) avec un temps de rétention de 0,9 minutes.

III.B.2. MR 5 – Homo-HO-LVA

Le chromatogramme suivant a été obtenu après purification des deux peptides, leur caractérisation a été faite avec un gradient de 10 minutes de 20 à 70 % d'acétonitrile à 0,1 % de TFA et montre un échantillon d'une pureté correcte en tenant compte du tampon contenant de la BSA (bosse à 5,4 min) dans lequel il a été contrôlé (voir Partie D – ***Partie expérimentale***, paragraphe II.F.2 p.431) avec un temps de rétention de 2,2 minutes.

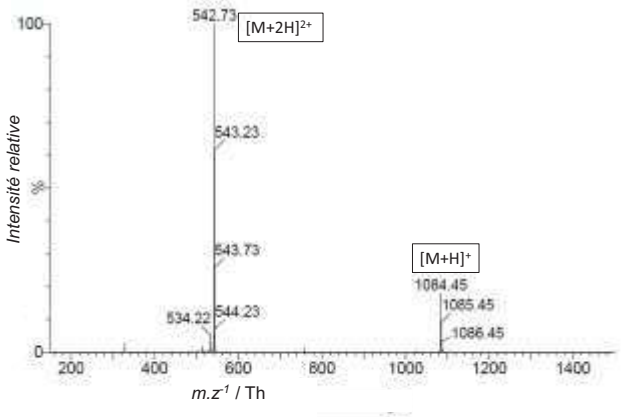
III.B.3. Peptides MR 6 – D_0 et MR 6 – D_4

Les chromatogrammes ont été obtenus après purification des deux peptides, leur caractérisation a été faite avec un gradient de 10 minutes de 20 à 70 % d'acétonitrile à 0,1 % de TFA et montrent des échantillons d'une pureté très correcte compte-tenu du tampon contenant de la BSA (bosse à 5,4 min) dans lequel ils ont été analysés (voir Partie D – ***Partie expérimentale***, paragraphe II.F.3 p.431) avec un temps de rétention commun de 2,5 (MR 6 – D_0) et 2,9 minutes (MR 6 – D_4).

III.C. Evaluation des états d'ionisation des peptides par ESI-MS

III.C.1. MR 4 – AVP

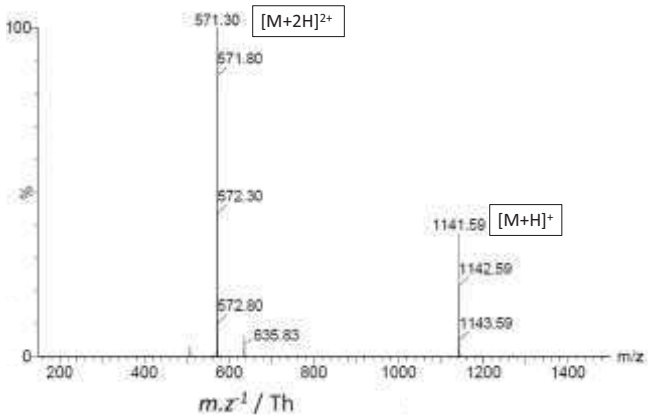
Ici aussi, le peptide montre une ionisation sous deux états de charge : mono- et dichargé seulement (voir Spectre 2 ci-dessous).



Spectre 2 : Spectre de masse obtenu sur système ZQ 2 000 pour l'AVP, avec les ions mono- et dichargés

III.C.2. MR 5 – Homo-HO-LVA

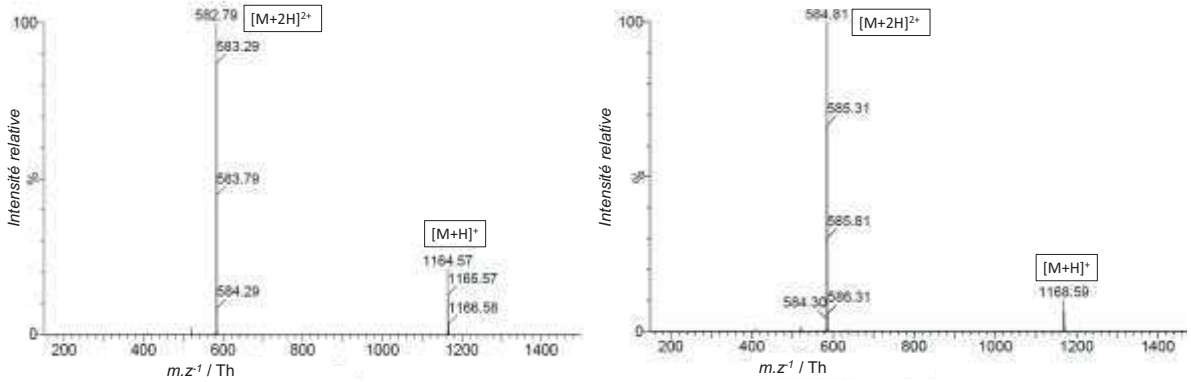
De manière similaire, ce peptide, après analyse par HPLC-MS montre une ionisation sous deux états de charge : mono- et dichargé seulement (voir Spectre 3 ci-dessous).



Spectre 3 : Spectre de masse obtenu sur système ZQ 2 000 pour le peptide Homo-HO-LVA avec les ions mono- et dichargés

III.C.3. Peptides MR 6–D_0 et MR 6–D_4

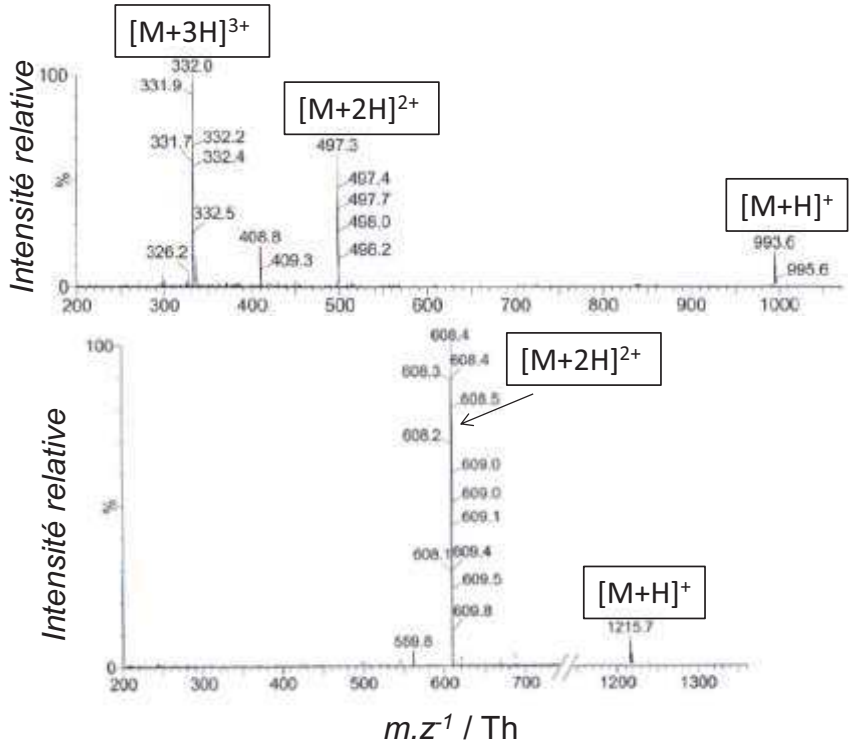
Ces deux peptides, après analyse par HPLC-MS montrent une ionisation sous deux états de charge : mono- et dichargé uniquement (voir Spectre 4 ci-dessous).



Spectre 4 : Spectres de masse obtenu sur système ZQ 2 000 pour les peptides MR 6–D_0 (à gauche) et MR 6–D_4 (à droite), avec les ions mono- et dichargés

III.C.4. Peptide modèle MR 7

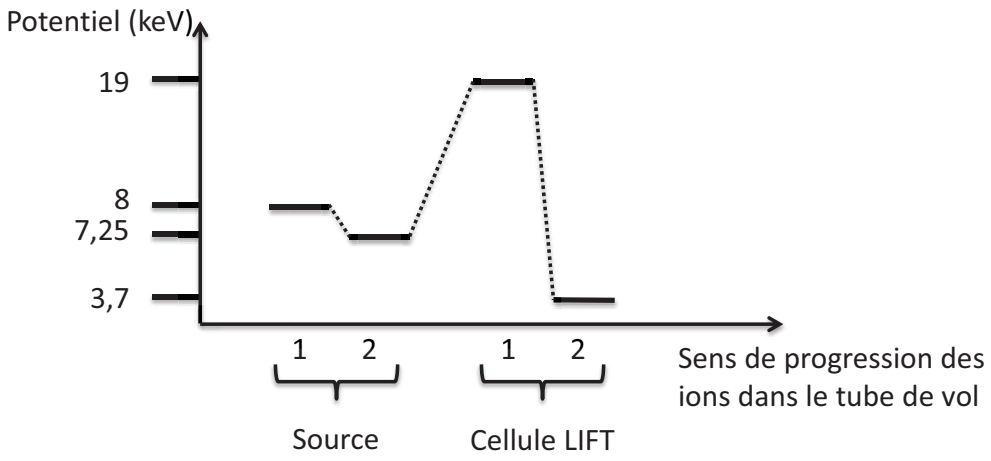
Ce peptide, après analyse par HPLC-MS montre une ionisation sous différents états de charge : mono-, di- et trichargé. Ce qui est conforme à une observation usuelle de biomolécules multichargés par ionisation de type ESI (voir Spectre 5 ci-dessous).



Spectre 5 : Spectres de masse due peptide MR 7 avec les ions mono-, di- et trichargés obtenus sur système ZQ 2 000. En haut, le spectre du peptide déprotégé en N-terminal ; en bas, le spectre du peptide ancré sur résine avec sa protection de type Fmoc en N-terminal après micro clivage au TFA

III.D. Contrôle par MS² : caractérisation des séquences peptidiques

Dans l'optique de caractériser les séquences des peptides synthétisés, la spectrométrie de masse en tandem est un outil particulièrement adapté puisqu'il permet de remonter à l'enchaînement des résidus d'une séquence peptidique grâce aux ions de séquence (ions b et y). La MS² sur le MALDI-ToF/ToF est effectuée grâce à une cellule LIFT qui va augmenter l'énergie interne des ions (voir Figure 123 p.232) pour leur donner un caractère métastable et leur permettre de se fragmenter et ainsi obtenir les informations de séquence.[562]

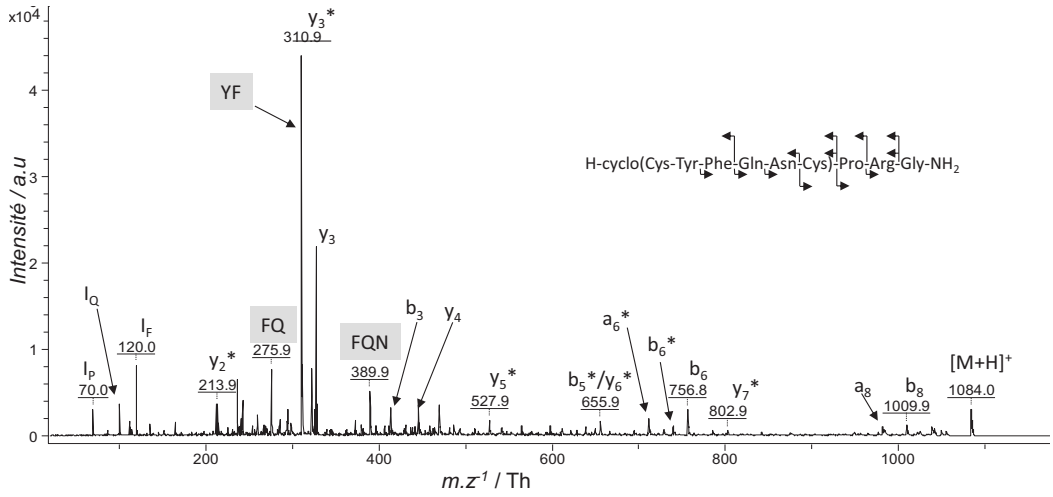


[562] D. Suckau, A. Resemann, M. Schuerenberg, P. Hufnagel, J. Franzen, A. Holle, *Analytical and Bioanalytical Chemistry* **2003**, *376*, 952–965

Figure 123 : Représentation des niveaux d'énergie délivrée aux ions lors de leur production et de leur accélération dans le MALDI-ToF via les potentiels appliqués

III.D.1. MR 4 – AVP

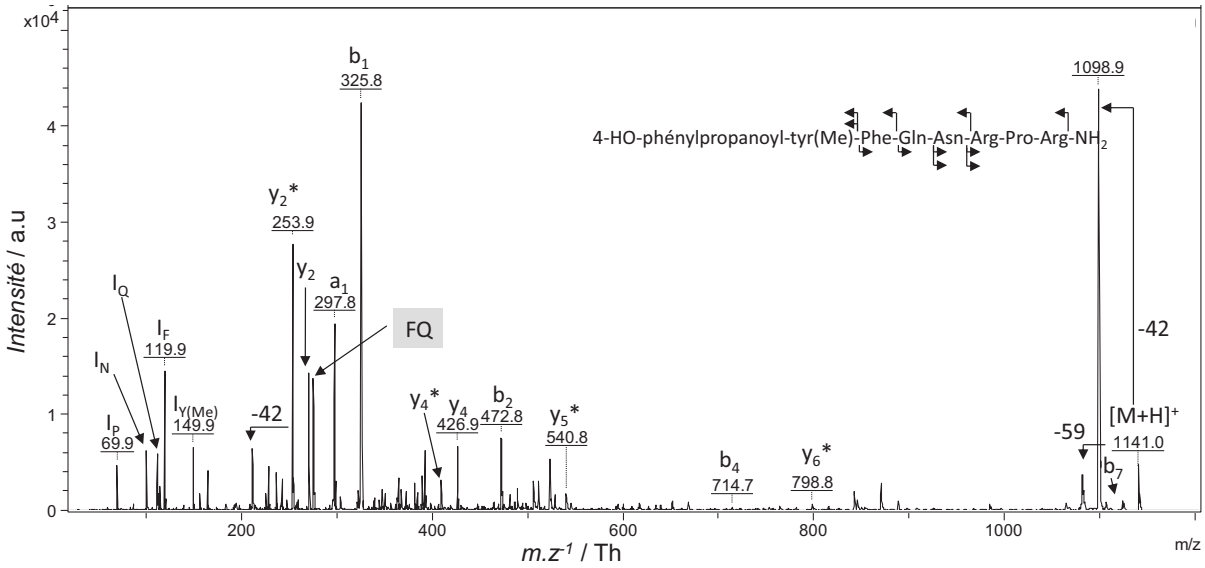
La fragmentation de ce peptide a donné plusieurs ions de séquence qui, après recoupement des séries b et y, permettent de couvrir l'ensemble de sa séquence lorsque l'on prend en compte le fragment b_6 sous forme cyclique qui confirme la composition du cycle sans toutefois assurer de l'enchaînement entre la cystéine et la tyrosine. Les immoniums des résidus glutamine, proline et phénylalanine (voir Spectre 6 ci-dessous) sont également présents.



Spectre 6 : Spectres de fragmentation de l'AVP obtenu sur MALDI-ToF/ToF Ultraflex III, Bruker Daltonics©

III.D.2. MR 5 – Homo-HO-LVA

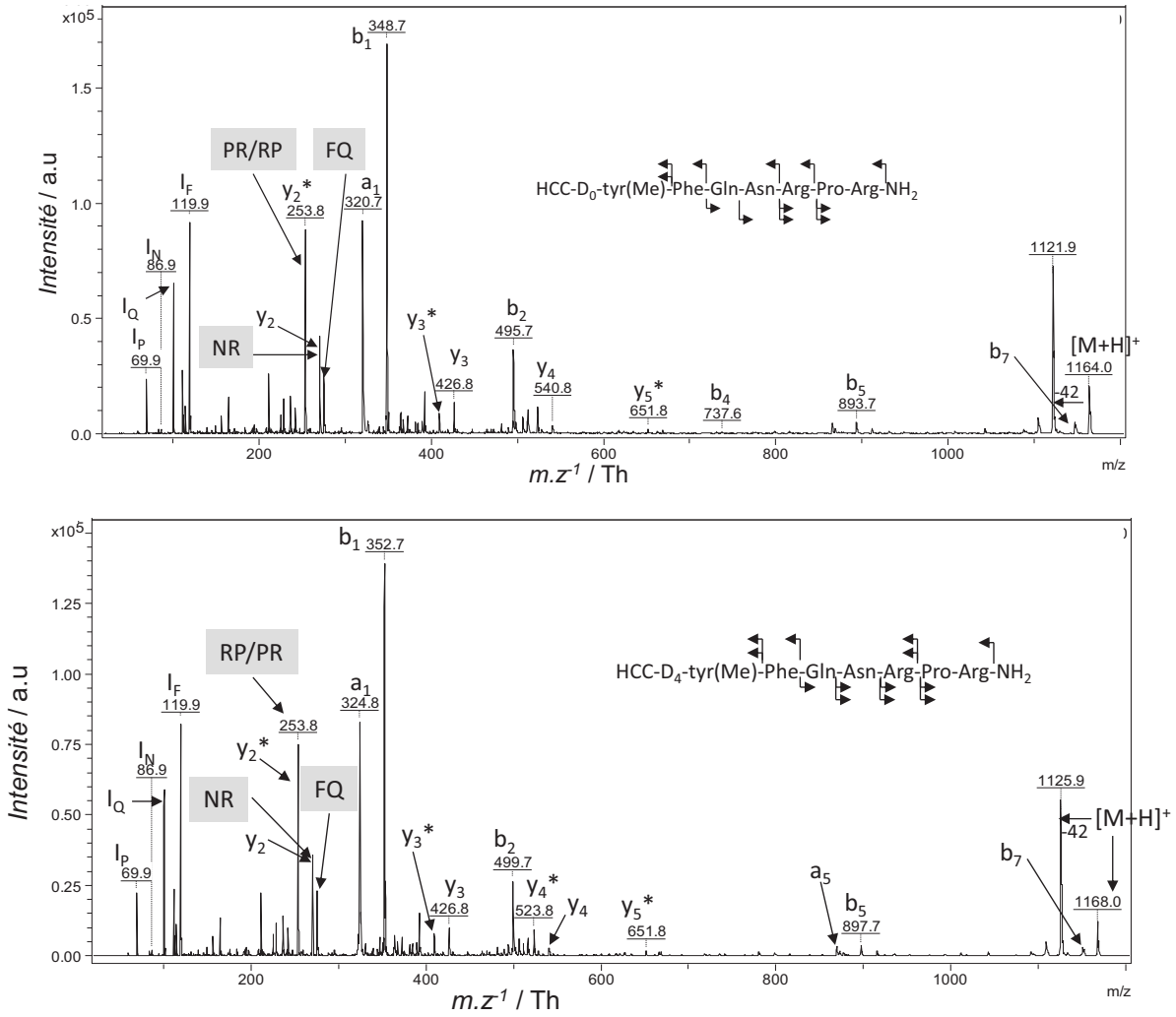
La fragmentation de ce peptide a donné un nombre suffisant d'ions de séquence pour, après recoupement des séries d'ions b et y, de couvrir l'ensemble de sa séquence. Les immoniums des résidus glutamine, proline, asparagine, phénylalanine et l'immonium de la tyrosine méthylée présents dans la séquence ainsi qu'un ion interne (indiqué en gris dans le Spectre 7 ci-dessous) sont également visibles sur ce spectre.



Spectre 7 : Spectres de fragmentation de l'Homo-HO-LVA obtenu sur MALDI-ToF/ToF Ultraflex III, Bruker Daltonics©

III.D.3. Peptides MR 6–D_0 et MR 6–D_4

La fragmentation de ces deux peptides a donné un bon nombre d'ions de séquence qui permettent par recoupement de couvrir l'ensemble de la séquence des peptides MR 6–D_0 et MR 6–D_4. Les immoniums des résidus proline, glutamine, asparagine et phénylalanine présents dans la séquence ainsi que des ions internes (indiqués en gris dans le Spectre 8 ci-dessous) sont aussi identifiables sur ce spectre.



Spectre 8 : Spectres de fragmentation des peptides MR 6–D_0 (en haut) et MR 6–D_4 (en bas) obtenus sur MALDI-ToF/ToF Ultraflex III, Bruker Daltonics©

On remarque que l'immonium de la tyrosine méthylée n'est quasiment pas visible (S/N = 7 à 150 Th) contrairement au Spectre 7 p.233. Une hypothèse pour rationaliser son absence pourrait être la présence d'une très forte conjugaison dans le cas des peptides MR 6–D_0 et MR 6–D_4. En effet, si nous dressons les différents réarrangements et pertes de neutres possibles à partir de l'ion b1 pour chacun des trois peptides, nous remarquons que la formation de l'immonium dans le cas des peptides MR 6–D_0 et MR 6–D_4 serait très fortement défavorisée du fait de la conjugaison exocyclique produite par le groupement nitrile conjugué à l'oléfine et au cycle enrichi en électrons par la fonction phénol.

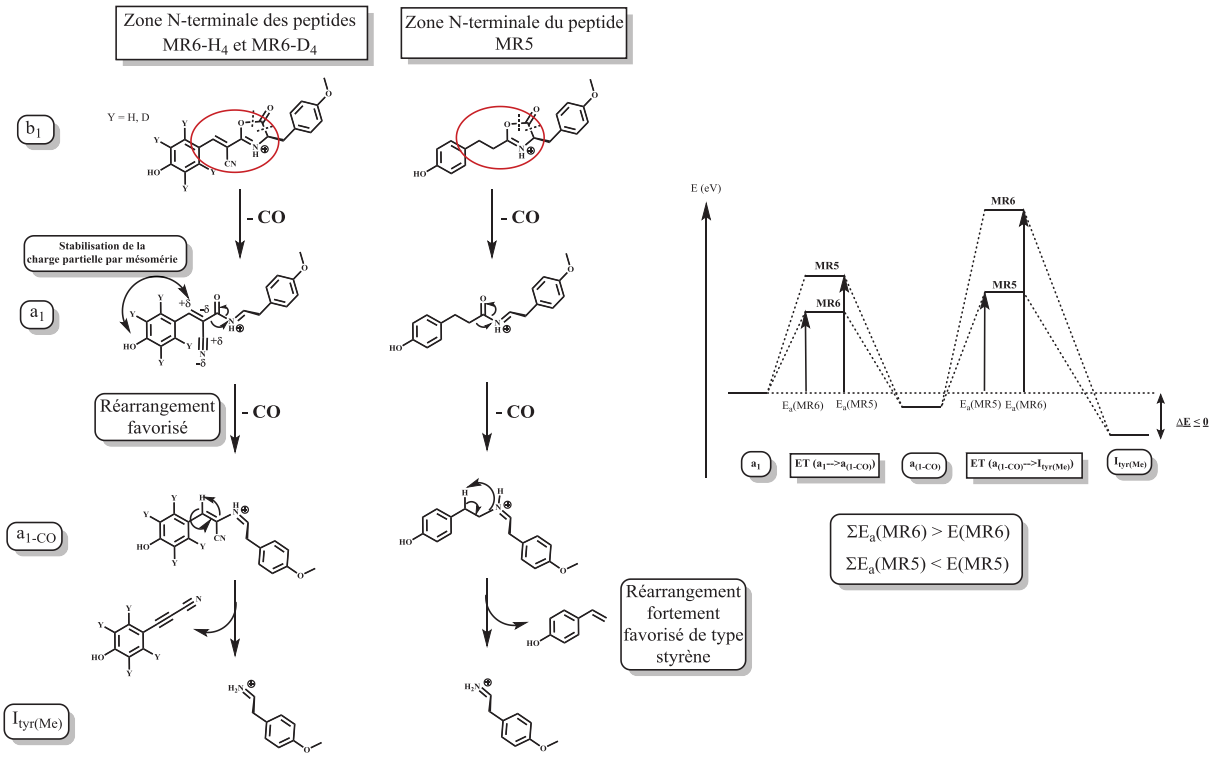
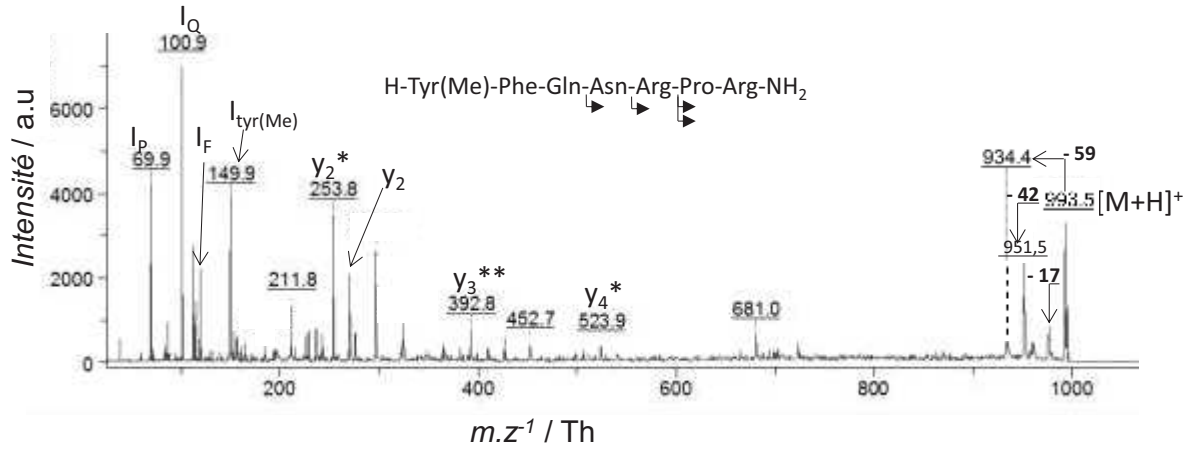


Figure 124 : Proposition de mécanisme de réarrangement où la formation de l'immonium pour le peptide MR 5 serait possible grâce à une somme des énergies d'activations nécessaire à l'atteinte de ce dernier inférieure à l'énergie de l'ion a_1 contrairement au cas du peptide MR 6

III.D.4. Peptide modèle MR 7

La fragmentation de ce peptide a donné très peu d'ions de séquence. Toutefois, l'observation du fragment y_3** dont une structure est proposée en Figure 125 (voir p.236) combiné au fragment y_2 confirment le début de séquence côté C-terminal grâce à la double perte d'ammoniac tandis que les ions immoniums confirment la présence des résidus glutamine, phénylalanine et tyrosine méthylée (voir Spectre 9 ci-dessous).



Spectre 9 : Spectre de fragmentation du peptide MR 7 obtenu sur MALDI-ToF/ToF Ultraflex III, Bruker Daltonics©

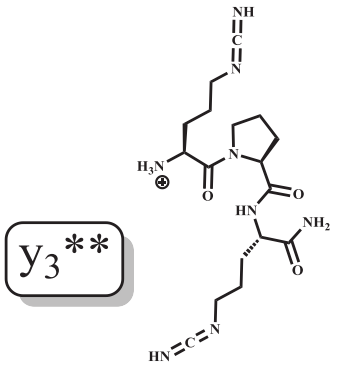
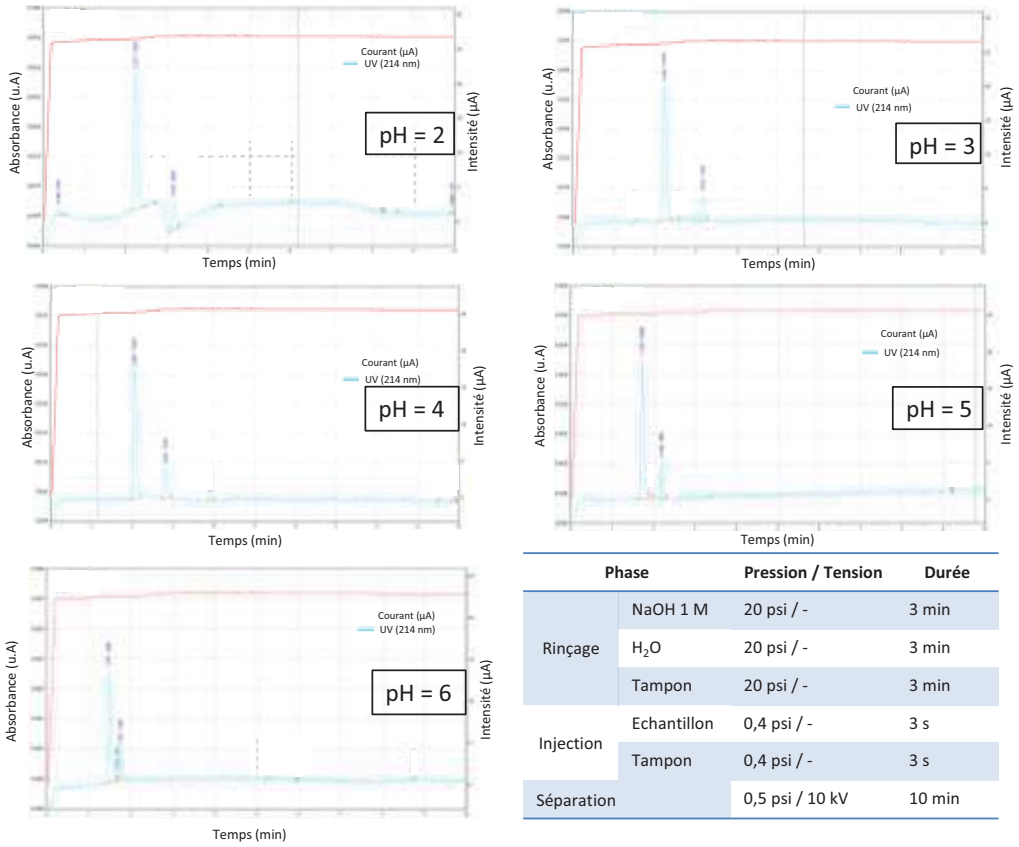


Figure 125 : Proposition de structure pour le fragment y_3 du peptide modèle MR 7**

III.E. Etude du peptide MR 6 par électrophorèse capillaire

L'étude par électrophorèse capillaire a commencé par la recherche des conditions optimales de migration du peptide MR 6 – D_0 sur l'appareil décrit en Partie D – ***Partie expérimentale***, paragraphe I.I.3 p.407. Dans un premier temps, une faible pression (0,5 psi) a été appliquée à l'entrée du capillaire au cours de l'analyse (en plus de la tension appliquée) afin de visualiser le peptide sur un temps d'analyse de 10 minutes (voir Electrophérogramme 1 p.237). De même plusieurs électrolytes ont été utilisés afin de comparer leur impact sur le temps de migration du peptide. Notons que plus le pH augmente et plus le composé peptidique traverse le capillaire rapidement. La diminution des temps d'analyses est due à l'augmentation progressive du flux électroosmotique qui vient s'ajouter à la mobilité propre du peptide analysé et lui confère une mobilité apparente plus grande que celle due à sa propre mobilité. Cependant la séparation entre le pic principal visible sur l'électrophérogramme et un pic mineur perd de sa qualité lorsque le pH augmente, probablement du fait de la diminution de l'ionisation des composés en se rapprochant du pI (point isoélectrique) et donc de cette convergence des mobilités.

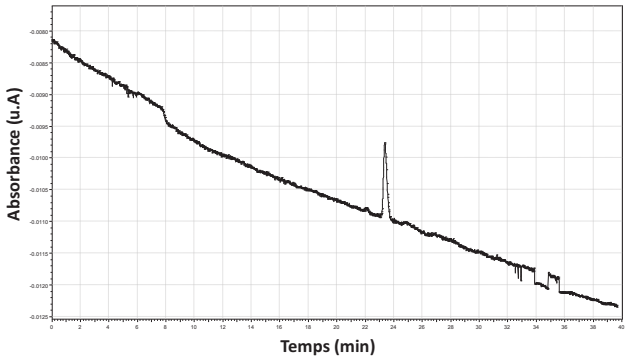
Il a fallu choisir entre les différents électrolytes préparés. Le choix offrant le meilleur compromis entre une migration rapide et une bonne séparation s'est orienté vers le tampon $H_3PO_4/NaH_2PO_4.2H_2O$ à pH = 3 avec une sur-pression anodique de 0,5 psi, une tension de + 10 KV et un temps d'analyse de 10 minutes.



Phase		Pression / Tension	Durée
Rinçage	NaOH 1 M	20 psi / -	3 min
	H_2O	20 psi / -	3 min
	Tampon	20 psi / -	3 min
Injection	Echantillon	0,4 psi / -	3 s
	Tampon	0,4 psi / -	3 s
Séparation		0,5 psi / 10 kV	10 min

Electrophérogramme 1 : Electrophérogrammes obtenus par EC-UV (électrophorèse capillaire avec détection UV). Le peptide MR 6-D_0 a été analysé à différentes valeurs de pH pour optimiser la séparation[563]

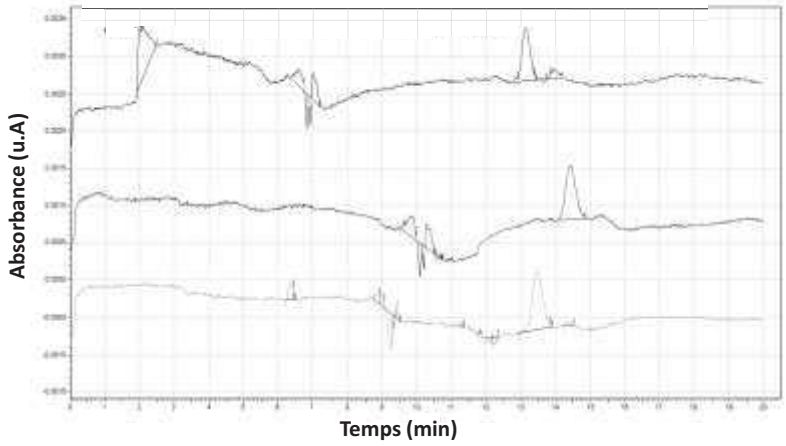
Dans un second temps la surpression a été supprimée rendant ainsi l'analyse plus longue étant donné l'absence d'assistance pneumatique. Le temps d'analyse a alors dû être augmenté pour passer de 10 à 40 minutes pour une tension de 10 kV sur un capillaire de longueur totale 50 cm (40 cm jusqu'au détecteur UV), ce qui correspond à un champ électrique de 200 $V.cm^{-1}$. Ceci a permis de détecter, sur 3 analyses, le peptide MR 6–D_0 à un temps de migration de 23,5 minutes (voir Electrophérogramme 2 ci-dessous).



Electrophérogramme 2 : Analyse électrophorétique du MR 6-D_0 ; 10 KV ; pH=3 ; 40 min

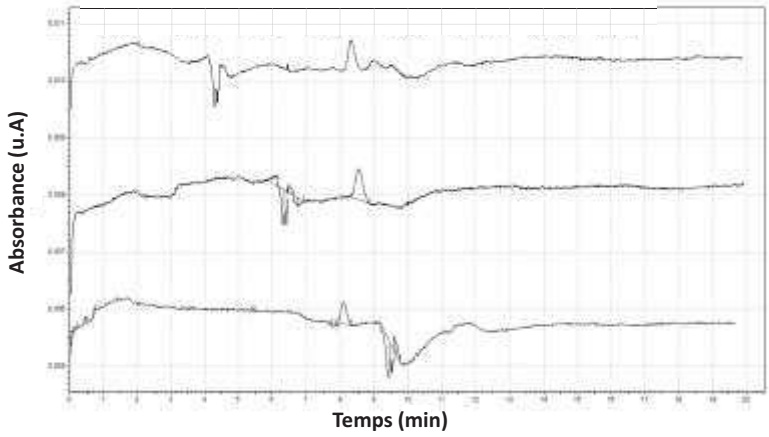
[563] 1 Pa = 0,000 145 psi

Enfin deux autres tensions ont été utilisées afin de comparer leur influence sur la migration du peptide et le profil électrophorétique, à savoir 20 kV et 30 kV pour des champs électriques respectifs de 400 et 600 $V.cm^{-1}$. Dans ces deux derniers cas, le temps d'analyse a pu être réduit à 20 minutes.



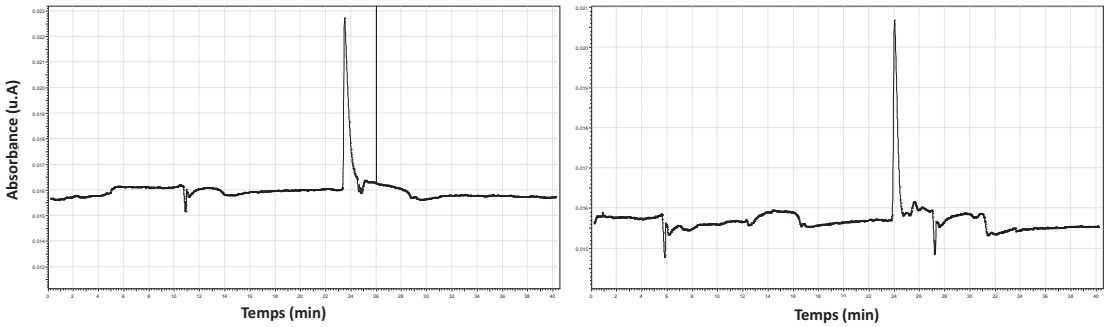
Electrophérogramme 3 : Profils électrophorétiques du MR 6-D_0 ; 20 KV ; pH = 3 ; 40 min

Pour chacun des trois champs électriques une étude de répétabilité a été effectuée avec au totale 3 analyses par valeur de champs montrant dans ces 3 cas le même profil électrophorétique (voir Electrophérogramme 3 ci-dessus et Electrophérogramme 4 p.238).



Electrophérogramme 4 : Profils électrophorétiques du MR 6-D_0; 30 KV ; pH = 3 ; 40 min

Suite à cela les autres fractions des peptides MR 6–D_4 et MR 6–D_0, dont la fenêtre de récolte lors de la purification était plus resserrée et dont la qualité est supposée supérieure, ont été analysées avec ces conditions optimales et une concentration plus élevée en peptide. Ceci a permis d'obtenir les résultats présentés ci-dessous.



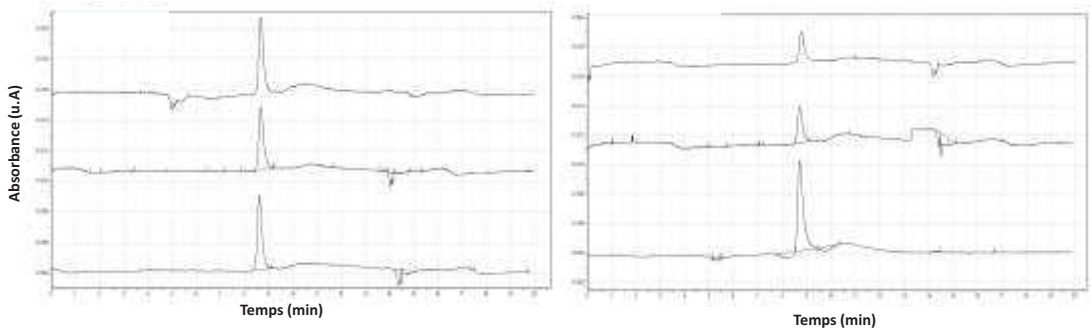
Electrophérogramme 5 : Profils électrophorétiques du MR 6 – D_0 (à gauche) et du MR 6 – D_4 (à droite); 10 kV ; pH = 3 ; 40 min

C'est la raison pour laquelle les conditions optimales choisies pour l'analyse de ce peptide font intervenir un champ électrique de 20 $kV.m^{-1}$ (voir Tableau 26 ci-dessous).

L totale (capillaire)	50 cm
$ø_{int}$(capillaire)	50 µm
Tension	10 kV
Temps d'analyse	40 minutes
Tampon / pH	$H_3PO_4/NaH_2PO_4.2H_2O$ / 3

Tableau 26 : conditions optimales d'analyse retenues

Pour terminer, des expériences avec une surpression anodique (0,5 psi) ont été renouvelées et répétées 3 fois avec une concentration plus élevée en peptides (identique aux 3 précédentes analyses) afin de juger de l'impact de la pression sur le profil électrophorétique (voir Electrophérogramme 6 ci-dessous).



Electrophérogramme 6 : Profils électrophorétiques du MR 6-D_0 (à gauche) et du MR 6–D_4 (à droite) ; P = 0,5 psi ; 10 kV ; pH = 3 ; 40 min

On remarque la répétabilité des analyses d'une part et l'absence de second pic qui avait été observé lors de la première analyse. L'hypothèse avancée affirme que le second pic correspond à un isomère de l'insaturation du motif HCCA étant donné que l'échantillon avait été caractérisé par HPLC-UV masse en ne contenant que la masse du peptide attendu. Il a été observé (voir paragraphe IV.C p.244) qu'en solution le peptide MR 6–D_0 et son analogue deutéré sont en équilibre entre les isomères E et Z avec un des deux isomères majoritaire (voir paragraphe IV.C p.244). Cela ne

remettant pas en cause la pureté U.V du produit qui a été confirmée les analyses par HPLC-UV et gradient d'élution conséquent. En revanche, un tel équilibre serait visible sur des temps d'analyse courts même avec un isomère majoritaire qui deviendrait indécelable avec des temps d'analyse longs à cause d'un étalement des pics qui les ferait passer sous la limite de détection U.V.

En conclusion, l'électrophorèse capillaire de zone permettant une séparation des composés selon le rapport charge/rayon hydrodynamique, le fait de ne voir qu'un seul pic sur toutes les analyses porte à croire que les impuretés qui ont pu être séparées par HPLC (double incorporation de Gln, Pro et Asn) présentent les mêmes charges en solution, des rayons hydrodynamiques similaires et donc le même temps de migration en électrophorèse capillaire. En outre, l'hypothèse selon laquelle les deux pics initialement observés correspondraient aux deux isomères de l'insaturation du fragment HCCA n'a pu être vérifiée avec les analyses effectuées. En revanche, cette hypothèse pourrait être totalement validée du point de vue de l'analyse par électrophorèse capillaire grâce à un couplage online avec un spectromètre de masse (ECZ-MS) possédant un analyseur quadripôlaire ou à temps de vol. Cet équipement n'étant pas disponible, l'expérience n'a pas pu être effectuée dans le cadre de ces travaux de thèse.

III.F. Analyse élémentaire du peptide MR 6

Une analyse élémentaire du peptide a été effectuée afin de connaître aussi précisément que possible le contenu peptidique de MR 6 – D_0 en partant du principe que le contenu organique de l'échantillon est peptidique et en prenant en compte une molécule de TFA par peptide du fait de l'étape de lyophilisation après celle de chromatographie préparative mettant en jeu des éluants à 0,1 % de TFA. D'après les données obtenues (voir Tableau 27 ci-dessous) il faut appliquer un facteur de 0,79 à chaque concentration calculée pour prendre en compte le contenu peptidique des échantillons qui serait au mieux constitué de peptide mais qui comprend beaucoup plus probablement des molécules de TFA et une très faible proportion d'impuretés peptidiques de synthèse (d'après les analyses par MALDI-MS).

Il est primordial de noter que toutes les valeurs de concentration données dans ce mémoire ne prennent pas en compte cette correction. Elles tiennent uniquement compte d'une molécule de TFA par molécule de peptide pour les calculs de concentration. Cela est un biais systématique qui n'aura aucune conséquence sur les calculs de rapports de concentrations. Les seules données pouvant être impactées par un tel facteur seraient *in fine* les concentrations de ligand liés calculées à l'issue des expériences de pharmacologie. Cela aurait pour conséquence de diminuer de façon identique toutes les valeurs selon l'axe des ordonnés. Ce qui aura pour conséquence de modifier la valeur de B_{max} calculée mais pas le K_d. La seule information sur laquelle aucun doute n'est possible

est la pureté de l'échantillon peptidique qui n'est pas de 100 % auquel cas les valeurs théoriques et expérimentales seraient identiques.

	C[%]	H [%]	N[%]	O[%]
Mesure 1	44,946	4,663	14,664	21,569
Mesure 2	44,785	4,445	14,716	21,372
Moyenne	44,866	4,554	14,69	21,471
Demi écart-type	0,114	0,155	0,037	0,139
Valeur haute	44,752	4,399	14,653	21,332
Valeur basse	44,980	4,709	14,727	21,610
Mesure théorique (1 sel de TFA)	53,56	5,83	18,63	17,52
Valeur mesurée/Valeur théorique			**79 %**	

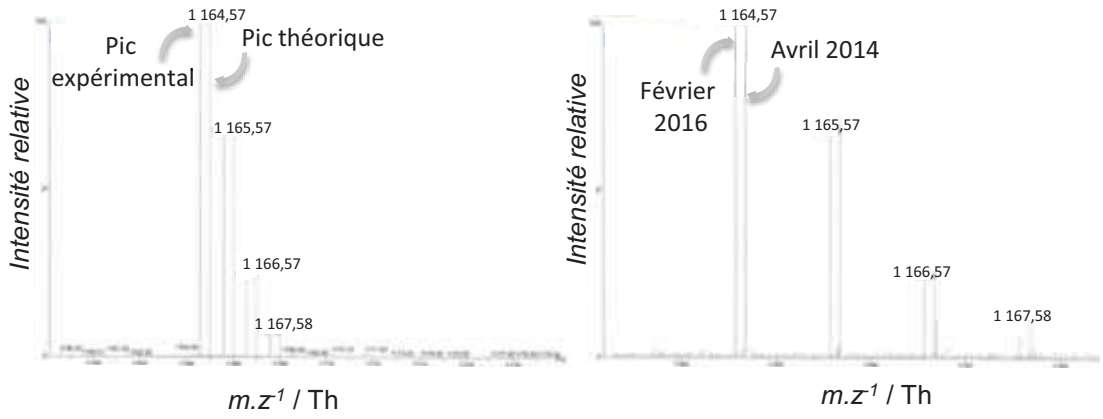
Tableau 27 : Analyse élémentaire du peptide MR 6

IV. Etude par spectrométrie de masse MALDI de la stabilité du peptide MR 6

IV.A. Stabilité du peptide en condition de stockage et en solution

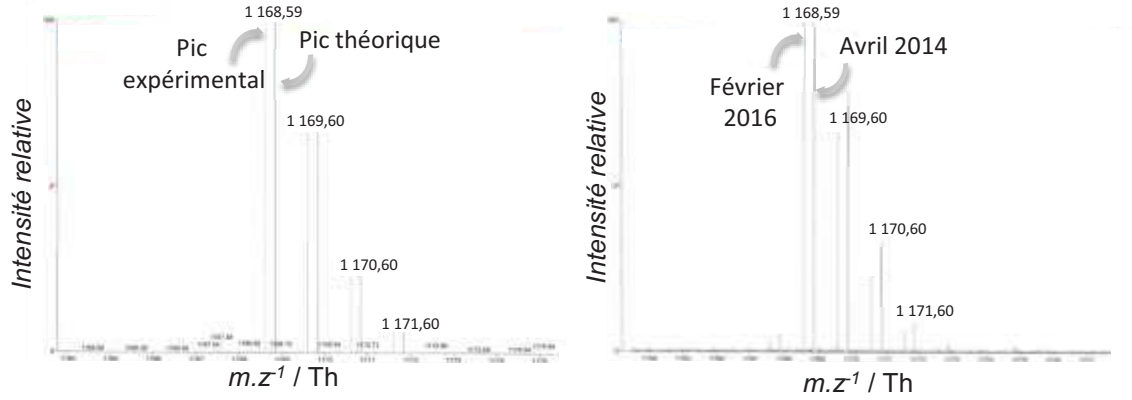
IV.A.1. Contrôle de la stabilité de l'échantillon solide à long terme

Le peptide MR 6 a été synthétisé en tout début de thèse, or avec des travaux d'optimisation et de quantification qui se sont développés sur 2 ans il est tout naturel de se poser la question de la stabilité du composé sous forme solide en stock. C'est la raison pour laquelle une analyse par spectrométrie de masse sur Synapt G2-S a été effectuée au bout de 2 ans pour comparer les massifs isotopiques et les rapports entre les pics A1 et A2. En effet, une répartition isotopique naturelle donnerait des hauteurs de pics décroissantes entre le pic monoisotopique et les pics multiisotopiques. Or si le peptide amide devait subir une dégradation chimique vers la forme acide, cela se manifesterait sur le spectre de masse par une diminution de la hauteur relative du pic monoisotopique par rapport au pic A2 étant donné que le peptide acide afficherait une masse monoisotopique incrémentée de 1 par rapport au peptide amide.



Spectre 10 : Spectres du peptide MR 6 – D_0 obtenus sur Synapt G2-S avec source ESI+. A gauche, la comparaison entre le massif isotopique théorique et expérimental ; à droite, la comparaison entre l'analyse du peptide lyophilisé en sortie de synthèse (2014) et 2 ans plus tard (2016)

Il a été montré, grâce aux analyses sur Synapt, qu'au bout de 2 ans l'allure du massif isotopique et les proportions des différents pics isotopiques étaient les mêmes qu'en sortie de synthèse, aussi bien pour le peptide MR 6–D_0 (voir Spectre 10 ci-dessus) que le peptide MR 6–D_4 (voir Spectre 11 ci-dessous) démontrant ainsi la très bonne stabilité du peptide amide en conditions de stockage.



Spectre 11 : Spectres du peptide MR 6– D_4 obtenus sur Synapt G2-S avec source ESI+. A gauche, la comparaison entre le massif isotopique théorique et expérimental ; à droite, la comparaison entre l'analyse du peptide lyophilisé en sortie de synthèse (2014) et 2 ans plus tard (2016)

IV.A.2. Stabilité au pH de travail en pharmacologie et dans différents tampons

Des expériences ont été faites avec les peptides MR 6-D_0 et MR 5 pour visualiser selon la méthode de quantification directe (voir paragraphe VII.B p.280) par dilution isotopique leur dégradation ou non dans le tampon de dissociation en fonction du temps et déterminer si cela a un impact sur les mesures ultérieures en MALDI. Une étude aurait pu être menée également dans le tampon de liaison, cependant celui-ci est conçu à un pH neutre et avec des composés qui inhibent les enzymes responsables de dégradation. Ceci prévenant à la fois la dégradation chimique en milieu acide, si elle a lieu, et la dégradation enzymatique.

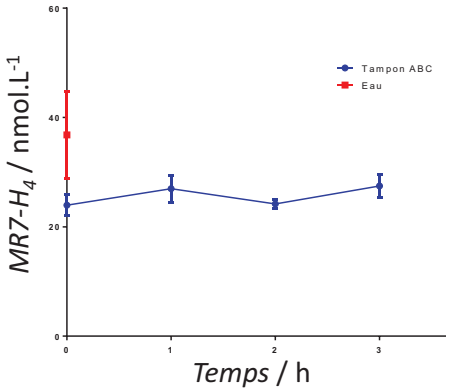


Figure 126 : Incubation du peptide MR 6-D_0 à 30 °C sur une échelle de temps cohérente avec le temps de manipulation en pharmacologie dans une solution d'eau (légèrement acide) et dans le tampon ABC (ammonium bicarbonate à pH = 8) à une concentration de 10 nmol.L^{-1}

Les résultats présentés sont ceux obtenus avec le peptide quantifié, le MR 6 – D_0. Le graphique (voir Figure 126 ci-dessus) montre que sur une journée, il n'y a pas de dégradation notable du peptide par voie chimique en considérant le coefficient de variation de ces mesures à 38 %.

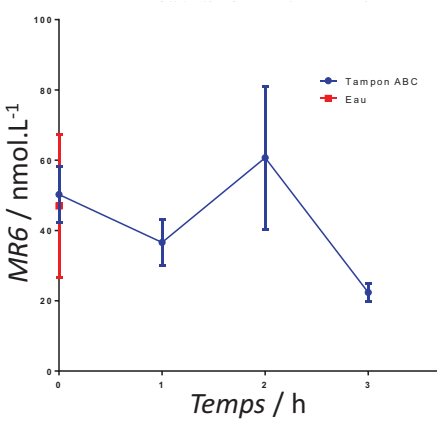


Figure 127 : Incubation du peptide MR 5 sur une échelle de temps cohérente avec le temps de manipulation en pharmacologie dans une solution d'eau (légèrement acide) et dans le tampon ABC (ammonium bicarbonate à pH = 8) à une concentration de 10 nmol.L^{-1}

Au contraire, les résultats (voir Figure 127 ci-dessus) pour le peptide MR 5 montrent que celui-ci semble se dégrader entre 2 et 3 h passées dans le tampon de dissociation (H_2O + 1 % TFA). La dégradation de MR 5 n'est pas un problème en soi puisqu'elle interviendrait au moment de la dissociation après que l'équilibre d'association entre le peptide et son récepteur soit effectif. De plus MR 5 n'est d'aucune utilité pour la quantification du MR 6 – D_0 une fois l'échantillon introduit en MALDI avec son étalon deutéré.

Enfin, des analyses sur plusieurs heures à 4 °C dans la glace ont également été effectuées. Leur objectif était de constater ou non une dégradation chimique et non enzymatique, cette dernière étant impossible grâce au lavage lors de la manipulation en pharmacologie, dans les conditions de transport des échantillons du site d'incubation au site d'analyse MALDI. Les résultats montrent une

excellente stabilité sur un temps très long (15 h) alors que le transport ne dure qu'au maximum 20 minutes.

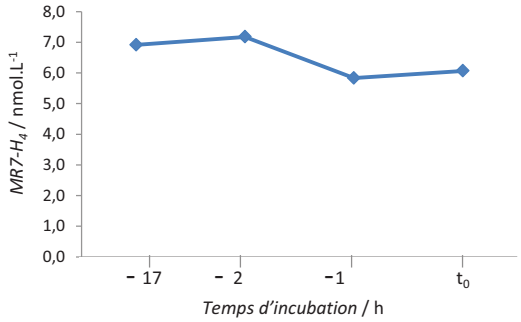


Figure 128 : Evolution au cours du temps du MR 6 – D_0 dans le tampon de dissociation à 4°C (conditions de transport). Les différents échantillons sont préparés 17 h, 2 h ou 1 h avant le dépôt à t_0.

IV.B. Etude du pH des peptides en solution impliqués dans les expériences de pharmacologie sur les récepteurs V_{1A} et CCKB-R

Les peptides synthétisés sont très probablement sous forme solide avec des contre-ions. Pour démontrer cela, des analyses précises de pH ont été effectuées en comparant celui de différentes solutions de peptides avec une solution de référence. Les résultats (voir Tableau 28 ci-dessous) ont montré que pour tous les peptides étudiés, leur pH en solution était systématiquement inférieur à celui de la solution de référence. Cela signifie donc qu'une quantité plus importante de protons sont libérés en solution lors de la dissolution des peptides qui proviennent du seul composé acide pouvant être présent dans l'échantillon solide de peptide : le TFA. Ainsi il est cohérent de considérer une molécule de TFA par molécule de peptide sans toutefois pouvoir déterminer s'il y en a bien une ou davantage du fait des nombreux équilibres acide/base en jeu dans la détermination du pH des solutions de peptide.

	Mesures			Moyenne	C.V (%)
Solution analysée	Série 1	Série 2	Série 3		
H_2O + 1 % TFA	1,075	1,119	1,19	1,128	5
MR 4	1,071	1,08	1,038	1,063	2
MR 5	1,066	1,067	1,052	1,062	1
MR 6 – D_0	1,048	1,058	1,048	1,051	1
MR 10 – D_0	1,023	1,012	1,079	1,038	3

Tableau 28 : Mesures de pH des solutions des différents peptides à 10^{-5} mol.L^{-1} préparées dans H_2O + 1 % TFA par rapport à une solution de référence (appareillage en Partie D – *Partie expérimentale*, paragraphe I.I.2 p.406)

IV.C. Etude de l'équilibre E/Z du MR 6 – D_0

Nous avons pu constater avec les analyses par électrophorèse capillaire que le temps d'analyse semblait avoir un impact sur l'isomérisation de l'insaturation du fragment HCCA

notamment du fait d'un champ électrique et d'un échauffement similaire à un effet Joule et donc de l'énergie donnée aux molécules pour enclencher l'isomérisation.

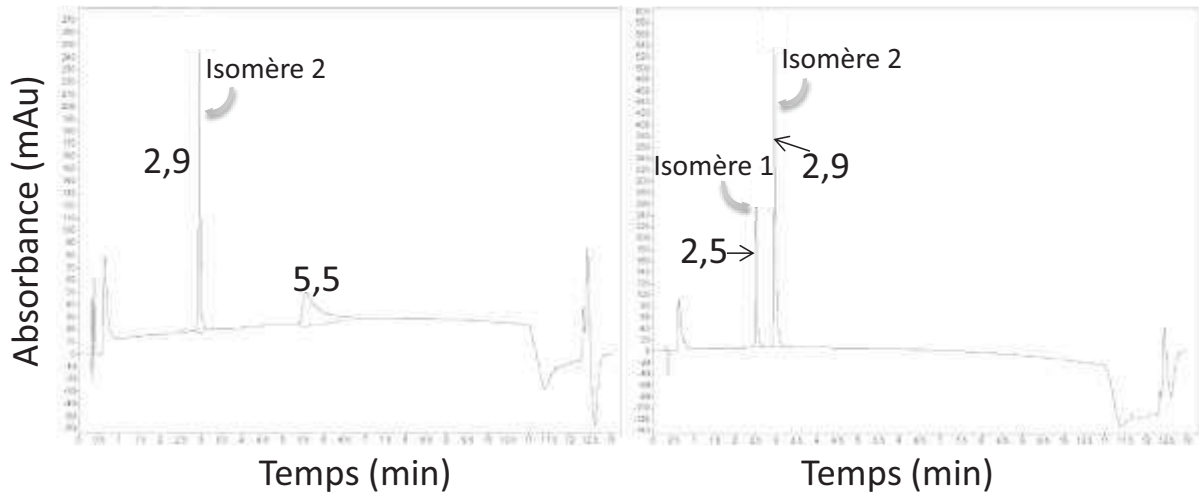


Figure 129 : Comparaison du chromatogramme UV du peptide MR 6 – D_0 dans le tampon de liaison à t_0 (à gauche) qui présente un pic de BSA à 5,5 min et dans un mélange H_2O/MeCN 50/50 à t_0 (à droite)

Il y aurait alors un équilibre dynamique fonction de la température et du temps. Des analyses supplémentaires sur le peptide MR 6 – D_0 ont été effectuées dans une solution H_2O/MeCN 50/50 (v/v). Deux pics apparaissent alors en UV (voir Figure 129 ci-dessus) et correspondent tous deux à la même masse. Cette proportion semble évoluer au cours du temps sans toutefois atteindre une isomérisation totale vers l'un des deux isomères dans un temps compatible avec une expérience de pharmacologie d'une heure (voir Tableau 29 p.245).

		Eau/Acétonitrile 50/50 (v/v)		Tampon binding	
Peptide	Temps d'incubation	Proportion Isomère 1	Proportion Isomère 2	Proportion Isomère 1	Proportion Isomère 2
MR 6– D_0	t_0	28 %	72 %	0 %	100 %
	1 h	28 %	72 %		
	15 h	20 %	80 %		
MR 10 – D_0	t_0	38 %	62 %	0 %	100 %

Tableau 29 : Proportions UV des peptides mis en jeu dans les expériences de saturation et de compétition sur préparation membranaire dans le tampon de liaison et dans un mélange choisi usuellement pour analyser les peptides en HPLC-UV

En revanche, lorsque le peptide est solubilisé dans le tampon utilisé pour les expériences de pharmacologie, un seul et unique pic UV correspondant au peptide est détecté dès l'instant initial t_0.

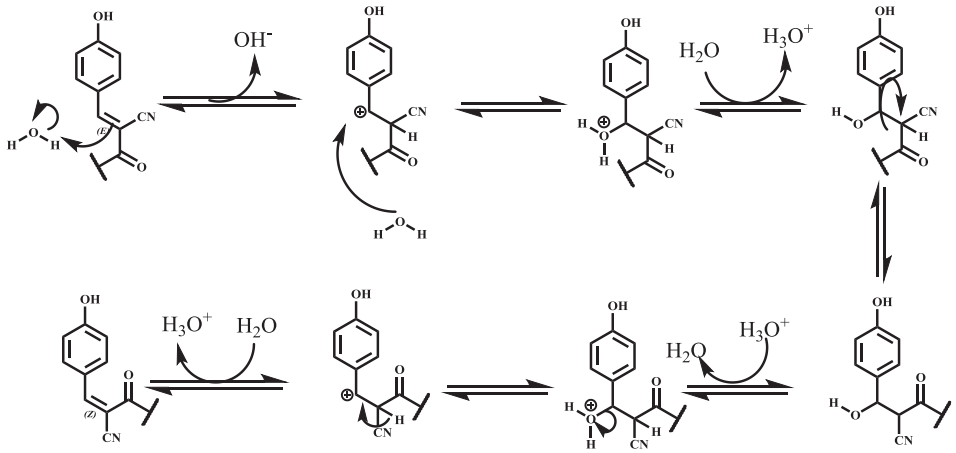


Figure 130 : Proposition de mécanisme réactionnel pour l'isomérisation de l'insaturation du fragment HCCA en solution

Cela démontre d'une part qu'il existe bien un équilibre dynamique (voir Figure 130 ci-dessus) entre les deux isomères possibles de ce peptide et que celui-ci est totalement déplacé vers l'un des deux en conditions opératoires, ce qui ne nuira en aucun cas à la qualité de la liaison du peptide envers le récepteur V_{1A}.

Les mêmes analyses ont été effectuées sur le peptide MR 10-D_0 également destiné à être mis en jeu dans des expériences de pharmacologie sur le récepteur CCKB-R. Les résultats sont similaires à ce qui a été observé pour le peptide MR 6 – D_0 avec une isomérisation totale dès l'instant initial t_0 dans le tampon de liaison (voir Figure 131 ci-dessous).

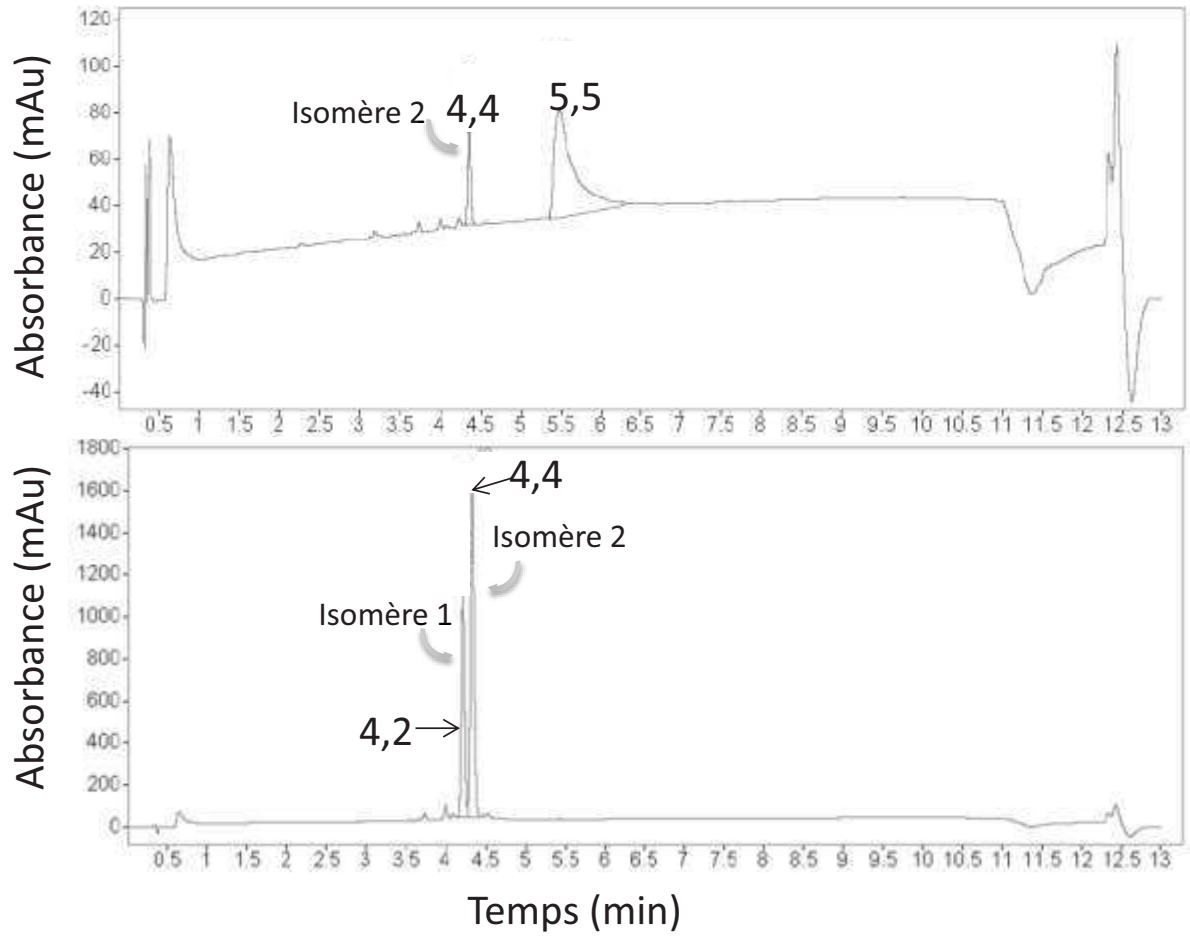


Figure 131 : Comparaison du chromatogramme UV du peptide MR 10-D_0 dans le tampon de liaison à t_0 (en haut) qui présente un pic de BSA à 5,5 min et dans un mélange H_2O/MeCN 50/50 à t_0 (en bas)

V. Développements méthodologiques en spectrométrie de masse MALDI : Etude de la détection des peptides et du dépôt avec MR 6-D_0

Dans ce paragraphe, nous allons nous focaliser sur l'aspect dépôt (matrice, protocole …) et détection (paramètres , limites …) du premier peptide d'intérêt, le MR 6-D_0. L'ensemble des travaux qui portent sur l'optimisation de l'ensemble des conditions allant de la préparation de l'échantillon jusqu'à l'étalonnage ont constitué une très important part du travail de ce projet de thèse et ont fourni une large quantité de données à traiter (voir Tableau 30 ci-dessous).

Nombre de plans d'expérience	Nombre de dépôts/spectres à traiter moyen par plan d'expérience	Nombre de tirs lasers par dépôt	Temps passé par dépôt
127	128	100 – 500 – 1000	10 s – 5 min

Tableau 30 : Aperçu synthétique du nombre de tirs laser et du temps passé sur le MALDI Ultraflex III, Brucker Daltonics© pour le développement analytique

V.A. Protocoles de dépôts développés

V.A.1. Discussion à propos des protocoles de dépôt

Les protocoles de dépôts utilisés au cours de l'étude sont tous basés sur la méthode de la goutte séchée et/ou de la couche mince. Ces derniers ont donc fait l'objet de modifications en

termes de préparation des dépôts essentiellement. Seules les principales modifications sont décrites dans ce paragraphe.

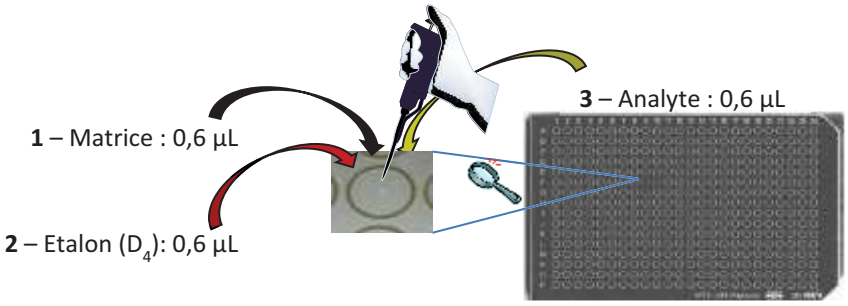


Figure 132 : Principe de la technique de dépôt baptisée GS 1.8

En ce qui concerne la technique « GS 1.8 » (voir Figure 132 ci-dessus), le but est de déposer selon la méthode de la goutte séchée des volumes égaux (0,6 µL) de solution de matrice, d'analyte (MR 6-D_0) et d'étalon (MR 6-D_4) afin d'avoir une proportion de 1:1 entre ces deux derniers pour une quantification facilitée. La solution de matrice étant constituée de solvant organique (acétonitrile), celles d'analyte et d'étalon par de l'eau à 1 % de TFA. L'inconvénient majeur de cette technique étant le temps de séchage rallongé à cause de l'important volume de solution déposé.

La technique « GSP » (voir Tableau 31 p.250) a été utilisée, quant à elle, dans le but d'améliorer la répétabilité et la cristallisation des dépôts après séchage en pré mélangeant les différentes solutions à déposer, le principal inconvénient étant l'augmentation du temps de manipulation. Cela a eu pour principal effet d'avoir des dépôts plus étalés présentant un cœur très concentré en cristaux, parfois gros, de matrice avec une couronne au niveau du puit constituée de petits cristaux de matrice et non une large couronne à la lisière de la goutte déposée. De telles couronnes ont permis d'obtenir des résultats intéressants en ce qui concerne la quantification des échantillons issus des expériences biologiques.

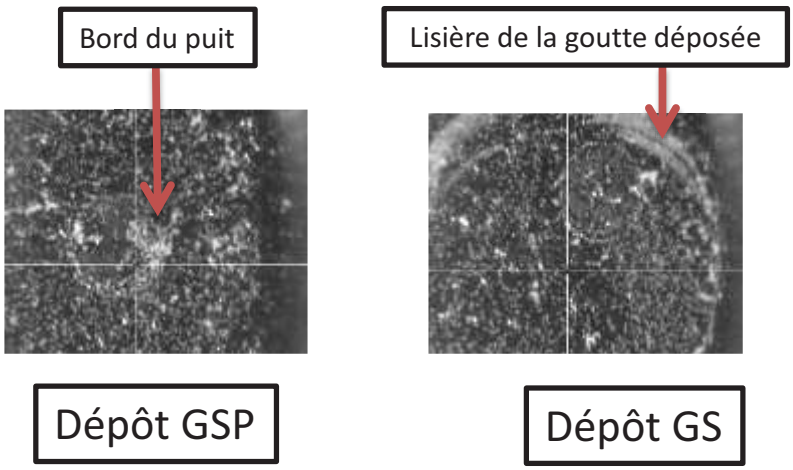


Figure 133 : Illustration de la différence de cristallisation d'un échantillon déposé par la technique GS et GSP

Enfin, la technique « GSP-M1/2 » a été mise au point suite à la lecture d'un article décrivant l'influence de la proportion d'eau dans les dépôts MALDI ainsi que plusieurs échecs concernant la quantification.[564] Selon cette étude, la proportion d'eau jouait directement sur la tension de surface des gouttes, d'une part, et également sur le temps de séchage des gouttes. Cela avait également pour effet de modifier la détection de certains ions et adduits choisis pour cette étude. Dans le cadre de l'optimisation de l'étalonnage, une mauvaise cocristallisation des peptides semblait à l'origine des problèmes rencontrés. C'est pourquoi une plus grande proportion de solution de matrice a été utilisée afin d'augmenter la proportion de solvant organique dans les micro-tubes de mélange afin d'avoir *in fine* un séchage plus rapide des gouttes une fois déposées. Ceci dans le but d'avoir une cristallisation plus rapide et donc des inclusions, dans les cristaux de matrice, plus importantes « d'impuretés », les peptides MR 6-D_0 et MR 6-D_4 en l'occurrence pour une meilleure cocristallisation de ces deux peptides.

Ces deux derniers protocoles de dépôt prenant plus temps à mettre en place, un plan d'expériences a été mis en œuvre afin de constater la dégradation ou non du MR 6-D_0 dans la solution de dépôt sur 1h, 5h et 24h à température ambiante (voir paragraphe IV.A.2 p.242). Après analyse des résultats, il a pu être vérifié qu'aucune dégradation du peptide n'était visible sur les spectres de masse. Ceci permettant d'utiliser les protocoles basé sur « GSP » en toute légitimité.

[564] Figueroa, I. D.; Torres, O.; Russell, D. H. Anal. Chem. 1998, 70, 4527.

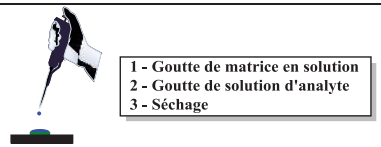
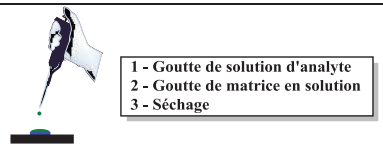
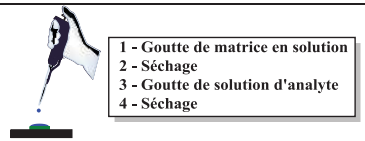
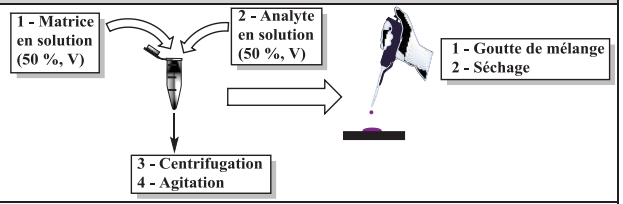
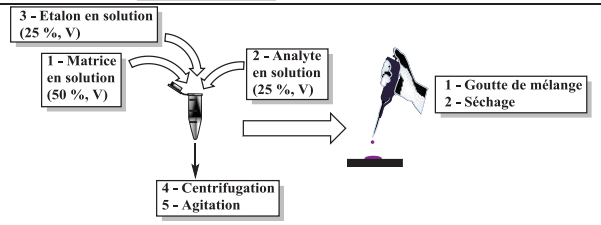
Technique	Principe	Avantage	Inconvénient	Illustration
Goutte séchée (**GS**)	Cette technique a été Introduite par le Pr. Karas et le Pr. Hillenkamp en 1988 et consiste à déposer une goutte de solution de matrice et une goutte de solution d'analyte par-dessus sans séchage intermédiaire.	Bonne tolérance à certains sels et aux tampons.	Agrégation possible de cristaux à la lisière de la goutte déposée rendant le dépôt inhomogène.	
Goutte séchée inverse (**GSI**)	L'idée de cette technique alternative est d'optimiser l'étape d'ionisation primaire en ne formant que des ions de matrice qui vont, une fois la couche d'analyte atteinte, engendrer la production d'ions secondaires	Production optimale d'ions primaires	Tirs répétés avant d'atteindre la couche d'analyte si la couche de matrice est épaisse	
Evaporation rapide (**ER**)	Cette technique a été développée par Vorm O., Roepstorff P. et Mann M. Elle consiste à déposer une solution de matrice dans un solvant organique à évaporation rapide (e.g : acétone) puis une goutte d'analyte après séchage de la solution de matrice par-dessus.	Préparation des surfaces de matrice en avance. Distribution homogène de la matrice et de l'analyte qui permet une acquisition plus rapide des données.	La matrice doit être soluble dans un solvant organique à évaporation rapide.	
Goutte séchée 1,8 µL (**GS 1.8**)	L'idée de cette technique est de déposer un volume de 0,6 µL de chaque composé pour garder un rapport constant entre l'analyte et l'étalon pour la quantification	Dépôt direct de chaque composé en goutte séchée	Important volume à sécher et proportion importante d'eau	
Goutte séchée pré mélangée (**GSP**)	Cette technique a été développée pour obtenir dès le dépôt un mélange homogène entre l'analyte et la matrice. L'objectif est d'atteindre une répartition optimale sur tout le dépôt entre les deux composés pour favoriser l'ionisation primaire et les réactions d'ionisation secondaire	Répartition homogène sur le dépôt de l'analyte et de la matrice	Temps de préparation augmenté	
Goutte séchée pré mélangée à 50 % de solution de matrice (**GSP-M1/2**)	Cette technique est basée sur la GSP et utilisée en quantification. Son objectif est d'obtenir un mélange final 50/25/25 (V/V/V) entre matrice/analyte/étalon pour conserver un temps de séchage le plus rapide possible et un mélange homogène sans dilution relative entre l'étalon et l'analyte	Répartition homogène entre la matrice, l'étalon et l'analyte sans biais causée par une dilution relative	Temps de préparation augmenté	

Tableau 31 : Résumé des protocoles de dépôts utilisés au cours de ces travaux de thèse

V.A.2. Etude de la saturation de la matrice HCCE méthyle

Dans un premier temps, la solubilité de la matrice a été étudiée dans deux solvants organiques à évaporation rapide : l'acétone et l'acétonitrile. L'échantillon utilisé pour l'étude provient du flacon de qualité analytique pour assurer une évaluation au plus proche de la réalité expérimentale.

Le protocole mis en place pour cette évaluation consiste en une pesée de matrice à laquelle un volume de solvant est ajouté permettant d'obtenir une solution saturée. Par la suite de petits volumes de ce dernier sont ajoutés progressivement pour dissoudre petit-à-petit les cristaux de matrices restants par une agitation vigoureuse. L'objectif de cette méthode est clairement d'encadrer la valeur correspondant à une concentration saturante de la matrice dans un solvant organique donné à la manière du théorème de l'encadrement des suites mathématiques en arithmétique. Cela permet *in fine* d'obtenir une évaluation rapide et relativement précise du niveau de saturation de la matrice HCCE méthyle.

Dans le cadre de l'étude avec l'acétone en tant que solvant, 5 mg ont été pesés et dissous dans 100 µL de solvant pour donner une solution saturée suivis d'ajouts progressifs d'acétone (voir Tableau 32 ci-dessous). En tenant compte de l'incertitude de la balance (± 0,1 mg) et de l'intervalle de volume encadrant la dissolution totale des cristaux de matrice (230 – 240 µL), il est possible de déterminer un titre de saturation équivalent à 22 ± 1 $g.L^{-1}$ pour une concentration de saturation de 107 ± 4 $mmol.L^{-1}$ dans l'acétone.

Entrée	$V_{acétone}$ (µL)	Etat de la solution
1	0	-
2	100	Saturée
3	200	Saturée
4	230	Saturée (fins cristaux restants)
5	240	Cristaux totalement dissous

Tableau 32 : Présentation des ajouts progressifs de solvant pour dissoudre totalement les cristaux de matrice dans une solution d'acétone

Le même procédé a été appliqué pour la mesure de la solubilité de l'HCCE méthyle dans l'acétonitrile (voir Tableau 33 ci-dessous). Cette fois-ci, 2 mg ont été pesés et dissous dans 100 µL de solvant pour s'assurer d'obtenir une solution saturée. Le même procédé itératif d'ajout de petits volumes d'acétonitrile a été répété. Au final, le titre de saturation de l'HCCE méthyle dans l'acétonitrile a été mesuré à 9,1 ± 0,5 $g.L^{-1}$ pour une concentration saturante de 44,8 ± 2,5 $mmol.L^{-1}$.

Entrée	V_{MeCN} (µL)	Etat de la solution
1	0	-
2	100	Saturée
3	150	Saturée
4	200	Saturée
5	210	Saturée
6	220	Saturée
7	230	Saturée
8	240	Saturée
9	250	Saturée (fins cristaux restants)
10	255	Cristaux totalement dissous

Tableau 33 : Présentation des ajouts progressifs de solvant pour dissoudre totalement les cristaux de matrice dans une solution d'acétonitrile

De cette manière, la solubilité de l'HCCE méthyle est clairement plus importante dans l'acétone par plus de deux fois. Cela permettrait d'obtenir davantage de molécules de matrice et un dépôt plus riche en matrice. Cependant, la plaque utilisée (Anchorchip) possède un revêtement particulier qui a pour conséquence de concentrer la matière solide au centre de la zone de dépôt à mesure que le séchage d'une goutte déposée progresse. Cela aurait pour effet d'obtenir une couche de matrice beaucoup plus importante en utilisant une solution de matrice dissoute dans de l'acétone. Dans le cadre d'études à des concentrations infimes d'analyte cela deviendrait vite un problème considérant le fait qu'un trop large excès de matrice pourrait avoir comme conséquence une raréfaction des molécules d'analyte dans les cristaux de matrice formés lors du séchage.

C'est la raison pour laquelle le solvant conservé pour les préparations de matrice sera l'acétonitrile et non l'acétone.

V.A.3. Etude de la dilution créée par les protocoles de dépôt

Dans l'optique de pouvoir tracer des courbes d'IC_{50} correctes il faut idéalement pouvoir détecter les peptides d'intérêt en spectrométrie de masse allant jusqu'à 1/20^{è} de la valeur cible, par exemple du K_i. Il est important de noter qu'en sortie de test de compétition sur cellule/membrane, ce sera une fraction de la quantité de matière des échantillons qui seront dosés. En effet les dépôts MALDI requérant un faible volume, pour une concentration donnée, seule une faible quantité de matière sera dosée comme illustré dans le Tableau 34 ci-dessous.

Dans le tableau ci-dessous, les 2 colonnes suivant celles des entrées correspondent aux solutions préparées dans des micro-tubes qui seront par la suite mélange à une solution de matrice avant dépôt, tandis que les 2 colonnes suivantes correspondent aux valeurs du dépôt d'un volume d'1 µL sur la plaque MALDI.

Entrée	Gamme de concentrations préparées (mol.L^{-1})	Quantité de matière en solution de 100 µL (amol)	Concentration sur dépôt (mol.L^{-1})	Quantité de matière sur dépôt (amol)
1	10^{-5}	1 000 000 000	6 - 5.10^{-6}	6 000 000 – 5 000 000
2	10^{-6}	100 000 000	6 - 5.10^{-7}	600 000 – 500 000
3	10^{-7}	10 000 000	6 - 5.10^{-8}	60 000 – 50 000
4	10^{-8}	1 000 000	6 - 5.10^{-9}	6 000 – 5 000
5	10^{-9}	100 000	6 - 5.10^{-10}	600 – 500
6	10^{-10}	10 000	6 - 5.10^{-11}	60 – 50
7	10^{-11}	1 000	6 - 5.10^{-12}	6 – 5
8	10^{-12}	100	6 - 5.10^{-13}	0,6 – 0,5

Tableau 34 : Correspondance concentration/quantité de matière déposée montrant l'effet de dilution une fois les solutions déposées

Ainsi, pour les expériences avec dépôt GSP, on peut estimer un dépôt d'au maximum 5,0.10^{-12} mol de composé pour l'entrée 7 par exemple. La technique GS 1.8 permet quant à elle d'obtenir un dépôt légèrement plus conséquent avec 6,0.10^{-12} mol.L^{-1} déposés mais avec un temps de séchage beaucoup plus long. Le constat est fait avec les techniques GSI et ER lorsque 3 composés (matrice/analyte/étalon deutéré) doivent être déposés à hauteur de 0,6 µL chacun. Indépendamment de cela, il a été constaté au cours des nombreux dépôts effectués une meilleure reproductibilité de son aspect via la technique GSP, raison pour laquelle le pré mélange des différents composants pour une analyse est préconisé.

V.A.4. Influence de la température de séchage

La température de séchage des dépôts a également été prise en compte pour palier la différence de température qui peut exister entre des manipulations effectuées l'hiver et l'été. Quelques analyses ont été effectuées d'une part en laissant sécher les dépôts à température ambiante en hiver, et sous flux d'air chaud d'autre part pour apporter un contrôle de la température. Les résultats en termes de détection et de quantification sont sans appel et sont illustrés par la Figure 134 ci-dessous.

La sensibilité en détection est clairement améliorée en utilisant un flux d'air chaud (spectres **C** et **D**) par rapport à un séchage à température ambiante en période hivernale (spectres **A** et **B**). Une hypothèse avancée pour expliquer ces résultats implique la vitesse de séchage de loin supérieure sous flux d'air chaud qui permet une cristallisation plus rapide. Or, si la cristallisation est plus rapide, d'après les connaissances acquises dans le domaine de la chaîne du solide humide et des processus de cristallisation, cela induit davantage d'inclusions, non seulement de solvant mais également d'impuretés présentes dans ce dernier. En considérant les peptides comme des impuretés aux yeux de la matrice et présents en large défaut par rapport à celle-ci, il est alors tout à fait logique d'obtenir

une meilleure ionisation des analytes suite à une cristallisation plus rapide de la matrice qui va inclure une quantité plus importante de peptides sous forme solide et/ou encore solvatée.

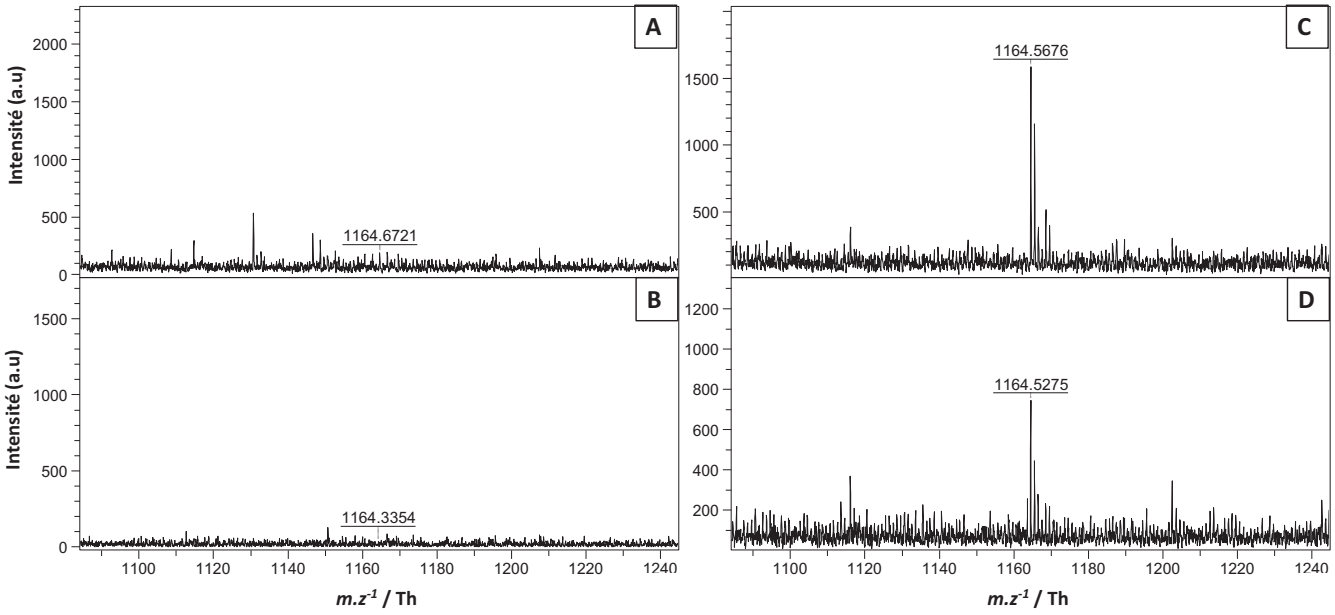


Figure 134 : Illustration de dépôts issus d'une expérience de saturation sur préparation membranaire zoomée autour de la masse du peptide d'intérêt (MR 6-D_0). Le spectre A correspond à l'analyse d'un échantillon avec une concentration introduite de 0,2 nM et le spectre B à une concentration introduite de 8 nM pour un séchage sous flux d'air à température ambiante, tandis que le spectre C correspond au dépôt de l'échantillon de A et le spectre D à l'échantillon de B séchés sous flux d'air chauffé

Cela va permettre, en prenant en compte le modèle de la fusion énergétique et des sauts énergétiques, de faciliter le transfert d'énergie entre la matrice et l'analyte dans le cas de l'utilisation de l'HCCA. En outre, les résultats seront améliorés dans le cas des peptides marqués par l'HCCA et codéposés avec la matrice HCCE méthyle à travers l'absorption de l'énergie laser par ceux-ci et par les processus de saut et de fusion énergétiques plus efficaces car effectués entre un nombre plus important de molécules cocristallisées.

	Liaison totale		Liaison non spécifique	
Séchage	Flux d'air	Flux d'air chauffé	Flux d'air	Flux d'air chauffé
S/N (MR7-H_4, moyenne)	17	24	10	11
C.V (MR7-H_4, moyenne)	22 %	10 %	31 %	33 %
S/N (MR7-D_4, moyenne)	9	42	5	21

Tableau 35 : Comparaison des coefficients de variation et de la sensibilité des mesures en fonction du séchage des dépôts sur deux expériences de saturation (liaison totale et non spécifique) pour l'ensemble des points de mesures : 3 séries de 8 points déposés 2 fois chacun pour la liaison totale et 3 séries de 8 points déposés 2 fois chacun pour la liaison non spécifique pour un total de 96 prises de mesure

Les tests de température de séchage ont été effectués sur des échantillons issus d'expérimentations pharmacologiques. En s'intéressant aux rapports S/N, on s'aperçoit qu'ils sont en

général plus importants après séchage sous flux d'air chaud, tandis que les coefficients de variation sont plutôt équivalents ou meilleurs que sous flux d'air à température ambiante (voir Tableau 35 ci-dessus). Enfin, lorsque l'on s'intéresse aux rapports S/N de l'étalon deutéré, qui n'est pas à négliger lorsqu'une quantification est opérée, ceux-ci sont systématiquement supérieurs d'un facteur 2 à 5 après séchage sous flux d'air chaud par rapport à un flux d'air à température ambiante. Or un bon rapport S/N pour l'étalon deutéré est également gage d'une quantification fiable. C'est la raison pour laquelle le séchage sous flux d'air chaud est à conserver pour des résultats reproductibles et fiables. En conclusion l'utilisation du flux d'air chaud permettra au mieux de largement améliorer la répétabilité des mesures, à défaut, de la garder constante et dans tous les cas d'améliorer le rapport S/N.

V.A.5. Optimisation de la technique de dépôt et des conditions de dépôt

Dans le cadre du développement de la méthode analytique de quantification par dilution isotopique aux isotopes stables par MALDI, il faut étalonner les mesures en mettant en application la SID-MS sur des courbes d'étalonnage et dans le cadre d'une procédure de validation statistique (détaillés tous deux aux paragraphes VI.B p.273 et VIII p.290).

Parmi les conditions étudiées figure la nature de la plaque et la taille du puit. Dans un premier temps des dépôts sur plaque en acier poli et anchorchip à puit de 800 µm ont été effectués (voir **A** et **B,** Figure 135 ci-dessous). Les images montrent un dépôt beaucoup plus étalé et beaucoup moins concentré en cristaux de matrice, ce qui est un élément à prendre en compte pour une analyse efficace. D'où le choix de conserver la plaque anchorchip pour la suite des analyses.

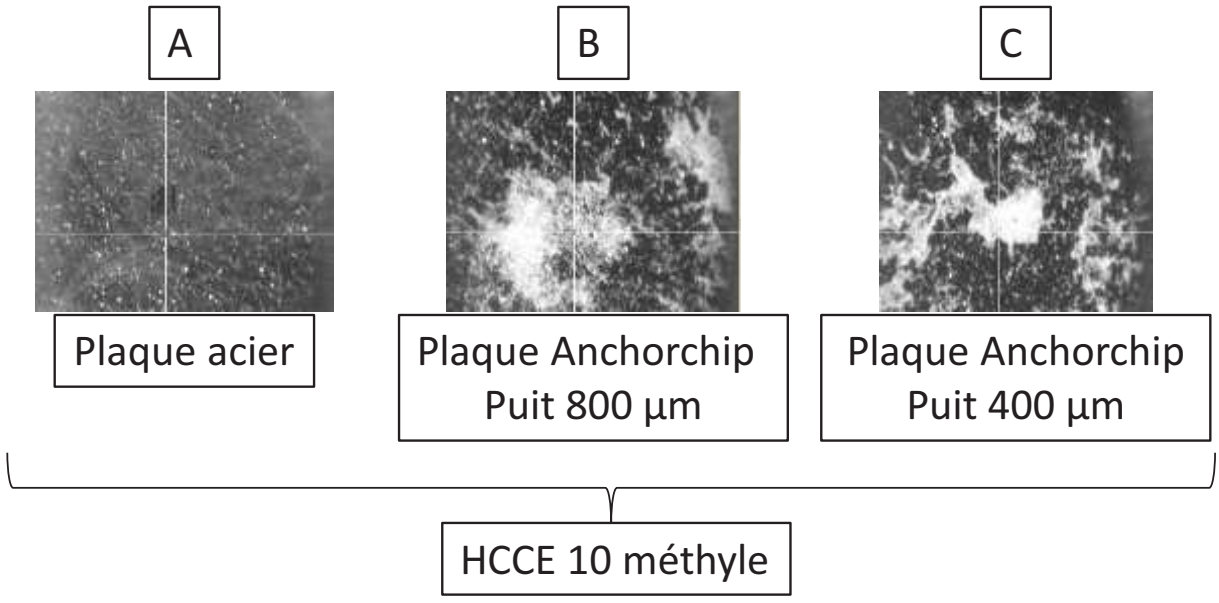


Figure 135 : Illustration de la variation de l'aspect des dépôts en fonction de la surface de la plaque et du diamètre du puit

Puis la taille de puit a été étudiée avec des puits de 800 et 400 µm (voir **B** et **C**, Figure 135 ci-dessus). Dans ce cas, les images ont montré un dépôt plus étalé du fait de la circonférence plus importante du puit mais avec une concentration de cristaux de matrice très satisfaisante. Les puits de 400 µm ont donc été retenus pour les études ultérieures.

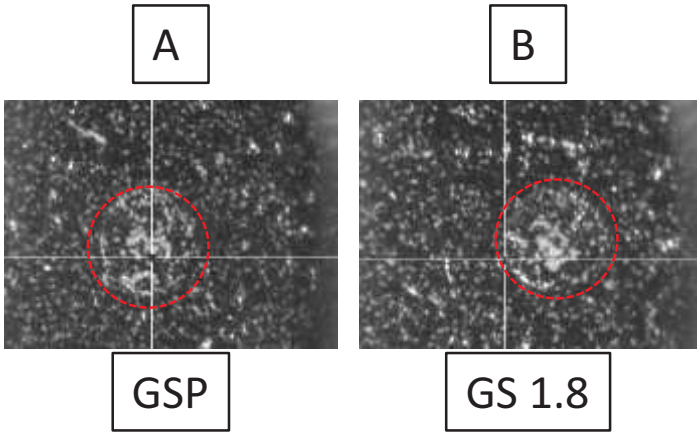


Figure 136 : Comparaison des dépôts MALDI entre les techniques GSP (A), GS 1.8 (B)

Dans un second temps, des dépôts ont été répétés selon le protocole GS 1.8 basé sur la goutte séchée. Cependant ceux-ci ont montré un dépôt cristallin relativement large autour du puit (cercles rouges, voir Figure 136 ci-dessus), autant qu'avec la technique GSP mais présentant en outre une mauvaise cocristallisation des composés (analyte/étalon deutéré/matrice) et une concentration importante de matrice ayant pour conséquence la non détection d'un des composés.

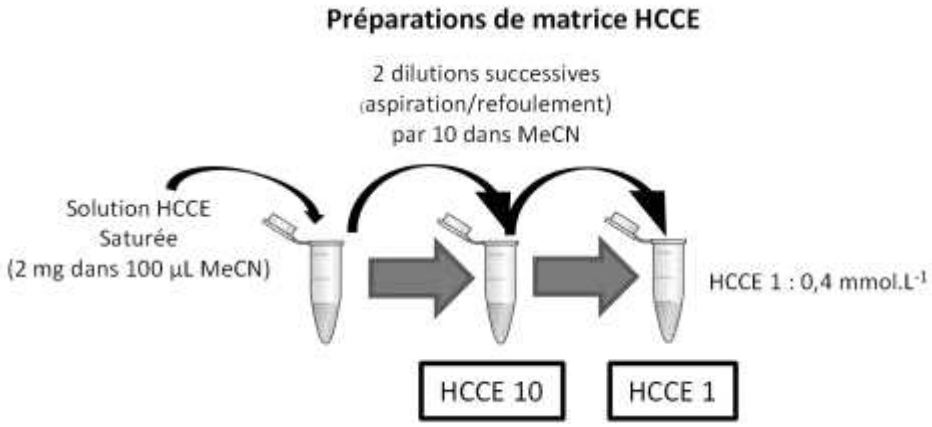


Figure 137 : Principe de la préparation de solution de matrice à 10 % (HCCE 10) et 1 % (HCCE 1) de la concentration de saturation

Suite à cela plusieurs préparations de matrice ont été effectuées (voir Figure 137 ci-dessus) et deux ont été retenues pour la suite du travail d'optimisation : HCCE 10 et HCCE 1 ; la première correspond à une dilution par 10 d'une solution saturée de matrice HCCE méthyle ([HCCE (10)] = 4,5 $mmol.L^{-1}$) et la seconde correspondant à une dilution par 100 ([HCCE (10] = 0,5 $mmol.L^{-1}$). L'ester

méthylique de l'HCCA n'a pas été la seule matrice à avoir été testée, l'ester éthylique à 10 % en concentration du niveau de saturation dans l'acétonitrile a été testé. Les résultats ont montré un net désavantage de ce dernier qui ne permettait plus de détecter les analytes alors que l'ester méthylique rendait la détection possible. L'aspect principalement mis en cause est la cristallisation particulièrement différente de cet ester éthylique qui suffit, d'après les expérimentations menées, à modifier singulièrement la capacité des molécules à être détectées (voir Figure 138 ci-dessous). En outre, les dépôts effectués avec HCCE 10 ont montré systématiquement une très forte concentration de matrice (voir Figure 138 ci-dessous) qui nuit fortement à la possibilité de détecter les ions de peptide qui ont été observés une fois la concentration de matrice divisée par 10 pour arriver à la préparation HCCE 1. Une fois encore, la cristallisation diffère fortement en se concentrant sur le puit avec quelques points hors du puit dont l'importance sera discutée au paragraphe V.B.1 p.259. Cette préparation de matrice a par la suite été retenue et a permis d'obtenir des résultats très satisfaisant.

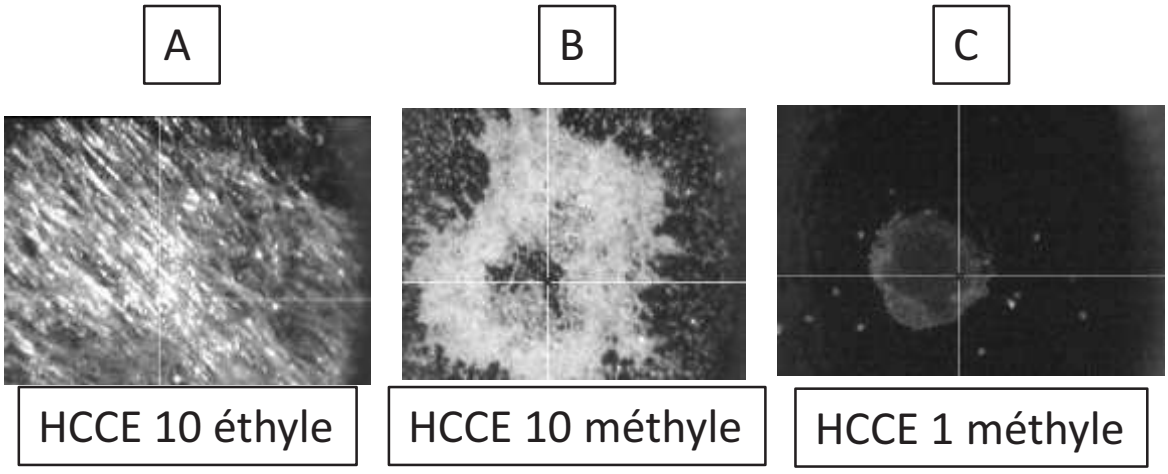


Figure 138 : Comparaison des dépôts MALDI entre deux esters de l'HCCA (éthylique en A et méthylique en B) à 10 % de la concentration de saturation (HCCE 10) et entre deux concentration de l'ester méthylique de l'HCCA (à 10 % de la concentration de saturation en B et 1 % de celle-ci en C)

Partant de la technique GSP et de la matrice HCCE 1, des essais ont été effectués et ont montré une bien meilleure cristallisation avec la technique GSP-M1/2 (voir Figure 139 ci-dessous) avec un dépôt plus homogène et présentant moins de points de cristallisation au centre du puit. Ces derniers sont alors plutôt situés à la périphérie du dépôt ou à l'extérieur permettant l'obtention d'un signal de meilleure qualité, comme il en sera question plus en détail au paragraphe V.B.1 p.259.

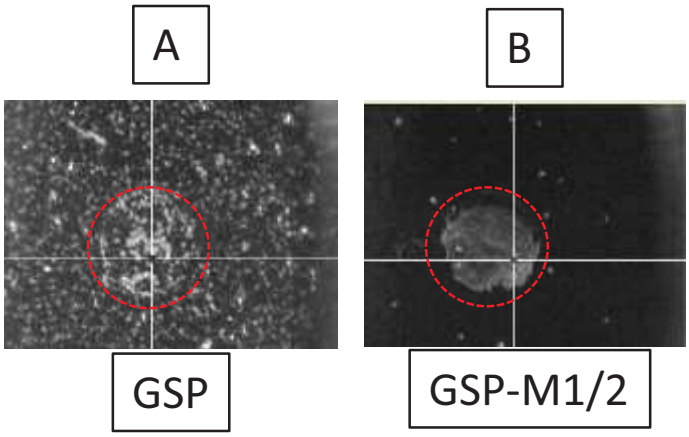


Figure 139 : Comparaison des dépôts MALDI entre les techniques GSP (A), GSP M1/2 (B)

A partir de cet instant la comparaison des spectres s'imposait et cela a amené aux résultats présentés par la Figure 140 ci-dessous. Il a été possible, avec un étalon deutéré introduit à 5.10^{-9} $mol.L^{-1}$ de détecter et quantifier le peptide MR 6-D_0 à une concentration introduite de 5.10^{-10} $mol.L^{-1}$ grâce à la technique GSP-M1/2 contrairement à la technique GSP. C'est la raison pour laquelle ce protocole de dépôt a été retenu pour les études ultérieures et les expérimentations en pharmacologie.

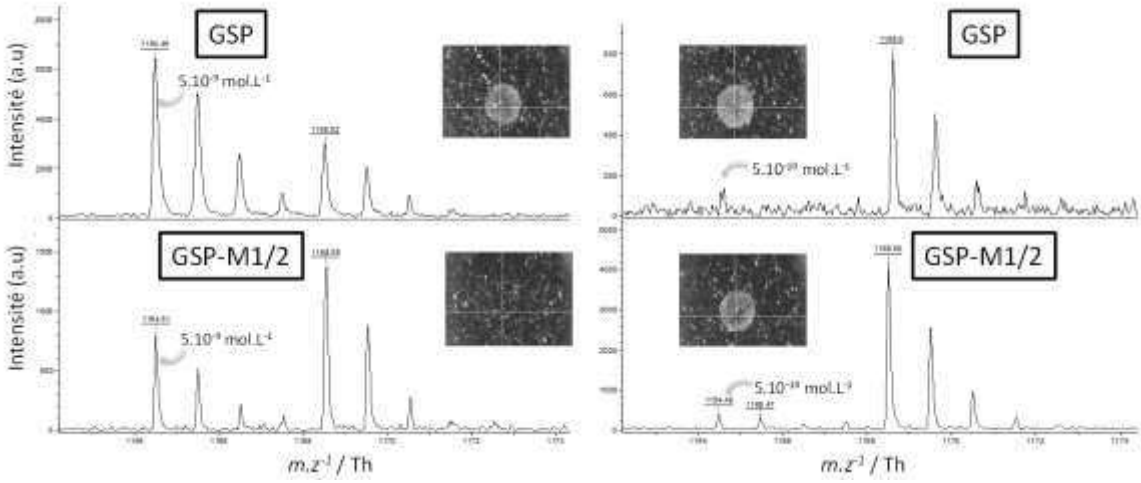


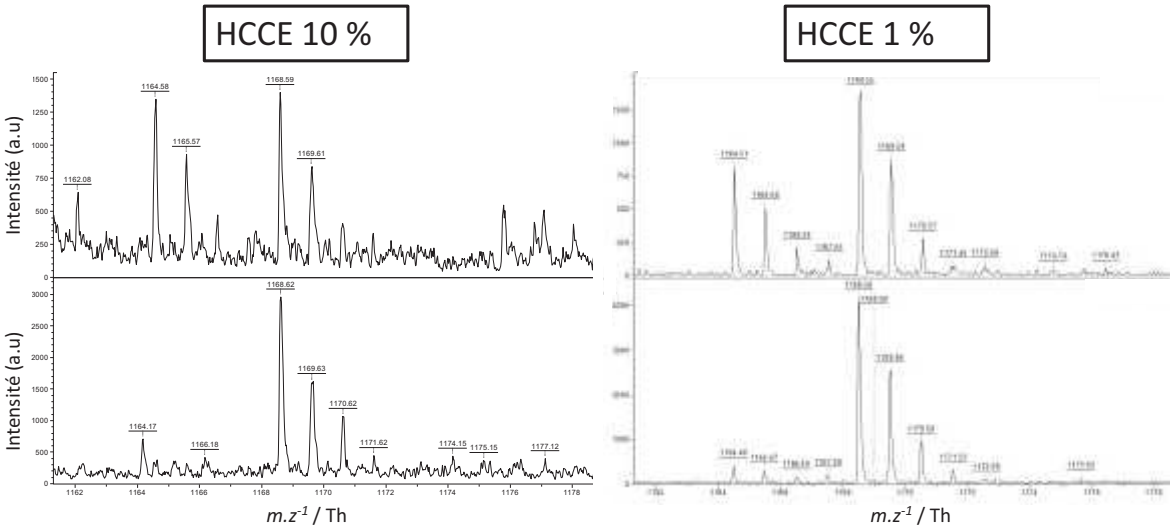
Figure 140 : Comparaison entre deux séries de deux spectres avec technique de dépôt GSP et GSP-M1/2 pour une concentration en étalon identique pour les 4 spectres. L'information principale à retenir est la possibilité de détecter et de quantifier l'analyte en utilisant la technique GSP-M1/2

Pour conclure ce paragraphe, les conditions optimales de préparation d'échantillons impliquent une technique de dépôt de type GSP-M1/2 pour la quantification, une préparation de matrice de type HCCE 1 dans l'acétonitrile et une plaque anchorchip avec des puits de 400 µm.

V.B. Etude sur les dépôts

V.B.1. Discussion à propos de l'épaisseur de matrice

L'optimisation de la détection/quantification des peptides marqués d'intérêt est passée par des essais autour des concentrations de matrice déposées. Celles-ci ont eu un impact très important sur la qualité des spectres obtenus comme en atteste le tableau (voir Figure 141 ci-dessous) qui permet la comparaison entre les différentes concentrations de matrice HCCE utilisées avec des concentrations décroissantes d'analyte (MR 6-D_0).



	MR7-D_0	m/z (Th)	S/N	Aire
	5.10^{-9} mol.L^{-1}	1 164,6	8,1	156
		1 168,6	8,4	203
	5.10^{-10} mol.L^{-1}	1 164,6	5	76
		1 168,6	22	475

	MR7-D_0	m/z (Th)	S/N	Aire
	5.10^{-9} mol.L^{-1}	1 164,6	44	84
		1 168,6	74	159
	5.10^{-10} mol.L^{-1}	1 164,6	8	36
		1 168,6	88	483

Figure 141 : Illustration de l'impact de la concentration de matrice sur la qualité de l'analyse MALDI avec un étalon deutéré introduit à 5.10^{-9} mol.L^{-1}

Cette figure permet d'illustrer cet aspect en mettant en relation direct l'image du dépôt et le spectre associé qui apporte une seconde preuve de l'importance de l'épaisseur de la couche de matrice. En effet, l'enduction de la plaque AnchorChip avec un revêtement particulier (voir Figure 143 ci-dessous) implique un angle de contact entre la goutte déposée et la plaque plus petit et donc, au fur et à mesure du séchage, une concentration du contenu moléculaire au centre de la zone de dépôt dans le puit. Il se passe alors un phénomène particulier à l'intérieur même de la goutte déposée : l'advection.[565]

[565] A. Ressine, D. Finnskog, G. Marko-Varga, T. Laurell, *NanoBiotechnology* **2008**, *4*, 18–27

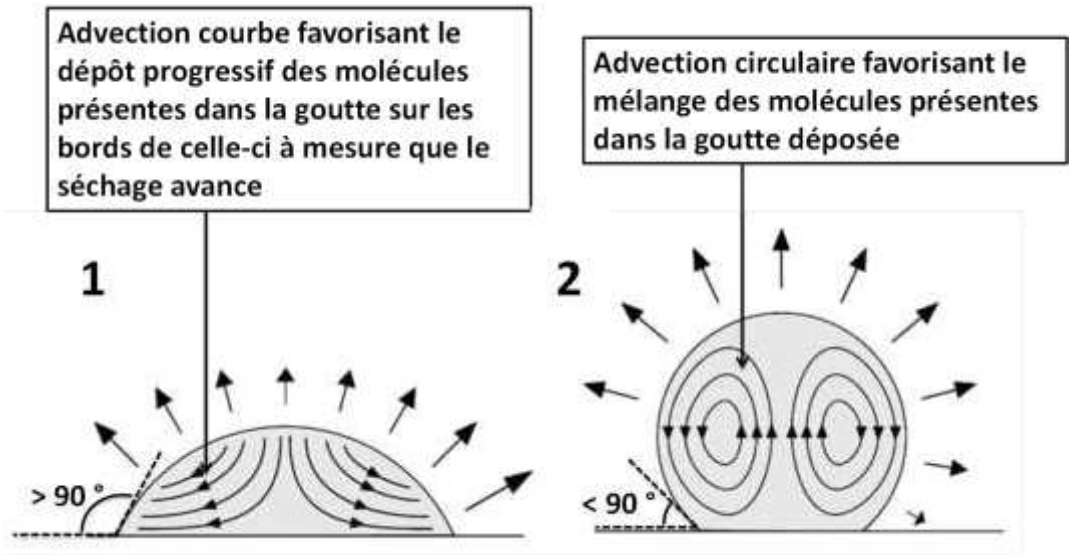


Figure 142 : Illustration de l'advection à l'œuvre lors du séchage d'une goutte sur plaque en acier à fort angle de contact (1) et sur une plaque de type anchorchip à faible angle de contact (2) qui entraîne une concentration du dépôt et une couche de matrice plus épaisse à concentration équivalente

C'est un mouvement, à la manière des courants d'air ascendants puis descendants, au sein de la goutte dû à un gradient de température entre la plaque métallique de conductivité thermique beaucoup plus importante que l'air ambiant. Ce qui permet un mélange continu de la solution à mesure que le séchage avance tout en maintenant une dynamique moléculaire qui favorisera l'incorporation des analytes dans les cristaux de matrice (voir Figure 142 ci-dessus).

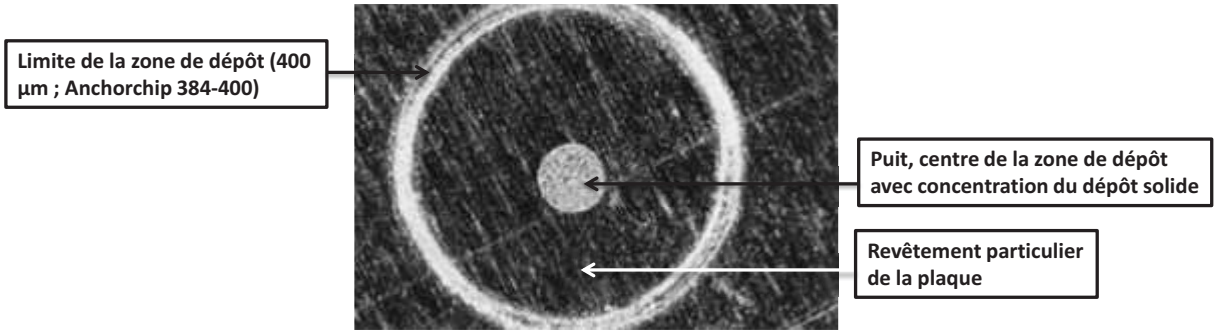


Figure 143 : Aspect du revêtement de la plaque Anchorchip et d'un dépôt de matrice HCCA

Cela entraîne donc une concentration de la matrice qui donnera une couche plus épaisse que sur une plaque en acier plus classique. Cela a permis pour les différentes gammes préparées la détection du peptide d'intérêt (MR 6-D_0) à des concentrations plus basses lorsque la matrice était moins concentrée et donc la couche moins épaisse. On peut mettre en relation ces observations expérimentales avec celles obtenues par le Dr. Knochenmuss dans son article de 2006.[566] Ce dernier a observé des comportements similaires avec un dépôt de la couche de matrice par électrospray sur une plaque en acier.

[566] R. Knochenmuss, *The Analyst* **2006**, *131*, 966

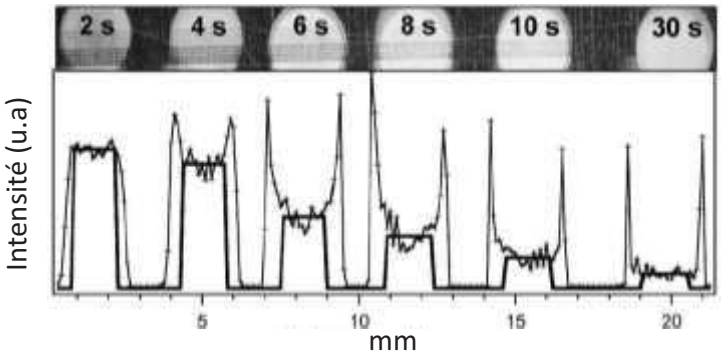


Figure 144 : Illustration de l'effet photoélectrique sur les bords de dépôts de plus en plus épais (de gauche à droite) obtenus par la technique de l'électrospray pour différents temps de dépôt (2, 4 …. 30 s), de l'effet de bord et de l'impact de l'épaisseur de la couche de matrice

Les constats fait au cours de ces travaux de thèse ainsi que ceux émit par ce dernier sont directement liés à l'effet photoélectrique qui a été décrit théoriquement et dont une preuve expérimentale est apportée ici. En effet, non seulement l'épaisseur des couches le prouve mais également l'obtention de spectres avec une très bonne résolution sur des dépôts dont la couche de matrice semble épaisse avec des impulsions laser effectuées aux bords de ces épais dépôts. Ces résultats peuvent être directement mis en relation avec les observations du Dr. Knochenmuss obtenus et publiés dans cette étude de 2006 avec des signaux intenses et bien définis aux bords des dépôts dont la couche de matrice est la plus épaisse (voir Figure 144 ci-dessus) grâce à cet effet photoélectrique.

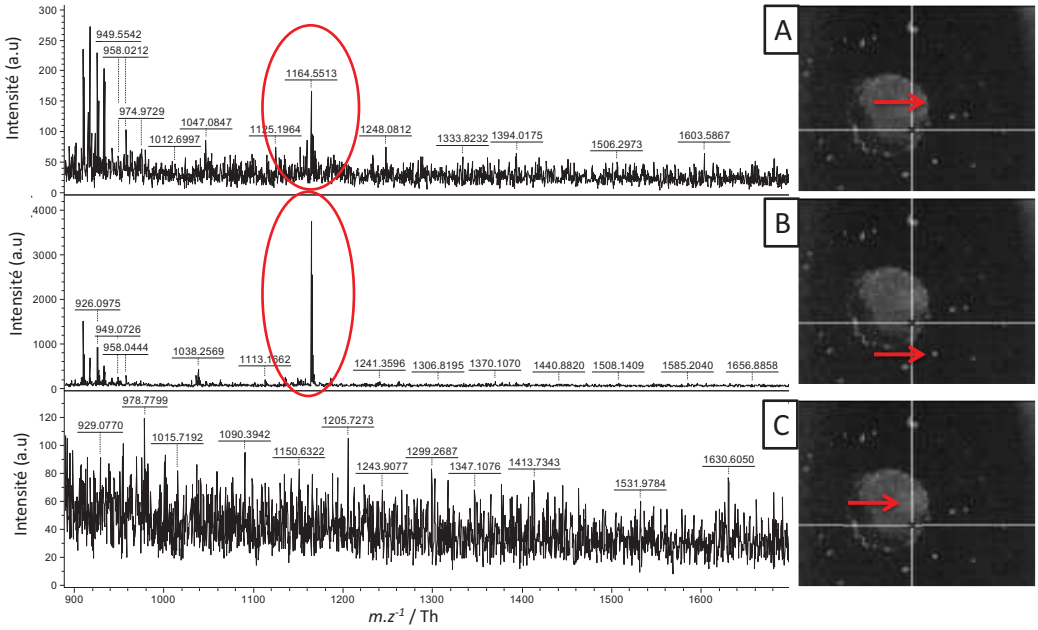
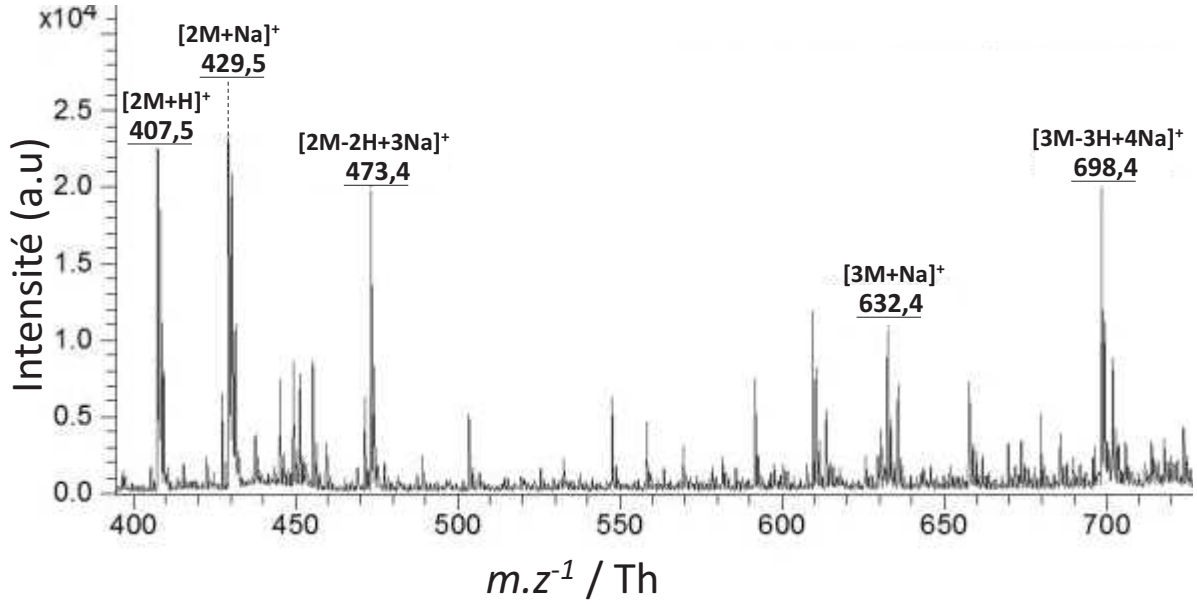


Figure 145 : Illustration de l'effet photoélectrique pour un dépôt de peptide MR 6-D_0 dans la matrice HCCE. Une série de 100 tirs laser a été effectuée à trois localisations différentes du dépôt : au bord du puis (A), sur un petit cristal extérieur au puit (B) et à l'intérieur du puit (C). Les résultats obtenus montrent clairement l'intérêt d'aller chercher des ions aux abords et à l'extérieur des puits grâce à l'effet photoélectrique qui permet d'améliorer l'ionisation des analytes

Grâce à cet effet, il y a tout intérêt à viser les bords des zones de dépôt ou tout simplement toute zone qui paraîtrait fine. Dans le cadre de la Figure 145 ci-dessus, non seulement une preuve supplémentaire de l'effet photoélectrique est apporté, mais en plus ce dernier se produit directement sur le peptide grâce à la liaison covalente de l'HCCA, la molécule qui absorbe l'énergie du laser en temps normal lorsque celle-ci est utilisée en tant que matrice et qui est, en l'occurrence, directement liée au peptide. Donc l'ionisation de l'HCCA signifie l'ionisation du peptide et il n'y a alors plus besoin d'ioniser une matrice puis de transférer l'énergie à un analyte compte-tenu du fait que les deux sont déjà liés de manière covalente.

V.B.2. Observation des clusters de matrice

Les nombreux dépôts effectués pour optimiser leurs conditions de préparation ont permis d'observer des clusters de la matrice HCCE méthyle lors des études basées sur celle-ci. Plusieurs clusters ont ainsi pu être observés sous forme protonée ou cationisée par des ions sodium (voir Spectre 12 ci-dessous).



Spectre 12 : Observation d'adduits de matrice HCCE après dépôt sur plaque Anchorchip

Tous ces clusters sont formés à partir de la matrice HCCE méthyle qui ne possède pas, contrairement à la matrice HCCA de fonction acide carboxylique. Il est alors intéressant de proposer des structures pour ces clusters basées sur des interactions coulombiennes entre un proton et les molécules de matrice ou bien entre les cations sodium et les molécules de matrice. En ce qui concerne le cluster [2M-2H+3Na]+, il est même possible d'imaginer une stabilisation des molécules de matrice par des molécules d'eau qui ne se seraient pas évaporées (voir Figure 146 ci-dessous)

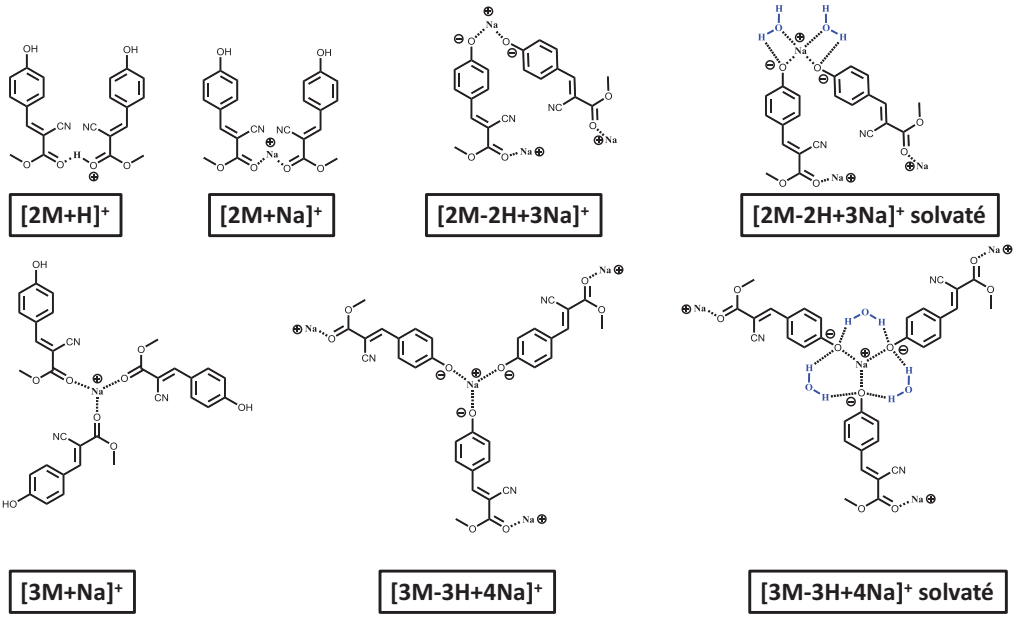


Figure 146 : Propositions de structure pour les ions de matrice observés

Il est alors possible d'imaginer que ces clusters peuvent inclure, surtout pour ceux présentant des matrices en défaut de proton, des peptides protonés. Cette hypothèse va dans le sens du modèle des clusters et des « lucky survivor » du Pr. Karas en ce sens que les analytes sont déjà protonés une fois le dépôt séché. Il est aussi possible d'imaginer des clusters de matrice partiellement solvatés par des molécules d'eau qui pourraient à leur tour stabiliser les molécules de peptide chargés ou non (voir Figure 147 ci-dessous).

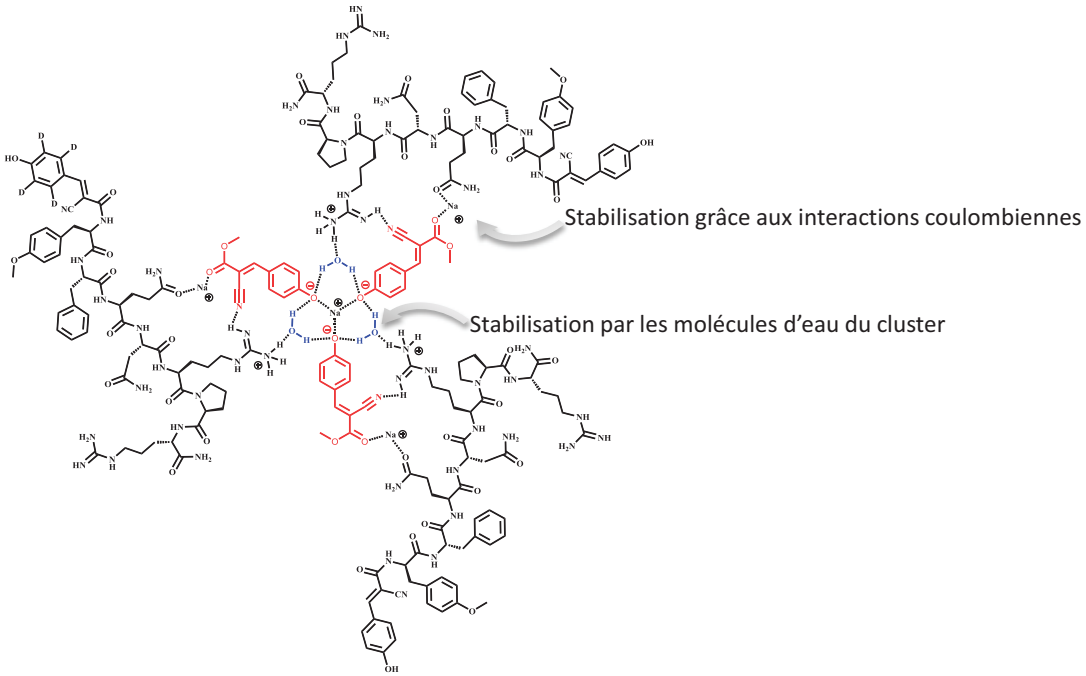
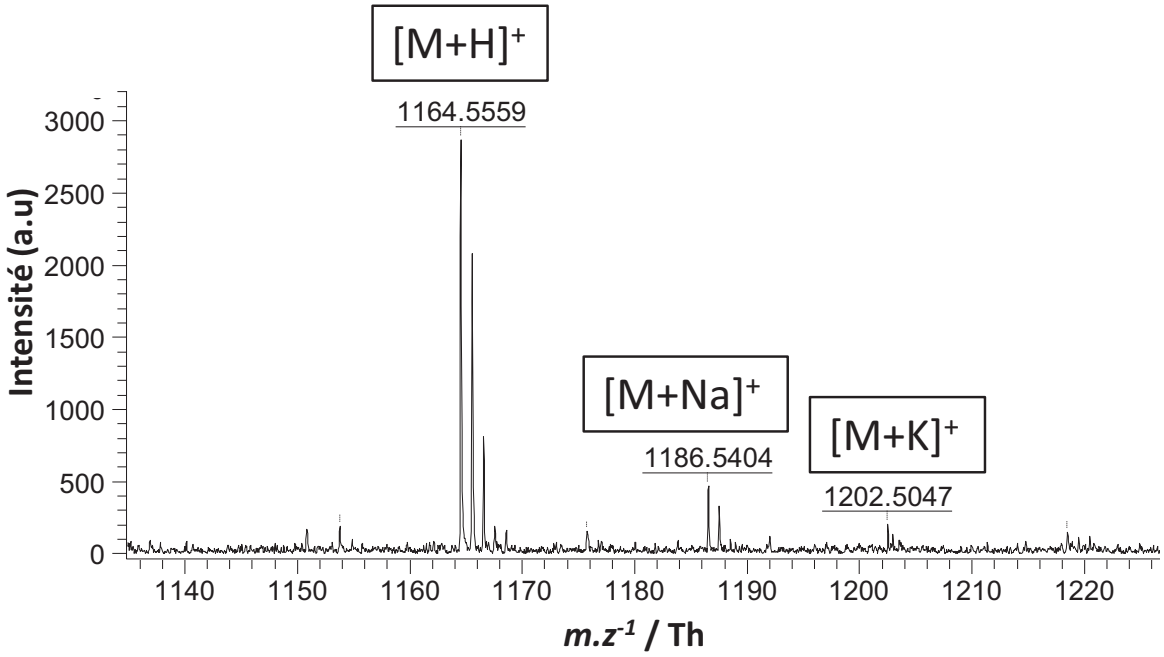


Figure 147 : Proposition de représentation de cluster de matrice avec des molécules de peptides cocristallisées et des molécules d'eau qui vont stabiliser l'architecture moléculaire complexe via des interactions hydrogènes et coulombiennes avec des cations sodium

V.C. Etude de la détection des différents peptides utilisés : MR 4-AVP, MR 5-Homo-HO-LVA et MR 6-D_0

V.C.1. Discussion des résultats concernant la détection avec la matrice HCCE

Les expériences de détections ont pu être réalisées suite à l'optimisation des conditions de dépôt tant sur le plan de la préparation des solutions que de la technique sans oublier les conditions environnementales. Cela a permis de déterminer des limites de détection basées sur la dernière concentration à laquelle un peptide donné produisait un signal visible sur un spectre de masse après avoir joué sur la fluence laser. Dans le cas du peptide MR 6-D_0, il a été possible de le détecter jusqu'à une concentration déposée de 5.10^{-13} $mol.L^{-1}$ (voir Spectre 13 ci-dessous) ce qui correspond à 0,5 amol déposées avec une préparation de matrice HCCE. En outre, des adduits sodés et potassés ont également été détectés avec une bonne résolution.



Spectre 13 : Illustration de la limite de détection du peptide MR 6-D_0 à environ 5.10^{-13} $mol.L^{-1}$ ou 0,5 amol déposés dans la matrice HCCE méthyle, analyse répétée 3 fois

En revanche, pour arriver à ce niveau de détection il a fallu faire varier et notamment augmenter la fluence laser de 38 à 48 %. Cela pourrait illustrer le passage d'un processus de désorption/ionisation à un processus d'ablation/ionisation. En effet, d'après les études du Dr. Knochenmuss (voir Partie A – ***Contexte Bibliographique***, chapitre 3, paragraphe I.B.2 p.142) la différence du régime d'ablation provient de la création d'une onde pneumatique de rebond qui va ablater des fragments entiers de particules solides hors du dépôt avant que ne s'enclenche le processus d'ionisation des analytes. Les fragments de particules solides permettraient alors une meilleure ionisation des analytes grâce à l'éjection d'un grand nombre d'entre eux et donc la formation d'une plus grande quantité d'ions contrairement au régime de désorption au cours duquel

seule la couche superficielle du dépôt pourrait former des ions. Dans le cadre de la Figure 148 ci-dessous, le passage de 38 à 48 % permet de rationaliser, grâce à cet aspect de l'ionisation MALDI, la détection du peptide MR 6-D_0 jusqu'à des concentrations extrêmement faibles grâce à ce processus d'ablation et de formation de quantités plus importantes d'ions.

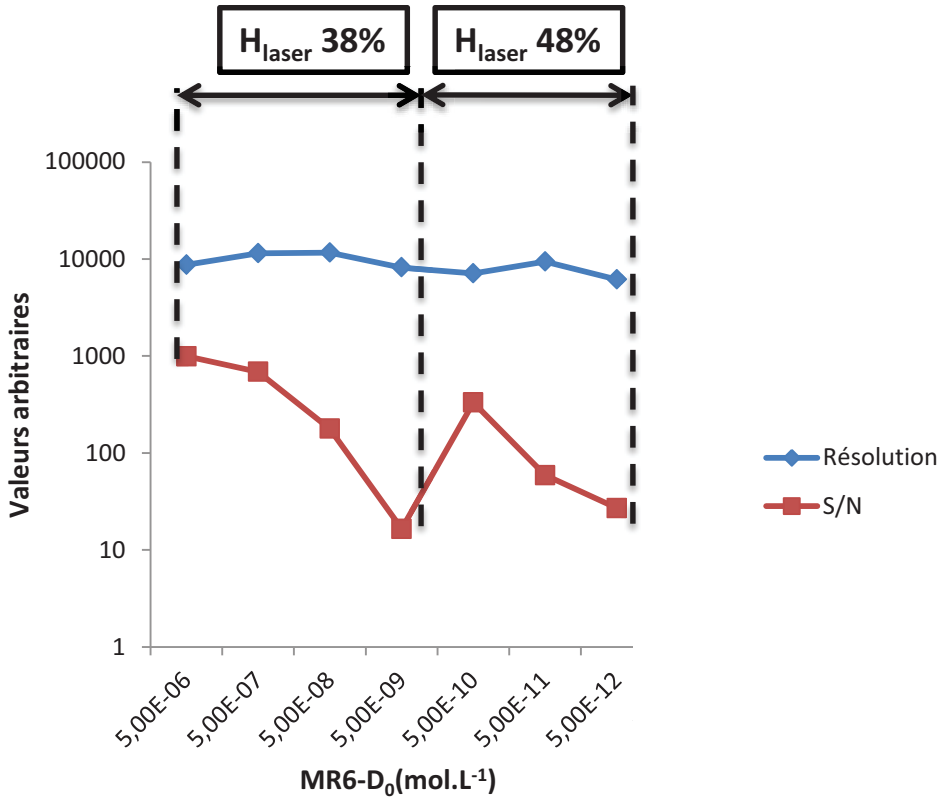


Figure 148 : Evolution du rapport S/N et de la résolution du pic A_1 du massif isotopique du peptide MR 6-D_0 en fonction la concentration déposée et de la fluence (H_{laser}) utilisée

En ce qui concerne le peptide MR 5(Homo-HO-LVA), celui-ci ne comportant pas de motif HCCA, il est intéressant de constater que sa limite de détection en présence de matrice HCCE est bien supérieure à celle de MR 6-D_0 et déterminée à 5.10^{-9} $mol.L^{-1}$ (voir Figure 149 ci-dessous), soit 4 logs de moins. Cela signifie donc que le marquage HCCA améliorerait, dans le cas de cette séquence peptidique modèle (MR 7) de 4 ordres de grandeur la sensibilité en détection. Il est alors logique de se poser la question de l'ionisation de ces deux peptides en mélange. Cela sera l'objet du paragraphe suivant p.267.

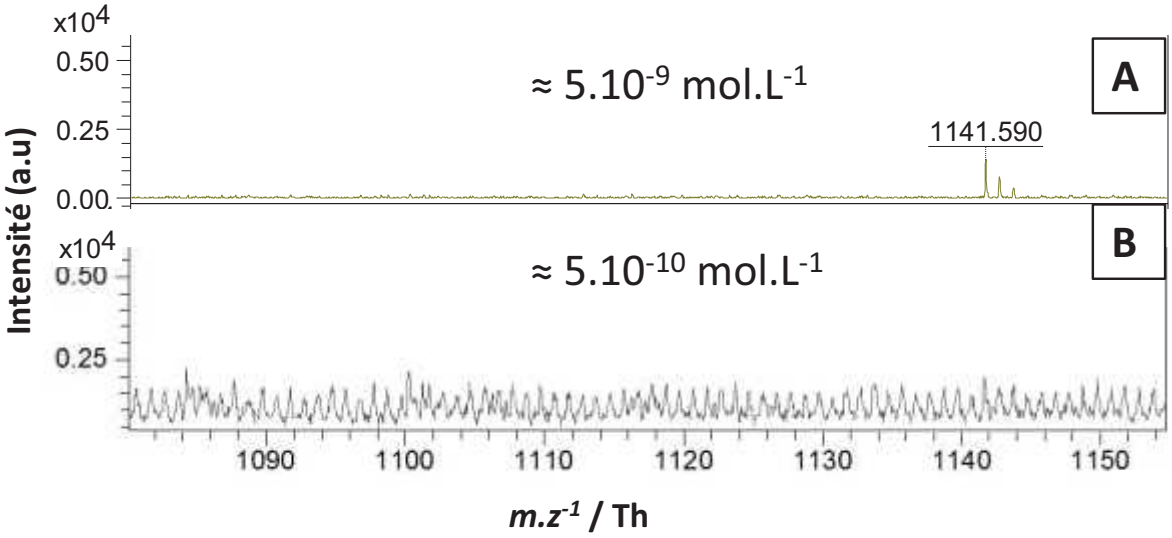


Figure 149 : Illustration de la limite de détection du peptide MR 5 (Homo-HO-LVA) jusqu'à 5.10^{-9} mol.L^{-1} dans la matrice HCCE méthyle

Les mêmes analyses de limite de détection ont été entreprises sur le peptide MR 4(AVP) qui lui, ne comporte pas de marquage HCCA ni même de motif dont la structure s'en rapprocherait. Dans ce cas, le peptide a pu être détectée jusqu'à une concentration de 5.10^{-8} mol.L^{-1} (voir Figure 150 ci-dessous), soit une différence de 5 ordres de grandeur par rapport au peptide MR 6-D_0 et d'un ordre de grandeur par rapport au peptide MR 5.

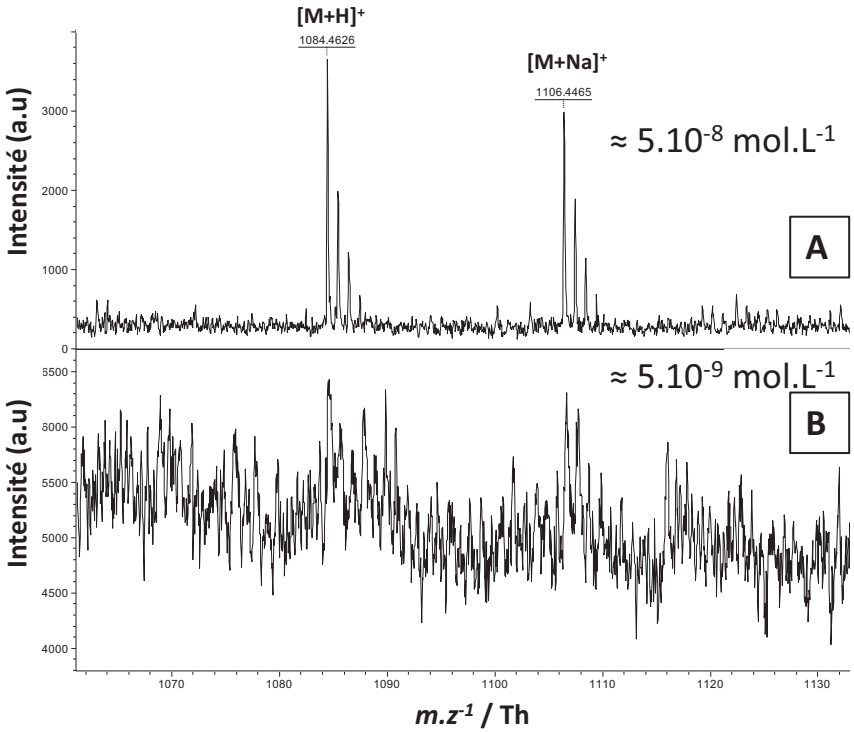


Figure 150 : Illustration de la limite de détection du peptide MR 4 (AVP) jusqu'à 5.10^{-8} mol.L^{-1} dans la matrice HCCE méthyle

En conclusion de ce paragraphe, il a été montré et confirmé que le peptide MR 6-D_0 est détectable jusqu'à des concentrations de 5.10^{-13} $mol.L^{-1}$ avec une amélioration de la sensibilité atteignant 5 ordres de grandeurs par rapport à un peptide ne comportant aucun structure chimique similaire à l'HCCA et de 4 ordres de grandeurs par rapport à un peptide comportant un motif similaire à l'HCCA et le substituant.

V.C.2. Etude sur la détection des peptides MR 6-D_0 et du MR 5-Homo-HO-LVA et MR 7 codéposés

Les motifs en position N-terminale des peptides MR 6-D_0 et MR 5 étant relativement proches en termes de structure, il est logique de se poser la question d'une compétition à l'ionisation entre ces deux peptides. Le meilleur moyen de statuer sur la question est alors de réaliser un mélange de ces deux molécules et de les soumettre à une ionisation par laser.

Ces expériences ont été répétées 6 fois au total en mettant en mélange les deux peptides précédemment cités ainsi que le peptide modèle MR 7 qui ne comporte aucun groupement sur sa position N-terminale. Le protocole optimisé précédemment a été suivi et a permis d'obtenir les résultats illustrés par la Figure 151 ci-dessous. Il a ainsi été démontré qu'à une concentration de 5.10^{-9} $mol.L^{-1}$ les trois peptides précédemment cités étaient tous détectés sans problèmes et qu'à partir de 5.10^{-10} $mol.L^{-1}$ seul le peptide portant le motif HCCA sur sa position N-terminale était toujours détecté.

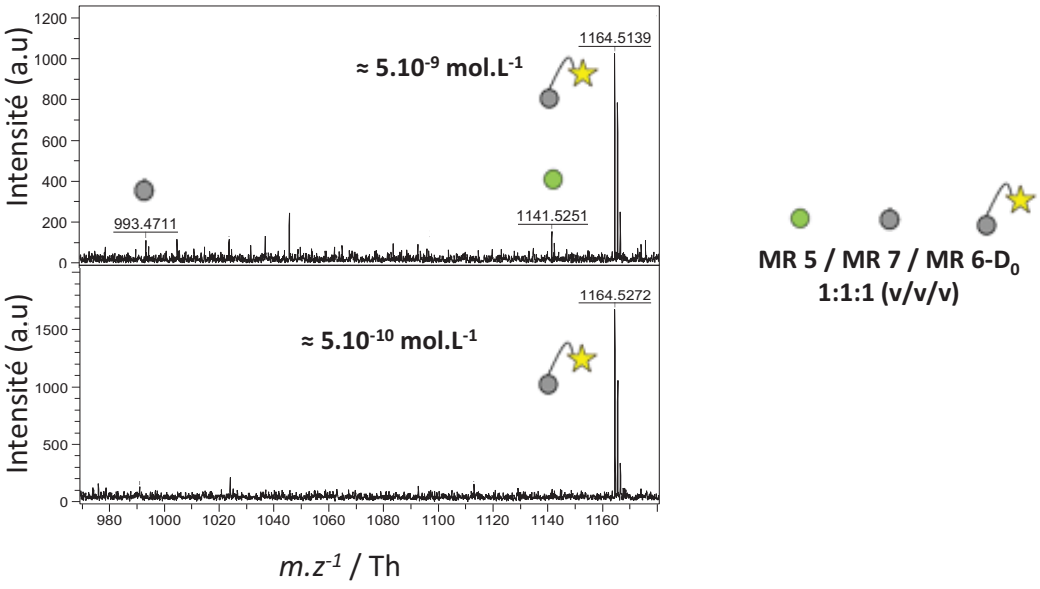


Figure 151 : Mélange équimolaire MR 5-Homo-HO-LVA /MR 6-D_0/MR 7

En conclusion de ce paragraphe, une preuve du caractère discriminant de la matrice HCCE méthyle avait été apportée en comparant la limite de détection du peptide MR 5 (Homo-HO-LVA)

dans celle-ci avec la limite de détection du MR 6-D_0 dans les mêmes conditions. Cette discussion démontre, grâce à l'analyse en mélange des deux peptides, le caractère discriminant de la matrice HCCE méthyle entre des peptides portant un marquage HCCA, analogue à celui-ci ou sans aucun marquage.

V.C.3. Comparaison des limites de détection

La matrice HCCE méthyle n'a pas été la seule à avoir été utilisée pour déterminer les limites de détection des différents peptides synthétisés au cours de cette thèse. Des expériences similaires ont été entreprises en utilisant l'HCCA. Les résultats présentés dans le Tableau 36 ci-dessous montrent que l'on obtient systématiquement une amélioration de la sensibilité en détection de 1 à 3 ordres de grandeur, mis à part le peptide MR 5 qui ne semble pas voir sa limite de détection évoluer.

Matrice utilisée	Solution d'analyte	Peptide	LoD (mol.L^{-1})	Méthode de dépôt	$H_{(LASER)}$ %
HCCA	H_2O + 1 % TFA	MR 4- AVP	5.10^{-10}	GSP	58
		MR 5– Homo-HO-LVA	**5.10^{-9} - 5.10^{-10}**		48
		MR 6-D_0	**5.10^{-9} - 5.10^{-10}**		48
		MR 9-D_0	5.10^{-9}		58
HCCE 1	H_2O + 1 % TFA	MR 4- AVP	5.10^{-8}	GSP	58
		MR 5– Homo-HO-LVA	**5.10^{-9}**		48
		MR 6-D_0	**5.10^{-13}**		48
		EMC-09	5.10^{-8}		58
		MR 7- Peptide modèle	**5.10^{-9}**		50
		MR 9-D_0	5.10^{-11} - 5.10^{-12}		58

Tableau 36 : Synthèse des limites de détection déterminées pour les différents peptides mis en jeu dans les expériences de liaison de saturation et de compétition sur préparation membranaire. Le peptide EMC-09 est un analogue du MR 5 avec un atome de sélénium en position benzylique

Il est intéressant de noter, d'après un article publié en 2016 que des résultats similaires ont été obtenus dans le cas de détection de protéines avec la matrice HCCE alkylée.[567] Cette dernière a permis d'obtenir des limites de détection quasi systématiquement, sinon identiques dans deux cas sur quatorze, plus basses d'un ordre de grandeur par rapport à toutes les matrices testées et usuellement utilisées comme l'HCCA, l'AS et le DHB. Dans cet article il est également question de la tolérance face aux sels et aux contaminants provenant des échantillons biologiques.

[567] S. Wang, Z. Xiao, C. Xiao, H. Wang, B. Wang, Y. Li, X. Chen, X. Guo, *Journal of The American Society for Mass Spectrometry* **2016**, *27*, 709–718

En effet, par leur fonction ester, les matrices HCCE testées ne formeraient moins de liaisons, dont certaines ioniques via la fonction carboxylate absente, avec les contaminants ioniques et biologiques en entrant moins en interaction avec ces derniers et présentant une bien moindre affinité avec eux grâce à leur caractère résolument plus hydrophobe. Cela rendrait la matrice plus prompte à former des clusters avec les peptides qui affichent une hydrophobicité bien plus grande que des sels de tampon par exemple. Cela entraînerait donc une bien meilleure efficacité d'ionisation au sein de clusters neutres suivant le modèle d'ionisation CPCMD du Dr. Knochenmuss ainsi qu'au sein de clusters comprenant des molécules chargées et suivant le modèle du Pr. Karas.

VI. Etudes autour du processus de manipulation de l'échantillon

Dans ce paragraphe nous allons nous concentrer sur des aspects extrinsèques au dépôt qui concernent plus particulièrement le comportement de l'échantillon analysé face à l'ionisation.

VI.A. Comportement du MR 6-D_0 face à des composés en mélange et étude d'interférences en conditions de quantification avec la matrice HCCE

VI.A.1. Evaluation de l'impact de l'ajout d'un compétiteur vis-à-vis de la quantification du peptide d'intérêt

Le protocole utilisé consiste à effectuer des mesures sur 2 gammes de concentrations en peptide MR 6-D_0 élargies (i.e : entre 10^{-7} et 10^{-11} mol.L^{-1}) de 5 points pour un total de 10 dépôts sans rajout du compétiteur d'une part, et sur 2 autres gammes préparées à partir des mêmes échantillons auxquelles est rajouté le compétiteur pour un total de 20 dépôts sur les deux séries (voir Figure 152 ci-dessous).

Les résultats montrent très clairement qu'aucune différence ne peut être raisonnablement identifiée entre les deux séries de gammes et qu'il n'y a donc aucune interférence à redouter qui serait liée à une interférence possible entre un compétiteur non marqué par le fragment HCCA (en l'occurrence le peptide MR 4) et le ligand traceur (le peptide MR 6-D_0 pour l'interaction et le peptide MR 6-D_4 pour la quantification).

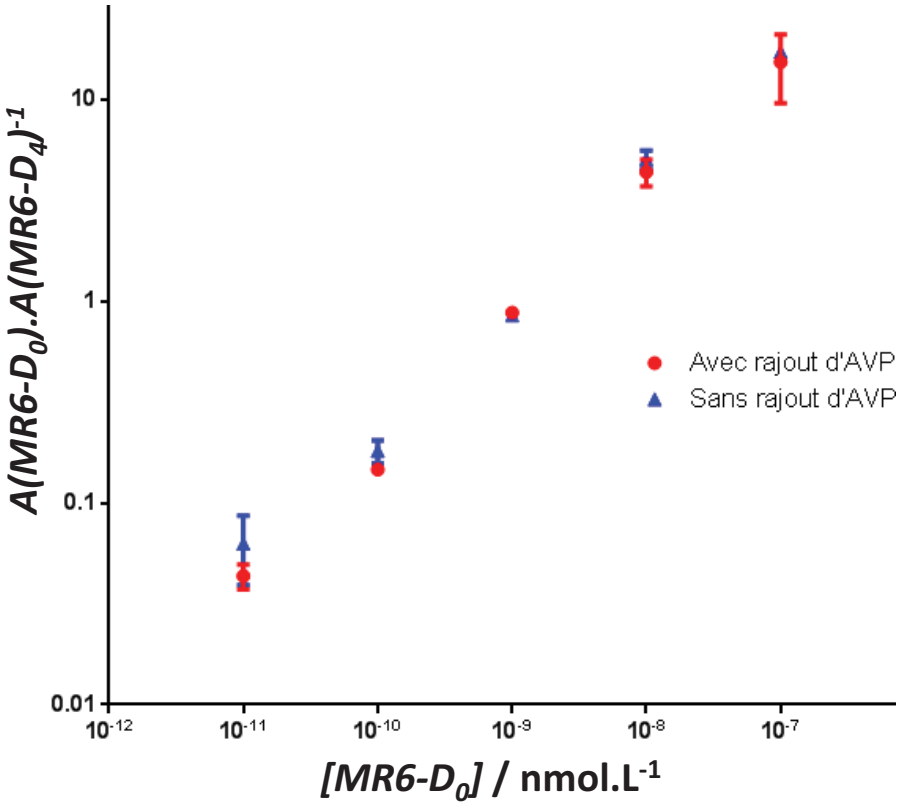


Figure 152 : Tracé d'une gamme étendue de mesure du peptide MR 6-D_0 avec ou sans ajout supplémentaire de peptide MR 4. Le résultat qui en ressort est une identité des deux gammes sans différence significative des mesures de concentration quelle que soit le cas considéré

En outre les moyennes des points de mesure obtenus dans la gamme de concentration visée par les expériences de pharmacologie ont subi une régression linéaire dans le but de chiffrer les pentes et les ordonnées à l'origine pour une comparaison plus fine (voir Figure 153 ci-dessous). Les résultats montrent dans les deux cas des coefficients de régression linéaire satisfaisants (r^2 = 0,998 et r^2 = 0,9882) ainsi que des pentes très proches de 0,4818 et 0,419 et des ordonnées à l'origine tout à fait comparables (0,2456 et 0,1959), démontrant l'absence de différence significative.

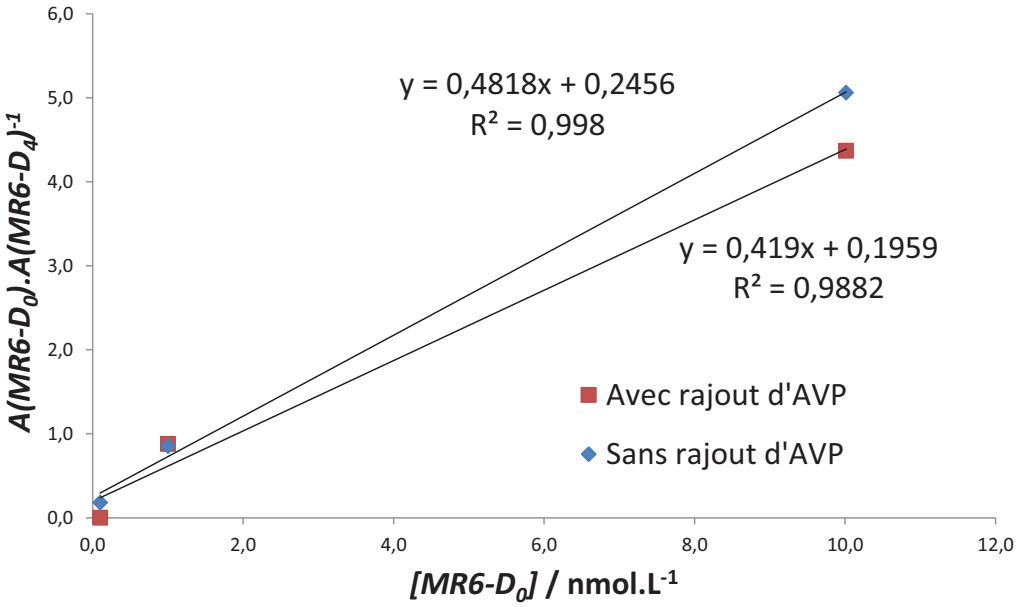


Figure 153 : Régression linéaire à partir des moyennes des points de mesure précédents sur une gamme de concentration restreinte (10^{-10} à 10^{-8} mol.L^{-1}) montrant la similitude entre les deux droites de régression

Ces expériences de test d'interférence ont également été effectués avec un second peptide ne portant pas de marquage HCCA mais possédant un marquage spécifiquement conçu pour une plate-forme analytique différente (EMC-09), l'objectif étant de démontrer ou non une interférence entre ce dernier et le peptide d'intérêt MR 6-D_0 dans l'optique d'un développement méthodologie vers du multiplexage combinant plusieurs plate-forme analytiques comme c'est le cas pour la technique IDBEST.

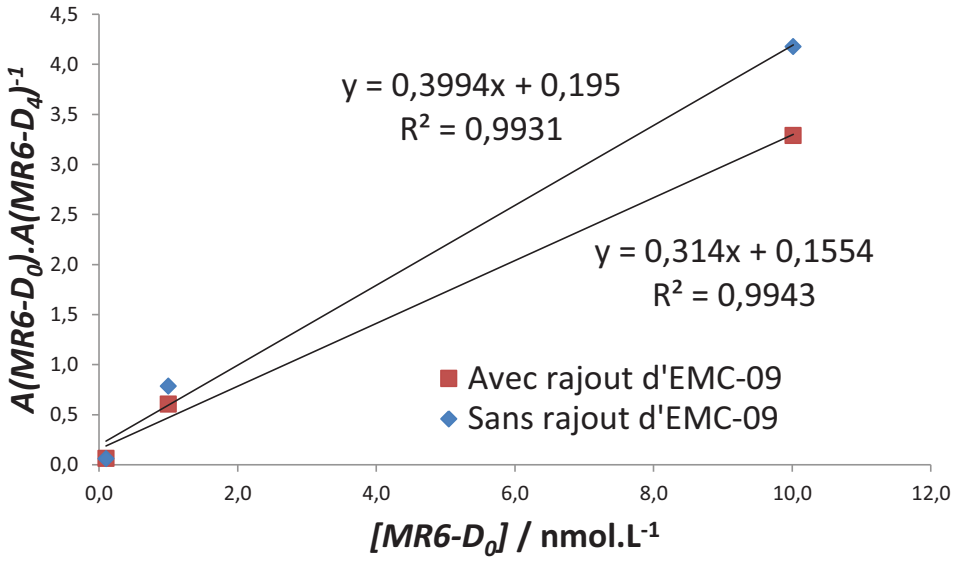


Figure 154 : Régression linéaire à partir des moyennes des points de mesure obtenus en substituant le rajout de peptide MR 4 par un autre peptide (EMC-09) conçu spécifiquement pour une autre plate-forme d'analyse sur une gamme de concentration restreinte (10^{-10} à 10^{-8} mol.L^{-1}) montrant la même similitude entre les deux droites de régression

Les résultats obtenus (voir Figure 154 ci-dessus) démontrent dans ce cas-ci également que les deux gammes, de coefficients de régression linéaires excellents (r^2 = 0,9931 et r^2 = 0,9943), ne présentent pas de différence significative tant au niveau de leur pentes (0,3994 comparée à 0,314) que de leur ordonnée à l'origine (0,195 comparée à 0,1554).

En conclusion de cette étude sur les interférences possibles, il a été démontré que malgré une première impression, une étude poussée du phénomène a permis de statuer sur l'absence d'interférences impactant de manière significative la quantification du peptide d'intérêt (MR 6-D_0) que ce soit en présence d'une molécule ne comportant aucun fragment analogue à l'HCCA (MR 4) ni un fragment spécifiquement conçu pour une autre plate-forme analytique.

VI.A.2. Etude du phénomène supposé d'interférences dans la matrice HCCA

Les expériences menées dans la matrice HCCE ont été appliquées à l'utilisation de la matrice HCCA dans l'optique de déterminer si oui ou non le phénomène existait dans cette matrice ou s'il s'agissait bien d'un artefact. Les trois peptides, analyte (MR 6-D_0)/étalon (MR 6-D_4)/compétiteur (MR 4) ont été mélangés à concentrations identiques (voir Tableau 37 ci-dessous). L'objectif était alors d'évaluer l'impact de l'ajout d'un compétiteur sur l'ionisation du peptide d'intérêt à un niveau de concentration donnée.

Entrée	MR 4 ($mol.L^{-1}$)	MR 6-D_0 ($mol.L^{-1}$)	MR 6-D_4 ($mol.L^{-1}$)	$[MR\ 4]_{moy}$ calculée ($nmol.L^{-1}$)	C.V	$[MR\ 6\text{-}D_0]_{moy}$ calculée ($nmol.L^{-1}$)	C.V	$[MR\ 6\text{-}D_0]_{moy}$ avec MR 4/ $[MR\ 6\text{-}D_0]_{moy}$ sans MR 4	C.V
1	-	10^{-5}	10^{-5}	-	-	**12 400**	**5 %**	66 %	4 %
2	-	10^{-6}	10^{-6}	-	-	**930**	**7 %**	132 %	21 %
3	-	10^{-7}	10^{-7}	-	-	**121**	**6 %**	103 %	27 %
4	-	10^{-8}	10^{-8}	-	-	**15**	**13 %**	176 %	3 %
5	-	10^{-9}	10^{-9}	-	-	**2**	**62 %**	81 %	64 %
6	10^{-5}	10^{-5}	10^{-5}	502	72 %	**8 220**	**5 %**		
7	10^{-6}	10^{-6}	10^{-6}	397	38 %	**1 210**	**13 %**		
8	10^{-7}	10^{-7}	10^{-7}	47	41 %	**124**	**21 %**		
9	10^{-8}	10^{-8}	10^{-8}	12	54 %	**27**	**14 %**		
10	10^{-9}	10^{-9}	10^{-9}	0,9	41 %	**1**	**4 %**		

Tableau 37 : Illustration de l'effet de suppression analyte-analyte entre le ligand traceur MR 6-D_0 et MR 4 déposés avec la matrice HCCA

La première information à noter d'après les résultats présentés dans le tableau ci-dessus est la précision de la quantification du peptide d'intérêt et le manque cruel de précision quant à la quantification de l'AVP. Cela démontre l'importance de posséder une structure aussi proche que

possible de la part d'un étalon utilisé pour de la quantification par MALDI-SID-MS. Le phénomène fondamental à mettre en avant dans ce cas est le processus d'ionisation (phase primaire et secondaire) au cours duquel la différence de structure, et potentiellement de réactivité, vont suffire à créer une différence significative pour que le résultat mesuré en soit affecté.

La seconde information à retenir est que l'impact supposé de l'ajout d'un compétiteur dans le mélange de quantification analyte/étalon n'est ni systématique (voir les deux dernières colonnes, entrées 1 et 4 Tableau 37 ci-dessus) ni constant (voir les deux dernières colonnes, entrées 1, 2, 3 et 4 Tableau 37 ci-dessus). Cette information implique donc une impossibilité de rationnaliser ce phénomène d'interférence dans la matrice HCCA puisqu'il semble bien exister lorsque la matrice HCCA est utilisée ; il serait alors plus juste du point de vue fondamental de parler de compétition à l'ionisation qui va varier en fonction des concentrations mises en jeu entre une molécule en interaction covalente avec le fragment HCCA (MR 6-D_0) et une seconde molécule en interaction non covalente avec la matrice (MR 4).

VI.B. Etude sur le conditionnement de l'échantillon

Une étude du conditionnement de l'échantillon portant sur l'impact du revêtement des micro-tubes a été entreprise. Des essais ont été effectués sur 3 réplicats répétés 2 fois aux concentrations de travail (i.e : ≈10^{-8} mol.L^{-1}) avec l'aide de Victor DELORME, étudiant en master 1ère année, pour déterminer de façon qualitative l'adsorption du peptide d'intérêt, le MR 6-D_0, sur les parois des différents contenants utilisés lors des expériences de liaison en biologique et d'analyse par MALDI. Le principe était alors de fixer des conditions d'ionisation et de nombre de tirs laser pour ensuite comparer les aires des massifs isotopiques obtenus ; deux aires, A et B, sont ensuite comparées entre elle par un rapport qui selon sa valeur, supérieure ou inférieure à 1, permet d'ordonner les contenants entre eux en fonction du signal peptidique obtenu. Les résultats supérieurs à 1 (ou 100%) signifiant que le numérateur du rapport produit davantage d'ions que le dénominateur et que les peptides auraient tendance à s'adsorber davantage dans le contenant représenté par le dénominateur. Ce raccourci pourrait être très dangereux si les conditions d'analyse variaient de manière importante tant l'analyse MALDI serait alors sujette à variations qui rendraient toute interprétation impossible. Or les conditions expérimentales ont été conçues pour limiter au mieux ces variations : démultiplication des points de mesure, duplication des séries de mesure et suivi rigoureux des conditions analytiques entre toutes les séries de mesure : 3 séries d'expérimentations comprenant chacune 3 points de mesure déposés 2 fois. De plus l'utilisation d'un unique peptide sans mélange prévient toute forme de compétition à l'ionisation.

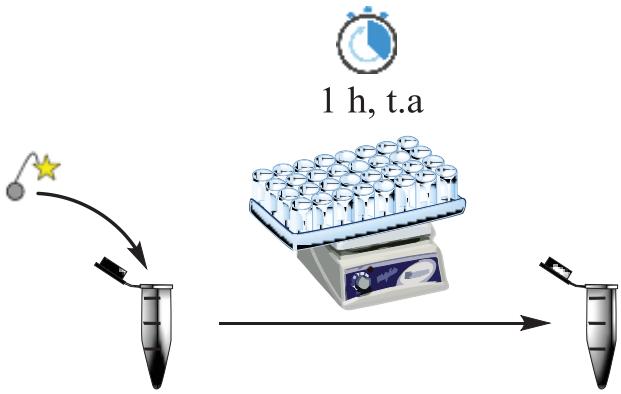


Figure 155 : Représentation du protocole d'incubation mis en place pour mimer cette étape lors de l'expérience de pharmacologie

Des protocoles ont alors été mis au point pour mimer d'une part l'incubation des solutions lors de l'expérience de pharmacologie (voir Figure 155 ci-dessus), et d'autre part le processus dans sa globalité comprenant la manipulation au cours de l'expérience de pharmacologie et l'analyse MALDI et la préparation de l'échantillon (voir Figure 156 p.275). Dans un premier temps, deux durées de pré incubation de BSA ont été comparées tenter d'évaluer la nécessité ou non de pré incuber cette protéine avant d'introduire le mélange de peptide pour enclencher la liaison sur le récepteur (voir Tableau 38 ci-dessous). En effet, la BSA en tant qu'additif dans un tampon de liaison est destinée à s'adsorber sur les parois pour éviter que ce ne soit les peptides mis en jeu dans les équilibres, de liaison en l'occurrence, qui ne s'adsorbent pour conduire à des résultats inexploitables.

Expériences	Ratio	E.T
PS* 5' / PS* 50'	118%	31%
PP* 5' / PP* 50'	105%	60%

Tableau 38 : Evaluation du temps d'incubation de la BSA sur l'analyse MALDI. L'abréviation PS désigne un tube à hémolyse en polystyrène, PP un micro-tube en polypropylène et « * » l'enduction préalable par de la BSA

Les résultats ont montré, compte-tenu de l'écart-type calculé, qu'aucune différence raisonnable ne pouvait être extraite d'une modification du temps de pré incubation de BSA. Cela légitime le mélange des différents composants lors de l'expérience de pharmacologie sans nécessité d'une pré incubation. Par la suite, des essais d'incubation dans différents contenant ont été menés en triplicata et répétés deux fois pour évaluer, selon le même principe, leur impact sur la production d'ions, tout étant égal par ailleurs y compris le nombre de tirs laser et la fluence laser.

Expériences			Ratio	E.T	Expériences			Ratio	E.T
PS	/	**PP**	**93 %**	23 %	PP	/	PP*$^{-}$	3 %	1 %
PS	/	PP^{-}	31 %	15 %	PP*	/	PS*	195 %	22 %
PS	/	**G**	**8 %**	2 %	**PP***	/	**PP**	**324 %**	3 %
PP	/	**PP^{-}**	**14 %**	6 %	PP*	/	G	12 %	2 %
PP	/	G	4 %	1 %	PP*	/	PP^{-}	45 %	18 %
PP^{-}	/	G	27 %	7 %	PP*	/	G*	11 %	4 %
Légende					PP*	/	PP*$^{-}$	23 %	16 %
PS	Contenant polystyrène				PS*	/	PP	167 %	21 %
PP	Contenant polypropylène				PS*	/	PS	95 %	44 %
G	Contenant verre				PS*	/	G*	8 %	4 %
A (x+x)	Procédé mimé automatique				**PP*$^{-}$**	/	**G***	**146 %**	98 %
M (x+x)	Procédé mimé manuel				PP*$^{-}$	/	G	148 %	74 %
					G*	/	G	109 %	23 %

Tableau 39 : Evaluation des matériaux utilisés pour l'incubation lors des expériences de pharmacologie du point de vue de l'analyse MALDI, à gauche sans enduction préalable de BSA et à droite avec ajout de BSA (symbolisé par « * »). L'enduction « low binding » des micro-tubes est symbolisée par « - »

Par la suite, les tests concernant les différents matériaux des contenants ont été comparés. Les résultats qui en ressortent montrent que les micro-tubes en polypropylène avec enduction « low binding » et ajout de BSA constituent le meilleur contenant.

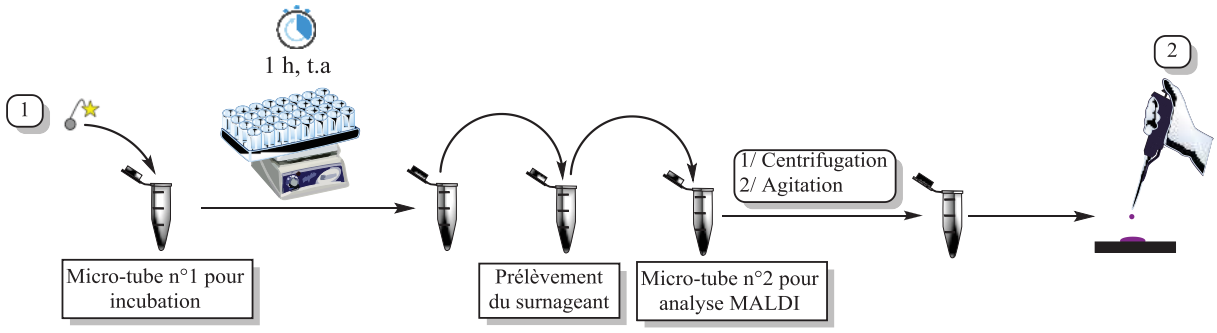


Figure 156 : Représentation du protocole destiné à mimer une expérimentation globale allant de l'introduction de l'analyte (1) pour incubation jusqu'au prélèvement de la solution à déposer (2)

Enfin des essais simulant la totalité des opérations d'incubation et de transvasement selon un procédé automatique ou manuel, le premier se servant de tubes à hémolyse en polystyrène et le second de tubes à hémolyse en verre. Cette globalité comprend l'expérience de liaison en pharmacologie jusqu'à l'analyse par MALDI. Ces essais ont été effectués afin de comparer les signaux détectés en MALDI et d'en déduire la meilleure combinaison contenant/procédé, c'est-à-dire la combinaison qui donnera le signal le plus important en MALDI, ce qui signifierait la présence d'une quantité maximale de peptide sur le dépôt et non adsorbés sur les parois du matériel servant à le manipuler.

Expériences			Ratio	E.T
M (PP+PP)	/	M (PP^-+PP^-)	19 %	4 %
M (PP+PP)	/	A (PS+PP)	*187 %*	126 %
M (PP+PP)	/	A (G+PP)	83 %	9 %
M (PP+PP)	/	A (G+PP^-)	36 %	13 %
M (PP+PP)	/	A (PS+PP^-)	*136 %*	45 %
M (PP^-+PP^-)	/	A (**PS**+PP^-)	**693 %**	81 %
M (PP^-+PP^-)	/	A (**G**+PP^-)	**181 %**	27 %
A (PS+PP)	/	A (PS+PP^-)	*83 %*	32 %
A (**PS**+PP^-)	/	A (**G**+PP^-)	**26 %**	1 %
A (G+**PP**)	/	A (G+**PP^-**)	**44 %**	20 %
A (G+PP)	/	A (PS+PP^-)	*168 %*	73 %

Tableau 40 : Evaluation du processus analytique global (expérience de pharmacologie et analyse MALDI) sur l'analyse MALDI

Les résultats obtenus via cette dernière étude ont montré (voir Tableau 40 ci-dessus) que la meilleure combinaison contenant/procédé était incarnée par une manipulation manuelle se servant de tubes en verre et de micro-tubes en polypropylène avec enduction « low binding ».

Expérimentation	Résultats comparés
Incubation (sans BSA)	**G < PP^-** < PP ≈ PS
Comparaison des temps d'incubation	**PP* 5' ≈ PP* 50'** < PS* 5' ≈ PS* 50' ≈ PS ≈ PP
Incubation (avec pré incubation de BSA)	**PP^{*-} ≈ G* ≈ G** < PP^- < PP* < PS* ≈ PP ≈ PS
Mime du processus analytique global (expérience de biologie + analyse MALDI)	**M (PP^-+PP^-) < A (G+PP^-)** < A (G+PP) ≈ A (PS+PP^-) ≈ A (PS+PP) ≈ M (PP+PP)

Tableau 41 : Synthèse des comparaisons entre différents matériaux, différents temps d'incubation de BSA et les différents procédés de manipulation globaux

L'ensemble de ces résultats est résumé dans le Tableau 41 ci-dessus. Les différents éléments sont classés par ordre croissant de peptide supposés adsorbés. Ainsi, les éléments les plus à gauche sont supposés les plus adaptés car entraînant très peu d'adsorption comparés aux éléments les plus à droite qui sont supposés adsorber une bien plus importante proportion de peptides. Ce tableau montre que le tube en verre reste le contenant provoquant le moins d'adsorption de peptide au cours de l'étape d'incubation, point clé pour l'établissement d'un bon équilibre. Le fait de rajouter une pré incubation de BSA, qui correspond à l'utilisation de cette dernière pendant l'expérience de

liaison, permet de voir que celle-ci diminue l'adsorption peptidique du contenant en polypropylène, qu'il possède un revêtement « low binding » ou non. Enfin les résultats concernant la reproduction du processus total de manipulation, à la fois dans le cadre de l'expérience de pharmacologie et dans celui de l'analyse MALDI, démontrent que les procédés manuels utilisant les micro-tubes « low binding », et automatiques utilisant des tubes en verre et micro-tubes « low binding », sont ceux à retenir. Finalement ce sera le procédé manuel qui sera retenu car permettant, dans un premier temps, de conserver un contrôle important sur l'ensemble du processus.

VII. Etude statistique de la quantification directe et étalonnage externe

Dans ce paragraphe nous allons nous focaliser sur l'aspect statistique des mesures et une méthode de validation adaptée à l'expérimentation MALDI-SID-MS.

VII.A. Principe de la validation statistique d'études analytiques

Ce travail de validation statistique a été envisagé pour fixer les limites de la quantification par dilution isotopique en MALDI et dans le but de fournir des critères objectifs traduisant la performance analytique de cette méthode qui permettront *in fine* de la comparer à d'autres. Les coefficients de variation mesurés (7 à 49 %) sont toutefois en accord par rapport à ce qui a pu déjà être publié dans d'autres études comme celle à propos de l'influence de la croissance des cristaux.[568] Un autre article a, quant à lui, détaillé la méthode de validation statistique qui a été transposée au MALDI-SID-MS.[569] Dans cette publication, et afin de légitimer les outils statistiques et méthodes utilisées, il est fait référence à deux standards internationaux en matière de normes que sont les deux ouvrages « Evaluation of measurement data — Guide to the expression of uncertainty in measurement » et la norme internationale ISO5725-1 « Accuracy (trueness and precision) of measurement methods and results ».[570,571]

Cet article décrit de façon précise une méthode d'estimation des incertitudes de mesure en ayant recours à des « profils d'incertitude » et appliquée à l'étalonnage en vue de la quantification de la caféine, le sujet de l'étude. Ces profils correspondent à la modélisation des courbes formées par le tracé de l'incertitude type combinée notée u(Y) associée à la grandeur « Y » en fonction de la concentration. Cette modélisation est effectuée via des équations mathématiques. L'incertitude u(Y) est calculée à partir de l'Equation 9 ci-dessous. Celle-ci est homogène à la variance des mesures

[568] Gutierrez, J. A.; Dorocke, J. A.; Knierman, M. D.; Gelfanova, V.; Higgs, R. E.; Koh, N. L.; Hale, J. E. *BioTechniques* **2005**, *Suppl*, 13.
[569] Gassner, A.-L.; Schappler, J.; Feinberg, M.; Rudaz, S. *J. Chromatogr. A* **2014**, *1353*, 121.
[570] International Organization for Standardization (ISO), ISO 5725-1, Application of the Statistics-accuracy (Trueness and Precision) of the Results and Methods of Measurement – Part 1: General Principles and Definitions, Geneva, **1994**.
[571] Guide GUM, (JCGM 100) Evaluation of Measurement Data – Guide to the Expression of Uncertainty in Measurement, **2008**.

notée « s_{TI}^2 » et dépend également de la variance totale, c'est-à-dire prenant en compte des variations inter et intra-condition, notée « s_p^2». Les termes inter et intra-condition peuvent s'apparenter aux termes inter et intra-jours dans la mesure où le paramètre qui varie dans l'ensemble des « conditions » d'analyse est le jour. C'est à ce moment-là qu'interviennent les grandeurs notées « I » et « J » qui correspondent respectivement au nombre de jours au cours desquels les analyses sont effectuées et au nombre de réplicats effectués. Enfin la grandeur notée « γ » correspond au rapport de la variance intra-condition (variance de la répétabilité) sur la variance totale.

$$u^2(Y) = s_p^2 \left[1 + \frac{1 - \gamma + {}^{\gamma}/_{J}}{I} \right] = s_{TI}^2$$

Equation 9 : Calcul de l'incertitude sur la mesure d'une grandeur Y

La seconde approche de la publication consiste à utiliser des outils statistiques d'analyse de métadonnées afin de valider la méthode d'analyse utilisée. Celle-ci ayant recours à la répétition de « I » séries d'analyses avec « J » réplicats, l'étalonnage produit une certaine quantité de données qui permettent d'extraire 4 grandeurs statistiques : RSD_p, RSD_r, la LLOQ (« Lowest Limit Of Quantification ») et le biais. Les deux premières grandeurs sont des coefficients de variations obtenus en faisant le rapport de l'écart-type d'un ensemble de valeurs par la moyenne de cet ensemble. Le premier (RSD_p) correspond au coefficient de variation total, c'est-à-dire lié à la variance totale «s_p^2». Le second correspond au coefficient de variation de répétabilité associé à la variance de répétabilité «s_r^2». Le biais représente ici la différence entre la valeur mesurée, lors de l'étalonnage, et la valeur réelle de la gamme qui a été préparée. Cela permet de connaître l'écart de la mesure par rapport à la réalité et si cet écart est constant sur la gamme dynamique définie ou s'il évolue de façon systématique. Enfin la LLOQ est une grandeur définie dans cette publication comme étant la plus basse valeur en dessous de laquelle il n'est plus possible de quantifier par la méthode analytique. C'est un point capital qui sous-entend qu'une LLOQ est spécifique à une méthode analytique donnée, en termes d'échantillonnage et d'analyse, combinée au traitement statistique proposé. Cette grandeur se détermine graphiquement et correspond au point de croisement entre le tracé des AL (« Acceptability Limits ») et celui des β-ETI (« β-Expected Tolerance Intervals »).

Ces deux dernières grandeurs sont 2 contraintes statistiques qu'il est possible de fixer. En ce qui concerne les limites d'acceptabilité, celles-ci correspondent à un intervalle autour de la « vraie valeur » – i.e : pour chaque point de la gamme, la valeur préparée connue sans ambigüité. L'intervalle peut-être exprimé en quantité absolue ou relative, c'est-à-dire en pourcentage. Dans le premier cas une idée plus précise de la signification des AL est donnée tandis que dans le second cas

permet d'interpréter plus aisément les données. Ces intervalles permettent de donner la performance analytique de la méthode choisie, et par conséquent de comparer une méthode à une autre. Pour les organismes de contrôle qualité tels que la FDA, ces limites représentent des contraintes que doivent atteindre les méthodes proposées. La FDA fixe à ± 30 % l'intervalle pour les A.L. Toutefois il est possible d'étendre cet intervalle à ± 50 % dans les cas où l'on se rapproche des limites de la méthode selon un récent rapport.[572] Les β-ETI, quant à eux, sont une fraction de l'intervalle autour de la moyenne donné par l'écart-type qui est supposé contenir un certain pourcentage de mesures futures. Ils sont représentés par la Figure 157 ci-dessous dans laquelle « ¥ » représente la moyenne, «k_M» le facteur β (e.g : 0,3 pour 30 %) et «s_{TI}» l'écart-type.

$$[¥ - k_M \times s_{TI}; ¥ + k_M \times s_{TI}]$$

Figure 157 : Représentation mathématique des β-ETI

Dernière grandeur introduite : le domaine de validation. Celui-ci représente l'intervalle de concentration dans lequel la méthode analytique est valide. En d'autres termes, c'est, pour un intervalle de concentration donné (fixé ou choisi par l'utilisateur), le pourcentage de valeurs maximum pouvant être hors des limites d'acceptabilités avec un β-ETI donné tout en conservant une méthode analytique valide car fournissant une quantité suffisante de données à l'intérieur des limites fixées. Cette donnée est donc primordiale dans l'optique de valider une méthode d'analyse. Cette proportion de valeurs est donnée par l'expression de la Figure 158 ci-dessous dans laquelle on retrouve le facteur « β » des β-ETI.

$$\left[\frac{1-\beta}{2}\right]\%$$

Figure 158 : Représentation mathématique du domaine de validation

Dans le cadre de ces travaux de thèse, seuls les calculs des différents coefficients de variation, du biais, des β-ETI, des AL, du domaine de validation seront proposés et la LLOQ déterminée graphiquement. D'après l'article de Gassner et al., le calcul de ces grandeurs est suffisant en première approche pour valider statistiquement une méthode analytique car cela fait directement appel aux valeurs expérimentales. Le recours aux modèles mathématiques pour décrire l'évolution des profils d'incertitude est une étape supplémentaire qui permet d'affiner et de prédire les résultats. Cependant comme tous les modèles mathématiques, celui-ci a des limites comme le système pour lequel il est créé et les conditions expérimentales choisies. Il n'est donc pas nécessaire

[572] Joint Committee for Guides in Metrology, Evaluation of Measurement Data –The Role of Measurement Uncertainty in Conformity Assessment, **2012**.

d'ajouter des limites à la méthode de quantification par dilution isotopique en MALDI qui est déjà spécifique à un marqueur donné associé à un peptide.

Il a été possible d'adapter ce système de validation statistique au MALDI-SID-MS dans la mesure où l'étalonnage est une étape obligatoire avant de pouvoir utiliser la méthode pour la quantification. De plus cette validation permet d'utiliser la technique par la suite pour la quantification de tout échantillon peptidique présentant le marqueur HCCA dont l'affinité pour le récepteur V_{1A} souhaite être testée grâce à la combinaison du domaine de validation, des AL et des β-ETI qui permettent de prédire l'intervalle dans lequel une fraction « β » des valeurs sera présente tout en conservant la méthode valide. L'adaptation de ces paramètres sera décrite au paragraphe suivant.

VII.B. Application des grandeurs statistiques décrites à la méthode analytique développée via une quantification relative directe

Les paramètres décrits ci-dessus et leur utilisation ont été présentés pour une méthode de quantification absolue utilisant un triple quadripôle avec la technique de quantification par MRM. Il a donc fallu adapter les grandeurs utilisées pour qu'elles soient interprétables en quantification relative par MALDI-SID-MS.

La quantification directe des échantillons se fait grâce à la relation décrite par l'Equation 10 ci-dessous : le rapport entre l'aire du pic mono isotopique de l'échantillon et l'aire du pic mono isotopique de l'étalon. C'est ce rapport qui est ensuite multiplié par la concentration connue de l'étalon pour obtenir la concentration de l'échantillon dans le dépôt effectué sur la plaque MALDI. En revanche il s'agit d'une quantification relative qui donne une idée de la situation dans le dépôt, en termes de concentration, et par conséquent dans la solution déposée sans en être l'exact reflet.

$$C(calculée)_{échantillon} = \frac{A_{échantillon}}{A_{étalon}} \times C(préparée)_{étalon}$$

Equation 10 : Calcul de la concentration d'échantillon par la méthode de la dilution isotopique

La première chose à définir pour l'étude est la portée du terme « conditions » utilisé dans l'article et qui conditionne le calcul des coefficients de variation par la suite. Dans le cadre de ce projet l'ensemble des conditions se résume à un opérateur sur une machine effectuant les mesures avec un échantillon d'étalon sur une journée. Les expériences ont été répétées sur plusieurs jours, tout étant égal par ailleurs. Cela permet de définir le « coefficient de variation inter condition » RSD_B (voir Equation 11 ci-dessous) calculé en prenant en compte la répétition sur plusieurs jours d'un ensemble de mesures de rapports d'aire échantillon/étalon provenant d'une courbe d'étalonnage. Il est obtenu en faisant le rapport de l'écart-type inter-condition « s_B » par la moyenne « Y » de l'ensemble de valeurs considéré.

$$RSD_B = \frac{s_B}{Y}$$

Equation 11 : Calcul du coefficient de variation inter-condition

Le calcul du coefficient de variation intra-condition suit le même principe (voir Equation 12 ci-dessous). Il est obtenu en faisant le rapport de l'écart-type intra-condition « s_r » par la moyenne « Y » de l'ensemble de valeurs considéré. Dans ce cas précis, l'ensemble de valeurs considéré fait référence à l'ensemble des rapports d'aire échantillon/étalon provenant des différentes courbes tracées dans une même journée.

$$RSD_r = \frac{s_r}{Y}$$

Equation 12 : Calcul du coefficient de variation intra-condition

Le calcul du coefficient de variation total (voir Equation 13 ci-dessous), qui traduit la dispersion des valeurs autour de la moyenne pour l'ensemble de toutes les courbes tracées aussi bien au cours d'une journée que sur plusieurs jours, peut se calculer en faisant la moyenne des coefficients de variation inter et intra-condition. Le calcul de l'intersection mathématique de ces coefficients en revanche, correspond à leur variation analytique commune. Elle se calcule en effectuant le produit des deux coefficients de variation. Ceci est similaire au calcul d'un rendement de synthèse en plusieurs étapes établi à partir du produit des rendements de chaque étape dont le point commun est l'obtention du produit final ou encore au calcul de probabilités mathématiques pour lesquelles l'intersection de deux paramètres se traduit par un produit entre eux.

$$I_{r;B} = RSD_r \times RSD_B \; ; \; RSD_p = (RSD_r + RSD_B)/2$$

Equation 13 : Calcul de l'intersection mathématique des coefficients de variation inter et intra-condition (à gauche) et du coefficient de variation total (à droite)

Le biais (voir Equation 14 ci-dessous) est calculé pour chaque rapport de concentrations échantillon/étalon et permet d'illustrer l'écart de l'étalonnage à la réalité de la préparation de la gamme de concentrations de l'échantillon quantifié. Celui-ci est calculé en faisant le rapport de la différence entre la concentration en échantillon calculée par quantification et la concentration correspondant à la gamme préparée en théorie par la valeur de cette concentration théorique. Cela permet d'obtenir le biais exprimé en pourcentage par rapport à cette dernière. En ce qui concerne la LLOQ, celle-ci peut être déterminée graphiquement une fois que les AL et les β-ETI sont fixés.

$$Biais = \frac{|C(calculée) - C(préparée)|}{C(préparée)}$$

Equation 14 : Calcul du biais en pourcentage par rapport à la concentration réelle

VII.C. Discussion des résultats obtenus après application des outils statistiques sur une étude d'une semaine

La validation analytique a été menée en répétant le tracé d'une courbe d'étalonnage 3 fois dans une journée avec 8 points par courbe, chacun dupliqué pour obtenir la variabilité intra-condition. Ces analyses ont été répétées sur 5 jours au total pour obtenir la variabilité inter-condition pour un total de 240 points de mesure. En outre, des analyses supplémentaires ont été effectuées sur une même journée sur une gamme resserrée autour de la concentration de l'étalon pour un aliquot d'étalon. Ceci ayant pour objectif de démontrer l'existence de « plateaux de quantification » à partir de certains rapport analyte/étalon qui requièrent un changement de la concentration de l'étalon pour garantir une quantification fiable.

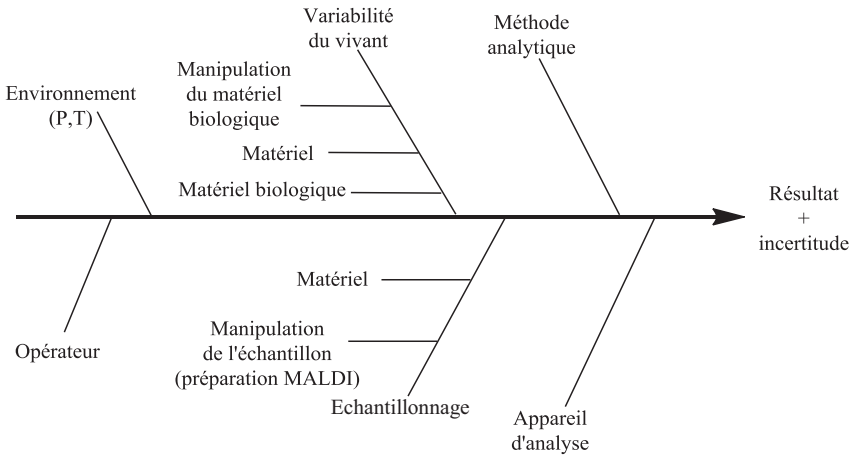


Figure 159 : Sources d'incertitudes au cours du processus de quantification par MALDI

Malgré la prise en compte de ces deux paramètres (aliquot étalon et jour d'analyse), un grand nombre d'autres facteurs sont susceptibles d'intervenir dans l'incertitude des mesures obtenues et dans la dispersion de ces dernières. Ceux-ci sont représentés dans le diagramme ci-dessus (voir Figure 159) sans pour autant avoir pu être pris en compte, voir même étant très difficilement accessibles comme la variabilité due à l'utilisation de préparations membranaires issues du vivant.

	Etalon deutéré à 10 nmol.L^{-1} (Figure 160)
A.L	60 %
β-ETI	24 %
Gamme linéaire (rapports d'aires)	[0,016 ; 16]
Domaine de validation	[1,6 ; 160 nmol.L^{-1}]
r^2	0,997
LLOQ (rapport d'aire)	0,016
HB (rapport d'aire)	16

Tableau 42 : Données de la validation statistique pour un étalon à 10 nmol.L^{-1}

Les résultats sont présentés ci-dessous pour un étalon à 10 nmol.L^{-1} (voir Figure 160 ci-dessous) avec les courbes à 8 points de mesure et à 1 nmol.L^{-1} (voir Figure 161 p.286) avec les courbes à gamme dynamique resserrée. Les résultats de la première courbe sont présentés dans le Tableau 42 ci-dessus. Dans notre cas de quantification relative en MALDI-SID-MS, du fait de l'évolution du rapport des aires entre le pic mono isotopique de l'échantillon et de celui de l'étalon, il vient un point où le rapport des aires devient constant suite au tassement du signal du premier par rapport au second et inversement. Cela nous conduit à introduire une grandeur supplémentaire déterminée graphiquement : la HB pour « High boundary ». Le principe est le même que pour la LLOQ sauf que l'on s'intéresse à la coupure des AL par les β-ETI de la partie supérieure de la courbe d'étalonnage. Elle représente plus une borne supérieure qu'une réelle limite puisqu'en prenant un étalon à des concentrations plus élevées, il sera tout à fait possible de quantifier. Dans le cadre de l'application de ce système au MALDI-SID-MS, il faut garder à l'esprit que seul le critère graphique pour la détermination de la LLOQ ne suffit pas pour une première approche exempte de correction mathématique par des polynômes complexes. L'inspection graphique et numérique de la linéarité via le coefficient de régression linéaire est essentielle dans ce cadre-là et permet de fixer la LLOQ au niveau de la plus basse concentration de la gamme dynamique linéaire. Le même principe est appliqué à la HB.

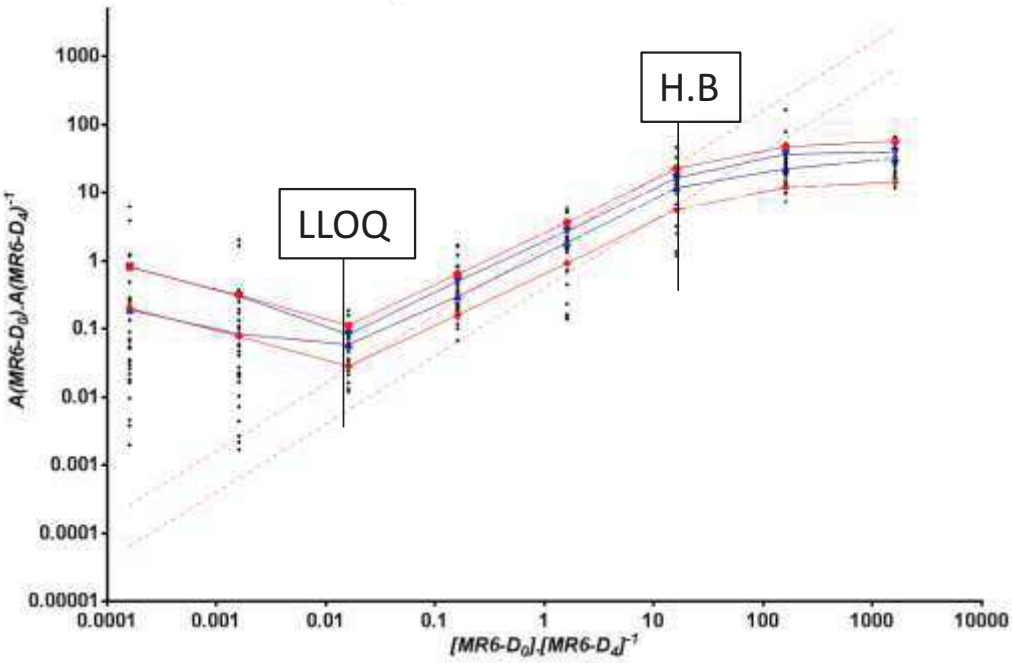


Figure 160 : Validation statistique de la méthode analytique – Etalon deutéré à 10 nmol.L^{-1}

Afin de bien comprendre les courbes tracées (voir Figure 160 et Figure 161) une explication doit être fournie concernant les différents éléments représentés. Les grandeurs statistiques représentées sont les β-ETI (traits pleins bleus), les A.L autour de la moyenne des mesures pour chaque abscisse (traits pleins rouges), les A.L autour des concentrations préparées de l'analyte (le peptide MR 6-D_0) correspondent à la gamme de concentrations préparées et déposées sur la plaque MALDI pour analyse (traits pointillés rouges). L'ensemble des points mesurés pour chaque abscisse (points noirs) sont également représentés et traduisent la dispersion des résultats autour de la moyenne. Les A.L traduisent, quant à eux, la performance analytique de la méthode en fixant des bornes au-delà desquelles un pourcentage des mesures effectuées ne doit pas être dépassé. Autrement dit, plus la dispersion des valeurs autour de la moyenne sera faible, plus le nombre de valeurs hors des A.L sera faible et plus la méthode sera performante au regard de cet outils. Les β-ETI, quant à eux, représentent l'intervalle autour de la moyenne dans lequel se trouvera un pourcentage « β » de toutes les futures mesures qui pourraient être obtenues (après l'étalonnage par exemple). C'est un outil essentiellement indicatif qui a une autre utilité : la détermination du domaine de validation (voir Figure 158 p.279). L'équation indiquée permet d'obtenir le pourcentage maximal de valeurs admissibles hors des A.L. A partir de cette valeur il devient possible de déterminer l'intervalle de concentrations à l'intérieur duquel la méthode sera statistiquement validée.

Dans notre cas, la construction des graphiques s'est faite en deux étapes : la fusion des courbes obtenues suites aux analyses, puis l'édition des grandeurs statistiques. Une fois cela

effectué, une valeur pour les A.L est choisie et les β-ETI calculés. Dans le cas de la Figure 160 p.284, voici les valeurs correspondantes :

- A.L : 60 %.
- β-ETI : 24 %.
- Domaine de validation : [0,16 ; 16].

La courbe de la Figure 160 regroupe toutes les courbes d'étalonnage tracées sur 5 jours de travail. Celle-ci a été effectuée avec un étalon deutéré à 10 nM. Compte-tenu de l'ensemble des points mesurés représentés par les points noirs alignés verticalement, il a été possible de déterminer les paramètres qui rendent compte de la performance de la méthode analytique. De plus, et à cause de l'effet d'écrasement du signal sur les spectres de masse pour des écarts de concentration très importants, la zone de linéarité de la gamme dynamique (r^2 = 0,997) est limitée à 3 logs et correspond également au domaine de validation. Les données sont présentées dans le Tableau 43 ci-dessous. Dans un premier temps, le fait d'avoir une gamme dynamique linéaire sur 3 logs est très intéressante car cela permet avec un étalon de pouvoir quantifier un échantillon sur un large intervalle du point de vue des expériences en pharmacologie.

$[MR\ 6\text{-}D_0].[MR\ 6\text{-}D_4]^{-1}$	Biais	RSD_r	RSD_B	RSD_p
160	82 %	52 %	82 %	67 %
16	44 %	38 %	66 %	52 %
1,6	82 %	43 %	83 %	63 %
0,16	160 %	64 %	107 %	86 %
0,016	3 412 %	41 %	63 %	52 %

Tableau 43 : Dispersion et biais des mesures de la courbe d'étalonnage avec étalon deutéré à 10^{-8} mol.L^{-1}

La performance analytique de la méthode, traduite par les valeurs des AL et des β-ETI, est moindre que ce qui est demandé par la FDA (AL à ± 30 % avec un maximum à 50 %) avec des AL fixées à ± 60 % et des β-ETI à 26 %.

Enfin il est possible de constater que le biais évolue en fonction de la concentration. Ceci est corrélé avec l'allure de la courbe d'étalonnage dont la pente est différente des deux droites en pointillés rouges qui représentent les limites d'acceptabilité autour des valeurs de la gamme de concentration préparée. En effet, dans la partie supérieure de la droite, le signal de l'étalon est écrasé par celui de l'échantillon et se retrouve sous les limites d'acceptabilité. Puis à mesure les rapports de concentration diminuent, le rapport s'inverse et le signal de l'échantillon se retrouve écrasé par celui de l'étalon, ce qui aboutit au tassement du signal qui se retrouve au-dessus des limites d'acceptabilité. L'étude des coefficients de variation nous montre que ceux-ci sont relativement importants et compris entre 38 et 64 % pour les mesures intra-condition et entre 62 et

107 % pour les mesures inter-condition, tandis que la variation totale est comprise entre 25 et 68 % sur la totalité des mesures. Ces chiffres montrent qu'il existe une dispersion non négligeable des valeurs qui s'explique par le fait que les analyses ne s'effectuent pas dans une zone de confort, en termes de concentration, mais bien aux limites de la technique en termes de sensibilité. Cela démontre avec éloquence lorsque l'on considère les coefficients de variation totaux qu'une quantification en MALDI-SID-MS sur plusieurs jours est à proscrire en fournissant des écarts extrêmement importants. Il est alors primordial d'effectuer une série d'analyse dans la même journée pour minimiser la variation des mesures due à de nombreux facteurs (détaillés dans la Figure 159 p.282) et avoir la meilleure reproductibilité possible.

VII.D. Discussion des résultats obtenus après application des outils statistiques sur une étude d'une journée

La Figure 161 ci-dessous regroupe les courbes d'étalonnage tracées sur une journée, à savoir 2 séries de 3 courbes avec 5 points chacune dupliqués pour un total de 60 points de mesure. Les points de mesures ont été regroupés autour de la valeur centrale de l'étalon à 1 nmol.L-1. Cette courbe nous donne une LLOQ à 0,1 nmol.L^{-1} tout en gardant une très bonne linéarité (r^2 = 0,999).

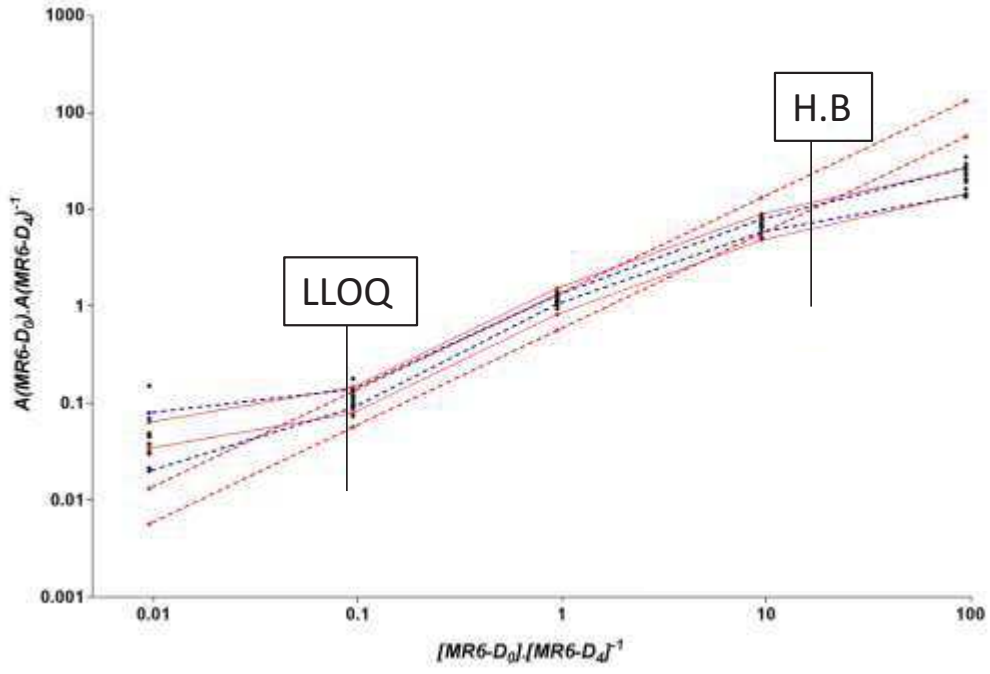


Figure 161 : Validation statistique de la méthode analytique – Etalon deutéré à 1 nmol.L^{-1}

Ce qu'il est intéressant de noter, ce sont les valeurs fixées des AL et des β-ETI données dans le Tableau 44 p.287, respectivement de ± 40 % et de 94 %. Ces valeurs sont déjà plus proches des recommandations de la FDA (AL à ± 30 % extensibles à ± 50 % et β-ETI de 80 %). En s'intéressant maintenant aux variations calculées (voir Tableau 45 p.287), celles-ci ne sont pas non plus

négligeables car comprises entre 18 et 35 % pour l'intra-condition et entre 15 et 44 % pour l'inter-condition avec variation totale comprise entre 18 et 46 %.

	Etalon deutéré à 1 nmol.L^{-1} (Figure 161)
A.L	40 %
β-ETI	94 %
Gamme linéaire (rapports d'aires)	[0,1 ; 10]
Domaine de validation	[0,1 ; 10 nmol.L^{-1}]
r^2	0,999
LLOQ (rapport d'aire)	0,09
HB (rapport d'aire)	15

Tableau 44 : Données de la validation statistique pour un étalon à 1 nmol.L^{-1}

Cependant, les variations concernant la zone de linéarité (de 18 à 22 %) sont tout à fait correctes car correspondant à ce qui est généralement présenté dans le cas de mesure par MALDI-MS.

[MR 6-D_0].[MR 6-D_4]$^{-1}$	**Biais**	**RSD_r**	**RSD_B**	**RSD_p**
100	78 %	37 %	43 %	40 %
10	27 %	22 %	22 %	22 %
1	25 %	15 %	22 %	18 %
0,1	25 %	23 %	20 %	21 %
0,01	418 %	46 %	45 %	46 %

Tableau 45 : Dispersion et biais des mesures de la courbe d'étalonnage avec étalon deutéré à 1 nmol.L^{-1}

Une seconde courbe a été préparée pour valider statistiquement la quantification des échantillons biologiques en prenant en considération un étalon deutéré à une concentration de l'ordre de 10^{-7} mol.L^{-1}. L'objectif recherché est de pouvoir valider la possibilité de la quantification relative quelle que soit la concentration d'analyte à mesurer pourvue qu'elle soit comprise dans le domaine de validation correspondant à une concentration d'étalon. Les résultats obtenus confirment le comportement observé pour la courbe tracée avec un étalon à une concentration de l'ordre de 10^{-8} mol.L^{-1}, à savoir la présence d'un plateau inférieur. Cependant, dans ce cas-ci (voir Figure 162 ci-dessous) le plateau semble être décalé et débute en-deçà d'un rapport analyte/étalon de 1:100. En outre, aucun plateau n'est observé à un rapport de 100:1. Une hypothèse avancée pour rationaliser cette observation ferait intervenir la concentration en étalon utilisée (100 nmol.L^{-1}), par rapport aux deux courbes précédentes. Il n'est donc pas étonnant d'obtenir un résultat différent.

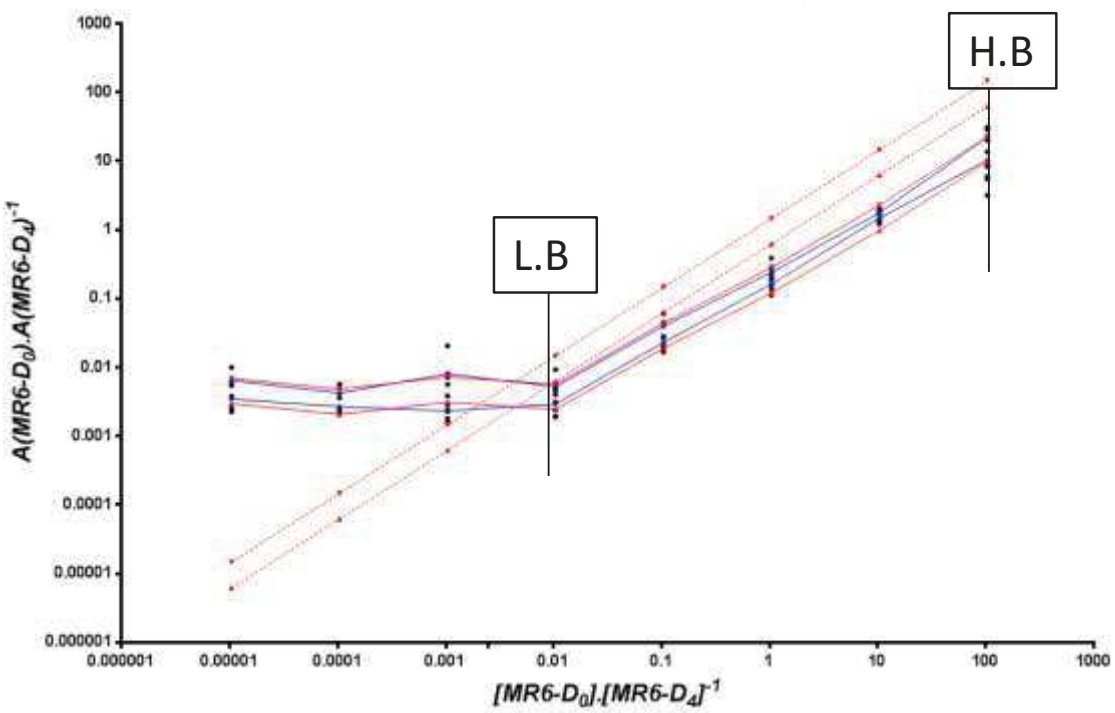


Figure 162 : Validation statistique de la méthode analytique – Etalon deutéré à 100 nmol.L^{-1}

La courbe présentée à la Figure 162 ci-dessus permet de valider la méthode analytique avec des AL de 40 %. Le coefficient de régression linéaire sur la partie linéaire de la courbe est lui aussi excellent (voir Tableau 46 p.288), tandis que le β-ETI est évalué à 55 %. Ce dernier permet de déterminer le domaine de validation de la méthode (indiqué au Tableau 46). L'intersection entre la courbe des β-ETI et des AL permet de définir une grandeur LB « Low Boundary » en lieu et place de la LLOQ car celle-ci a pu être évaluée grâce aux deux précédentes courbes relatives aux deux concentrations en étalon de 1 et 10 nmol.L-1.

	Etalon deutéré à 100 nmol.L^{-1} (Figure 162)
A.L	40 %
β-ETI	55 %
Gamme de linéarité	[0,01 ; 100]
Domaine de validation	[10 ; 1 000 nmol.L^{-1}]
r^2	0,999
LB[573] (rapport d'aire)	0,01
HB[574] (rapport d'aire)	100

Tableau 46 : Tableau résumé des grandeurs statistiques pour un étalon à 100 nmol.L^{-1}

[573] « Low Boundary » : borne basse de quantification avec une concentration en étalon deutéré donnée
[574] « High Boundary » : borne haute de quantification avec une concentration en étalon deutéré donnée

Enfin en ce qui concerne le domaine de validation, malgré le fait qu'à l'abscisse 100 la courbe est bien linéaire, la variation devient très importante (voir Tableau 47 ci-dessous). C'est la raison pour laquelle le domaine de validation est plus restreint que la gamme linéaire dans ce cas-ci. L'étude des biais montrent que ceux-ci sont relativement proches dans la zone de linéarité de la gamme étudiée, avec une faible variation tout au plus.

$[MR\ 6\text{-}D_0].[MR\ 6\text{-}D_4]^{-1}$	Biais	RSD_r	RSD_B	RSD_p
100	84 %	**69 %**	**74 %**	**72 %**
10	84 %	15 %	18 %	17 %
1	81 %	36 %	32 %	34 %
0,1	70 %	50 %	54 %	52 %
0,01	61 %	56 %	44 %	49 %
0,001	399 %	**88 %**	**85 %**	**87 %**

Tableau 47 : Dispersion et biais des mesures de la courbe d'étalonnage avec étalon deutéré à 100 $nmol.L^{-1}$

En conclusion de cette section, la validation statistique a montré que la quantification par MALDI-SID-MS pouvait être fiable et reproductible en assurant une variation des mesures très satisfaisante et une performance au travers des A.L tout à fait acceptable pour une méthodologie en développement.

VII.E. Discussion à propos de l'impact du jour de manipulation sur la quantification

Au-delà d'une variation beaucoup plus élevée, le simple fait d'effectuer une série d'analyses sur plusieurs jours entraîne une impossibilité catégorique de combiner les données obtenues pour tenter d'interpréter l'ensemble.

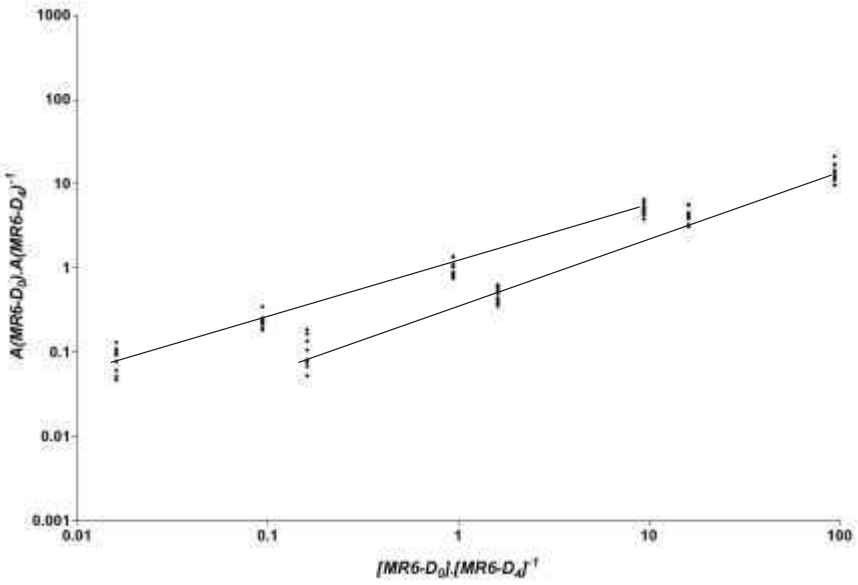


Figure 163 : Illustration de l'incompatibilité de fragments de séries de mesures sur deux jours d'analyse différents

Deux séries de points issus des expériences de validation statistiques viennent illustrer cela (voir Figure 163 ci-dessus). La série supérieure a été obtenue avec un étalon à une concentration de 1 nmol.L-1 de même que la série inférieure qui a été obtenue ultérieurement. Bien que ces séries semblent linéaires et avec des pentes proches, car issues de gammes de concentration préparées de manière indépendante sur deux jours différents, il est clairement impossible de superposer ces deux séries de mesures au risque d'obtenir des résultats aberrants et ininterprétables. En outre, une régression linéaire, représentée par les deux droites noires montrent clairement que d'un simple point de vue qualitatif, les deux séries n'ont pas du tout la même valeur de pente ni même d'ordonnée à l'origine.

En conclusion, l'importance d'effectuer des séries de mesures comparables dans une même journée et avec une même série de préparation est ici démontrée non pas du point de vue de la variation des valeurs, mais de la possibilité raisonnable de rassembler des jeux de données.

VIII. Quantification classique par dilution isotopique avec droite d'étalonnage

Dans ce paragraphe nous allons nous concentrer sur l'optimisation du temps expérimental à travers une discussion orientée sur le nombre de réplicats à mettre en place et le nombre de tirs laser accumulables.

VIII.A. Détermination du nombre de réplicats pour une régression correcte

La problématique du nombre d'analyses à considérer par abscisse de mesure, autrement dit le nombre de réplicats du point de vue analytique, n'est pas anodine. En effet, celle-ci doit répondre à deux exigences : fournir une quantité de données suffisante pour être statistiquement viable et interprétable tout en étant suffisamment limitée pour ne pas engendrer de temps de manipulation disproportionné.

En se basant sur une expérimentation en pharmacologie chaque mesure est triplée, ce qui amène, pour une série de 8 mesures, à un total de 24 points sachant qu'il faut compter deux séries de mesure par expérimentation pharmacologique. En outre et considérant la nécessité de démultiplier le nombre de mesures sur le plan analytique également, le fait de tripler chaque mesure pharmacologique amènerait à 72 prises de mesure, ce qui donnerait un temps de manipulation disproportionné et pouvant atteindre plus d'une heure en considérant qu'il faut une minute pour analyser un point de mesure. Tout cela sans tenir compte bien sûr de l'étape d'étalonnage qui va également rallonger le temps d'analyse.

Ainsi, pour obtenir un bon compromis entre répétition des mesures sur le plan analytique et temps de manipulation correct, de nombreux essais ont été menés avec un, deux ou trois dépôt MALDI. En tenant compte du temps de manipulation (voir Tableau 30 p.247), le meilleur compromis a été de doubler chaque point de mesure pharmacologique. Cela permettra d'atteindre 48 points par

expérimentation et de s'inspirer de cette quantité pour établir un protocole d'étalonnage basé sur la préparation de 3 gammes d'étalonnage dont les points seront doublement déposés pour une mesure par MALDI-SID-MS doublée. De plus, la prise de 6 mesures permet d'obtenir une quantité raisonnable de données pour pouvoir extraire et interpréter les métadonnées telles que la moyenne, le coefficient de variation et l'erreur sur la moyenne (dont l'expression est donnée par l' Equation 15 ci-dessous).

$$SEM = \frac{\sum_{i=1}^{n} N_i}{\sqrt{n}}$$

Equation 15 : Expression de l'erreur sur la moyenne (SEM pour « Standard Error on Mean ») où N représente la donnée dont l'erreur sur la moyenne est recherchée et n le nombre de mesures effectuées de cette donnée (température, quantité de matière, concentration …)

VIII.B. Discussion autour du nombre de tirs LASER à accumuler

Nous avons, au cours de la Partie A – ***Contexte Bibliograhique***, chapitre 3, discuté du fait que seule des couches relativement superficielles du dépôt MALDI sont affectées par un laser du fait du coefficient d'absorption de ce dernier. L'inverse de ce coefficient correspond à la profondeur de pénétration du rayonnement laser δ comprise entre 20 et 200 nm à laquelle la fluence du laser a perdu 30 % de sa valeur initiale H_0. Le simple fait qu'une partie du dépôt sera désorbée/ablatée par le rayonnement laser autorise plusieurs tirs au même endroit pour rentabiliser le site de tirs.[575]

Une étude a donc été menée sur l'impact du nombre de tirs lasers sur plusieurs dépôts issus d'une expérience de pharmacologie (voir Tableau 48 ci-dessous) pour tenter de diminuer le nombre de tirs requis pour obtenir un signal correct tout en assurant une quantification fiable et un temps de manipulation aussi cours que possible dans l'optique d'optimiser le temps d'analyse.

[575] F. Hillenkamp, J. Peter-Katalinić, Eds. , *MALDI MS: A Practical Guide to Instrumentation, Methods and Applications*, Wiley - VCH, Weinheim, **2009**

[Homo-HO-LVA] engagé comme compétiteur	Entrée	$[M+H]^+$	[1] – Aire pour 100 tirs laser	[2] – Aire pour 300 tirs laser	[2] / [1]	C.V
10^{-5}	**1**	MR 6-D_0	29	152	5,2	10 %
	2	MR 6-D_4	44	199	4,5	
10^{-6}	**3**	MR 6-D_0	63	267	4,2	0 %
	4	MR 6-D_4	85	361	4,2	
10^{-7}	**5**	MR 6-D_0	116	624	5,4	0 %
	6	MR 6-D_4	180	963	5,4	
10^{-8}	**7**	MR 6-D_0	92	1034	11,2	6 %
	8	MR 6-D_4	113	1373	12,2	
10^{-9}	**9**	MR 6-D_0	36	353	9,7	33 %
	10	MR 6-D_4	23	362	15,6	
10^{-10}	**12**	MR 6-D_0	287	595	2,1	1 %
	13	MR 6-D_4	335	708	2,1	
10^{-11}	**14**	MR 6-D_0	34	115	3,4	6 %
	15	MR 6-D_4	39	143	3,7	
10^{-12} (Blanc)	**16**	MR 6-D_0	50	248	5,0	14 %
	17	MR 6-D_4	75	306	4,1	

Tableau 48 : Etude de l'impact du nombre de tirs laser sur la quantification

L'intérêt du tableau réside dans la colonne « **[2] / [1]** ». En effet, celle-ci montre le coefficient par lequel est multiplié l'aire d'un ion $[M+H]^+$ donné (entrée 1 ou 2) en passant de 100 (colonne **[1]**) à 300 tirs laser (colonne **[2]**). Parmi tous les couples de coefficients multiplicateurs (e.g : entrées 1/2 ; 3/4 ; 5/6 …), tous sont quasi identiques avec un coefficient de variation d'au maximum 14 %. Ainsi le rapport des aires ne s'en trouve pas modifié et donc la concentration en peptide d'intérêt ne souffrira d'aucune différence. Seul un point de mesure (entrées 9 et 10) démontre une vraie différence entre une acquisition de 300 tirs laser par rapport à une acquisition de 100 tirs. Ceci peut s'expliquer par une inhomogénéité de ce dépôt en particulier. L'avantage de pouvoir se reposer sur 100 tirs laser au lieu de 300 est avant tout la diminution du temps d'analyse par 3. Le gain devient très intéressant lorsque des séries de 130 dépôts en imaginant que chaque dépôt va requérir 1 minute pour être analysé.

En conclusion, accumuler des séries de tirs laser permet de moyenner la répartition du peptide sur le dépôt avec le défaut d'augmenter considérablement le temps de manipulation tandis qu'accumuler seulement 100 tirs permet de gagner du temps d'analyse sans que le résultat ne souffre d'une erreur disproportionnée.

VIII.C. Résultats d'étalonnage

C'est dans les conditions de tirs laser décrites au paragraphe VIII.B ci-dessus que s'est déroulé l'ensemble des étalonnages. L'objectif poursuivi est alors d'obtenir des droites qui vont permettre de corriger l'écart visualisé par l'intermédiaire des courbes tracées lors de la validation

statistique entre les mesures et les valeurs théoriques. Ces courbes ont été tracées avec 6 points de mesure pour chaque abscisse dans le but de se placer dans un cadre semblable à ce qui a été choisi pour les expérimentations en pharmacologie. Une illustration de cet étalonnage est donnée par la Figure 164 ci-dessous.

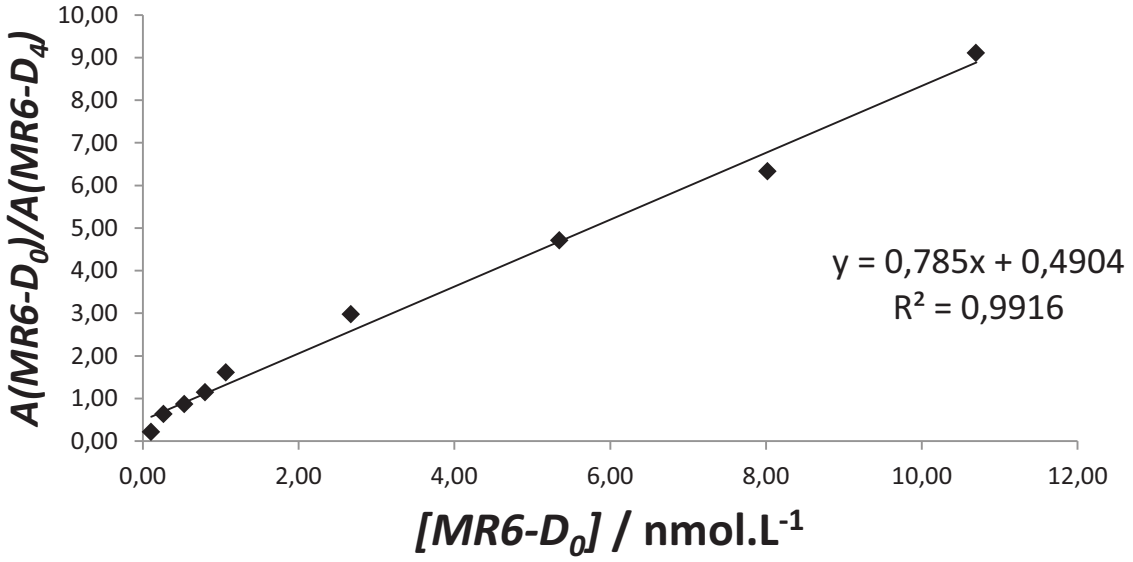


Figure 164 : Courbe d'étalonnage obtenue en représentant les moyennes de 6 mesures de rapports d'aire entre les peptides MR 6-D_0 et MR 6-D_4 en fonction de la concentration en peptide MR 6-D_0

A partir des données utilisées pour le tracé de cette droite d'étalonnage nous avons extraits les métadonnées suivantes : moyenne des mesures de rapport d'aire, erreur sur la moyenne, coefficients de variation des mesures, valeurs théoriques de la régression linéaire, biais par rapport à la régression linéaire, et biais théorique (voir Tableau 49 ci-dessous). La première information qui ressort de ce tableau est l'évolution du biais théorique entre les rapports d'aire mesurés et le rapport d'aire théorique qui évolue de manière de croissante quand la concentration en peptide MR 6-D_0 diminue. Ceci est à mettre directement en relation avec l'alignement des points de mesure de la validation statistique (voir Figure 161 p.286). Ces derniers sont bien alignés selon une droite dont la pente est différente de celle liée à la gamme de concentration théorique et préparée en amont de l'analyse. Ce qui implique inévitablement que les droites se coupent avec un changement de signe de la différence de l'une par rapport à l'autre et une évolution de cette différence de manière croissante ou décroissante selon le choix de l'opération mathématique effectué.

Le deuxième point à relever de ce tableau est l'ensemble des coefficients de variation des mesures qui sont tous très satisfaisant et pour la plupart sous la barre des 20 % voir proches des 10 %. Ceci démontre la précision de l'étalonnage et la reproductibilité de celui-ci via les nombreuses opérations de ce type et qui ont toutes donné des variations similaires. Ajoutons à cela les erreurs sur la moyenne calculées qui, elles aussi, affichent des valeurs extrêmement faibles et qui reflètent

une bonne précision de la valeur de la moyenne et sont de l'ordre de 10 % ou moins de leur moyenne.

A(MR 6-D_0) / A(MR 6-D_4) théorique	[MR 6-D_0] nmol.L^{-1}	A(MR 6-D_0) / A(MR 6-D_4) mesurée	SEM	CV	Valeurs de régression	Biais de régression	Biais théorique
10,49	10,70	9,11	1,15	25 %	8,89	2 %	-13 %
7,87	8,03	6,33	0,54	17 %	6,79	-7 %	-20 %
5,25	5,35	4,71	0,40	21 %	4,69	0 %	-10 %
2,62	2,68	2,98	0,14	12 %	2,59	15 %	14 %
1,05	1,07	1,61	0,04	7 %	1,33	21 %	53 %
0,79	0,80	1,15	0,05	11 %	1,12	2 %	46 %
0,52	0,54	0,87	0,06	17 %	0,91	-5 %	65 %
0,26	0,27	0,64	0,05	21 %	0,70	-9 %	143 %
0,10	0,11	0,21	0,01	7 %	0,57	-63 %	102 %

Tableau 49 : Représentation des résultats d'un étalonnage. La moyenne et son erreur associée, ainsi que les coefficients de variation et les biais des mesures par rapport à la droite de régression linéaire sont affichés de même que les valeurs théoriques provenant de cette régression linéaire et le biais théorique par rapport au rapport d'aire théoriquement attendu et correspondant au rapport des concentrations préparées donné par l'Equation 14 p.281

En conclusion, grâce à une technique et un protocole de dépôt rigoureux, une préparation de matrice optimisée et des conditions environnementales de manipulation contrôlées, il est possible d'obtenir un étalonnage très satisfaisant, précis et reproductible malgré un manque de justesse par moment qui assure d'une quantification fiable, reproductible et répétable lors des expérimentations en pharmacologie.

IX. Etudes d'imagerie sur MR 6

Dans ce paragraphe, nous allons orienter la discussion sur les expériences d'imagerie effectuées sur différents types de dépôts (MR 6-D_0 seul, dépôt d'étalonnage…).

Dans le cadre des expériences de saturation et de compétition en pharmacologie entreprises, il est nécessaire de connaître la répartition, au sein d'un dépôt, des peptides étudiés afin de démontrer leur cocristallisation, caractéristique qui assurera d'une quantification fiable. Cela rend possible une irradiation également répartie sur la zone ciblée par le laser incident.

Des expériences d'imagerie ont été effectuées afin de visualiser la répartition du peptide d'intérêt (MR 6-D_0) et de son analogue deutéré (MR 6-D_4) utilisé en tant qu'étalon pour la quantification. Ces expériences ont été menées dans plusieurs cadres :

1. Sur des dépôts de peptide MR 6-D_0 seul.
2. Sur une série de points de mesures issus de mélanges MR 6-D_0/ MR 6-D_4 et MR 6-D_0/ MR 6-D_4/EMC-09.
3. Sur une série de mesures de liaison totale et non spécifique du peptide MR 6-D_0 avec le récepteur V_{1A} sur préparation membranaire.

Le mode d'affichage utilisé pour les clichés est le mode « RMS » pour « Root Mean Square ». Le logiciel prend en compte la racine carrée de la moyenne des intensités des pics pour les afficher par la suite à l'aide de filtres correspondant aux molécules d'intérêt. Ce mode d'imagerie est le plus adapté car il permet de moyenner le signal des peptides et le bruit de fond pour en faire ressortir le premier.

IX.A. Sélection des filtres de masse pour l'affichage des résultats

Dans l'optique de visualiser les peptides par l'imagerie, une étape indispensable une fois les données acquises est la définition de filtres de couleur basés sur un rapport m/z et un intervalle autour de cette valeur pour afficher la répartition du signal sélectionné sur l'image de la plaque. Les filtres utilisés dans cette étude sont les suivant :

- MR 6-D_0 : jaune, 1 165 Th ± 0,25 % pour prendre en compte les pics A1, A2, A3 et A4.
- MR 6-D_4 : rouge, 1 171 Th ± 0,25 % pour prendre en compte les pics A1, A2, A3 et A4.
- EMC-09 : vert, 1 189 Th ± 0,25 % pour prendre en compte les pics A1, A2, A3 et A4.
- AVP – MR 4: vert, 1 085 Th ± 0,25 % pour prendre en compte les pics A1, A2, A3 et A4.

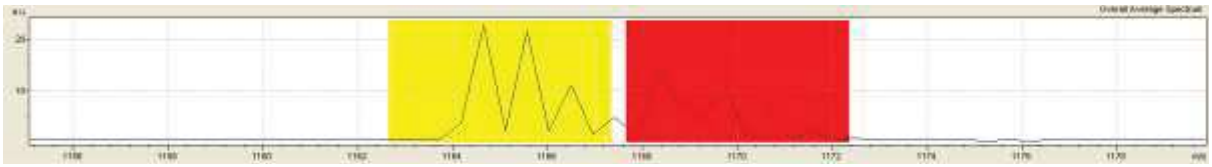


Figure 165 : Illustration de la sélection des filtres pour l'affichage des molécules ciblées

IX.B. Répartition du peptide MR 6-D_0 déposé seul

Les expériences d'imagerie MALDI ont été effectuées dans le but de visualiser la répartition du peptide au sein des dépôts, son uniformité ou bien la présence de points chauds. Cela a été fait pour le peptide MR 6-D_0 seul (voir Figure 166 ci-dessous).

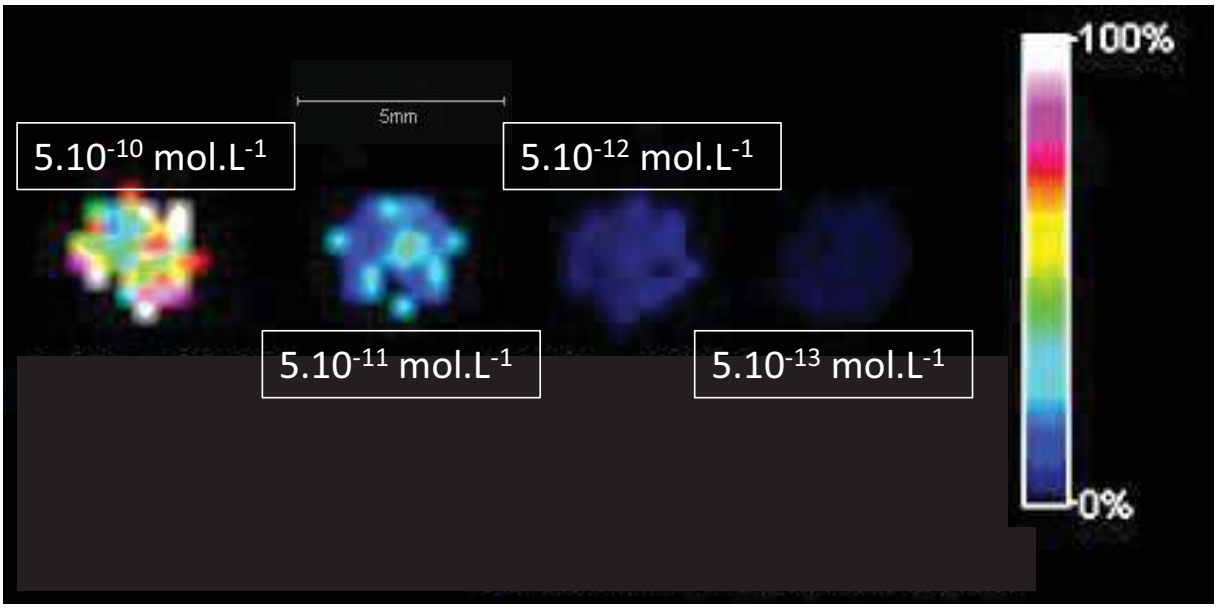


Figure 166 : Clichés d'imagerie de dépôts sur plaque AnchorChip – MR 6-D_0 (1 164, 6 ± 0,5 %)

Les dépôts de cette figure ont été réalisés avec le protocole GSP et démontrent une bonne répartition sur l'ensemble du dépôt et une bonne homogénéité. Le peptide est visible jusqu'à 5.10^{-13} mol.L^{-1}. En revanche, l'information primordiale pour les expériences ultérieures est la tendance du peptide à se concentrer massivement aux abords des dépôts, ce qui en fait une cible privilégiée en termes de zone où rechercher les peptides d'intérêt (voir Figure 167 ci-dessous).

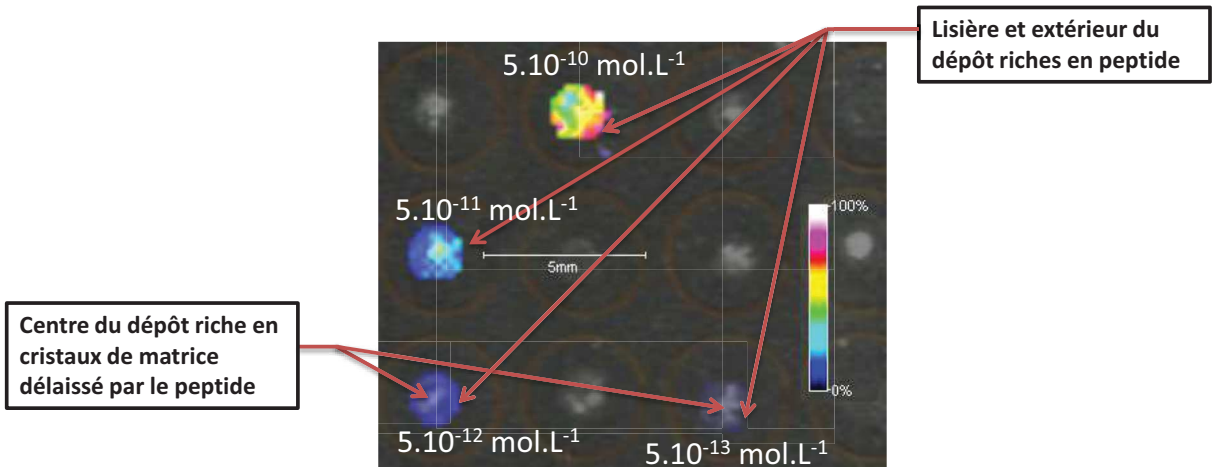


Figure 167 : Illustration de la répartition du peptide d'intérêt MR 6-D_0 au sein de dépôts qui met en évidence une tendance à se concentrer sur les bords du puit

IX.C. Clichés d'imagerie issue de mélanges MR 6-D_0 / MR 6-D_4

Les clichés présentés dans ce paragraphe illustrent la répartition du MR 6-D_0 et de son étalon deutéré (MR 6-D_4) au sein de dépôts issus de leur mélange afin de visualiser la répartition des peptides selon les conditions optimisées présentées dans le Tableau 51 ci-dessous.

Solution de matrice	HCCE 1 (0,4 mmol.l^{-1} ; MeCN)
Protocole de dépôt	GSP-M1/2
Solution d'analyte	H_2O + 1 % TFA

Tableau 50 : Paramètres utilisés pour l'imagerie sur dépôts effectués pour une expérimentation d'étalonnage en présence de MR 6-D_0 et MR 6-D_4 en mélange

Dans un premier temps, en appliquant les filtres séparément il est possible de constater la présence de nombreux points chauds et de la détection des deux peptides quel que soit le dépôt considéré (voir Figure 168 ci-dessous).

Figure 168 : Cliché d'imagerie représentant la répartition du peptide d'intérêt (MR 6-D_0, à gauche en jaune) et de l'étalon deutéré (MR 6-D_4, à droite en rouge)

Les peptides ont été déposés à des concentrations variables en ce qui concerne le MR 6-D_0 et à concentration fixe concernant l'étalon MR 6-D_4 pour simuler le cadre de la quantification (voir Tableau 51 ci-dessous). Les deux clichés d'imagerie montrent une répartition similaire suivant des points chauds des deux peptides d'intérêt avec une intensité variable en faveur de la molécule hydrogénée ou deutérée selon le dépôt. Les dépôts ne montrent pas de disparité dans la répartition des peptides, ce qui est confirmé par le cliché suivant.

Entrée	MR 6-D_0 (nmol.L^{-1})	n (fmol)	MR 6-D_4 (nmol.L^{-1})	n (fmol)
1	10	10	1	1
2	10	10	1	1
3	1	1	1	1
4	1	1	1	1
5	0,1	0,1	1	1
6	0,1	0,1	1	1

Tableau 51 : Numérotation des dépôts de MR 6-D_0 et MR 6-D_4 en mélange associés aux concentrations et quantités de matières déposées pour un volume déposé de 1 µL

Le cliché d'imagerie suivant (voir Figure 169 ci-dessous) montre la superposition des deux peptides d'intérêt avec une bonne cocristallisation matérialisée par les nuances d'orange visibles.

Cependant, les peptides n'étant pas pour chaque dépôt dans le même rapport de concentration (voir Tableau 51 ci-dessus), cela peut laisser l'impression qu'il existe des disparités sur l'ensemble du dépôt. La solution qui existe et quoi doit être mise en application lors de l'analyse revient à effectuer plusieurs séries de tirs laser à différents endroit en en conservant une dans la mémoire tampon du logiciel pour comparer deux séries de tirs pour être capable de répéter un résultat et confirmer l'enregistrement d'une série comme étant représentative de l'ensemble du dépôt. En effet, il est tout à fait possible, sur le dépôt 6 par exemple, de tirer à un endroit où seul l'étalon MR 6-D_4 sera présent. Une simple répétition de la série de tirs sur une autre zone permettra de montrer que le spectre enregistré n'est pas représentatif de l'ensemble du dépôt qui pourra ensuite être répétée une à deux fois de plus pour confirmer le résultat et le conserver.

Figure 169 : Cliché d'imagerie représentant la superposition des deux peptides (MR 6-D_0 et MR 6-D_4)

En conclusion, les peptides cocristallisent bien ensemble, mais des différences de concentrations peuvent faire apparaître une différence de répartition entre les peptides. Cela implique donc de comparer au moins deux à trois séries de tirs laser qui doivent donner un spectre montrant des proportions identiques entre le massif isotopique du MR 6-D_0 et celui du MR 6-D_4 avant de pouvoir conserver un spectre.

IX.D. Clichés d'imagerie sur dépôts de mélange MR 6-D_0/ MR 6-D_4 / EMC-09

Les clichés suivants présentent la répartition du MR 6-D_0et de son étalon deutéré (MR 6-D_4) au sein de dépôts issus de mélanges MR 6-D_0/ MR 6-D_4 / EMC-09 afin de visualiser la répartition des peptides selon les conditions optimisées (voir Tableau 50 p.297). Le rajout d'un troisième peptide permet d'étudier la cocristallisation du point de vue de l'imagerie avec un composant supplémentaire au mélange conçu pour être détecté de manière optimale sur une autre plate-forme

analytique. Cela permet d'avoir une idée de la répartition de multiples molécules notamment en vue d'un développement en termes de multiplexage.

Entrée	[MR 6-D_0] ($nmol.L^{-1}$)	n (fmol)	[MR 6-D_4] ($nmol.L^{-1}$)	n (fmol)	EMC-09 ($nmol.L^{-1}$)	n (fmol)
7	10	10	1	1	10	10
8	10	10	1	1	10	10
9	1	1	1	1	10	10
10	1	1	1	1	10	10
11	0,1	0,1	1	1	10	10
12	0,1	0,1	1	1	10	10

Tableau 52 : Numérotation des dépôts de MR 6-D_0, MR 6-D_4 et EMC-09 en mélange associés aux concentrations et quantités de matières déposées pour un volume déposé de 1 µL

Les peptides ont été déposés à des concentrations variables en ce qui concerne le MR 6-D_0 et à concentration fixe concernant l'étalon MR 6-D_4 et le second peptide (EMC-09) pour simuler le cadre de la quantification (voir Tableau 52 ci-dessus).

Le cliché suivant (voir Figure 170 ci-dessous) montre une répartition sur l'ensemble du dépôt, davantage prononcé sur les bords de chaque dépôt, comme cela a été le cas pour systématiquement tous les dépôts. En effet, les nuances d'orange sur les différents dépôts confirment la bonne cocristallisation des différents composés malgré leurs différences de concentration qui peut aller jusqu'à 1:10 dans le cadre de cette étude. De nombreux points chauds sont clairement présents suite au séchage et à la cocristallisation de l'ensemble des composés et la plupart du temps hors du puit central. Ce qui, d'un point de vue fondamental est un avantage puisque de petits points chauds tels que ceux-ci peuvent tirer profit de l'effet photoélectrique pour améliorer l'ionisation des peptides.

Figure 170 : Cliché d'imagerie représentant la superposition des deux peptides (MR 6-D_0 et MR 6-D_4)

L'image suivante filtre uniquement le troisième peptide utilisé dans cette étude (EMC-09). Celle-ci montre également une bonne répartition de la molécule autour de points chauds, eux aussi concentrés aux bords de la zone de dépôt et hors du puit. Néanmoins ce peptide semble réparti différemment par rapport aux deux peptides d'intérêt pour la quantification par MALDI-SID-MS (voir Figure 171 ci-dessous).

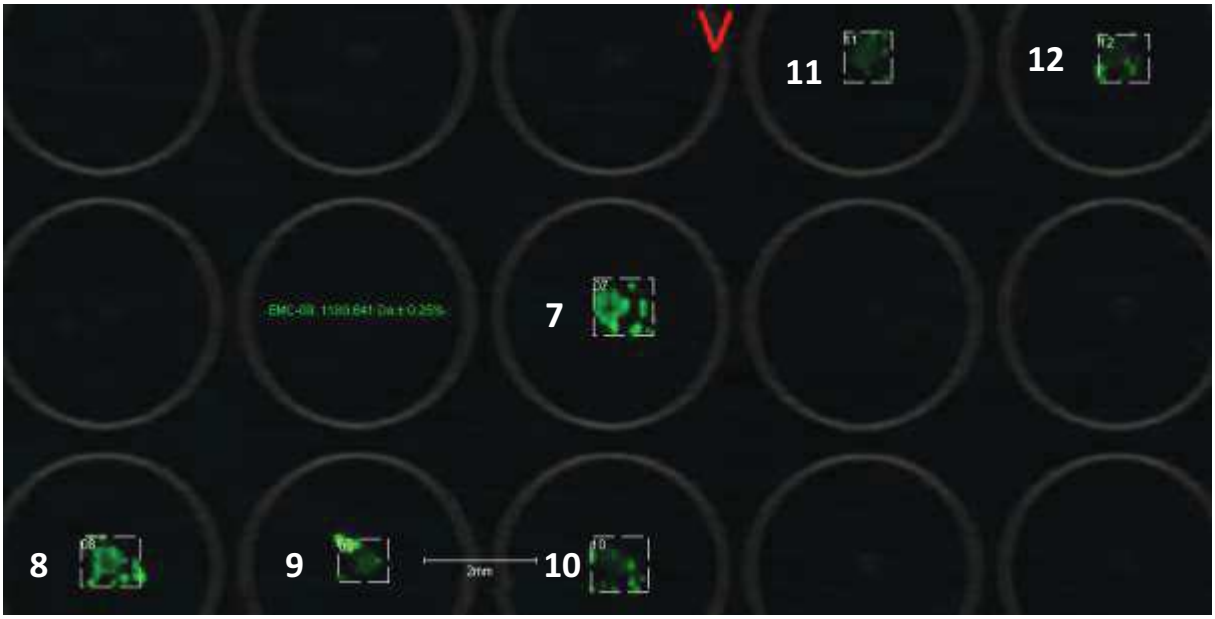


Figure 171 : Cliché d'imagerie représentant la répartition d'un peptide additionné (EMC-09) au mélange

Le dernier cliché (voir Figure 172 ci-dessous) montre les filtres correspondant aux trois peptides appliqués simultanément. Cela permet de constater que les nuances d'orange, essentielles pour assurer une quantification fiable, sont bien présentes et très peu ou pas colocalisées avec le peptide EMC-09 (en vert). Dans le cadre de ces travaux, cela est très satisfaisant puisque cette absence de colocalisation permet de se soustraire à toute compétition à l'ionisation lors des tirs lasers localisés sur une zone ciblée ne présentant pas ce peptide. Cependant, dans l'optique d'un multiplexage de la méthode de quantification, c'est un point auquel il faudra porter une attention particulière et pour lequel les expériences d'imagerie seront une clé pour s'assurer de sa fiabilité.

Figure 172 : Cliché d'imagerie représentant la superposition des trois peptides (MR 6-D_0 et MR 6-D_4 et EMC-09)

IX.E. Imagerie issue d'une expérience de saturation

Dans ce paragraphe nous allons nous intéresser à la répartition des peptides dans les conditions de dépôts issus d'expérience de pharmacologie.

IX.E.1. Imagerie sur la liaison totale

Nous allons tout d'abord nous focaliser sur des clichés d'imagerie réalisés sur des dépôts effectués à partir des solutions contenant les peptides dissociés des récepteurs, en l'occurrence du récepteur V_{1A} (voir Tableau 53 ci-dessous) dans les conditions optimisées (voir Tableau 50 p.297).

Entrée	MR 6-D_0 (nmol.L^{-1})	n (fmol)	MR 6-D_0 lié mesuré (nmol.L^{-1})	n (fmol)	MR 6-D_4 (nmol.L^{-1})	n (fmol)
1	600	600	247	247	100	100
2	300	300	226	226	100	100
3	150	150	229	229	100	100
4	75	75	136	136	100	100
5	38	38	62	62	100	100
6	19	19	32	32	100	100
7	9,4	94	4	4	100	100

Tableau 53 : Numérotation des dépôts provenant d'une mesure de liaison totale associés aux concentrations et quantités de matières déposées pour l'analyse de la liaison totale et un volume déposé de 1 µL

Les deux clichés suivants (voir Figure 173 ci-dessous) montrent que la répartition de chacun des deux peptides d'intérêt est identique pour chaque dépôt. Cela démontre que les peptides cocristallisent bien ensemble autour de points chauds même s'ils sont à différents rapports molaires (voir Tableau 53 ci-dessus). De plus, lors d'une acquisition de spectre, une telle cocristallisation

assure que le laser utilisé pour la désorption/ablation/ionisation des molécules touchera un mélange homogène de peptides pour obtenir un spectre représentatif de ce mélange.

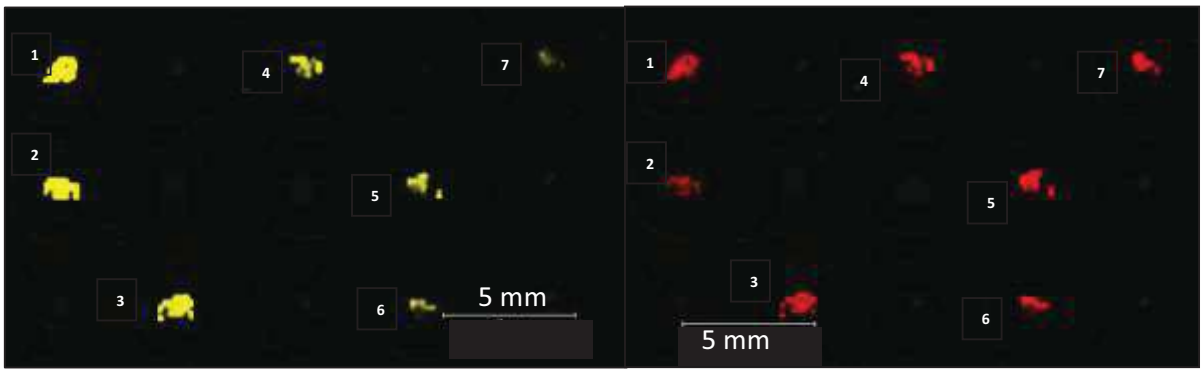


Figure 173 : Cliché d'imagerie représentant la répartition du peptide d'intérêt (MR 6-D_0, à gauche en jaune) et de l'étalon deutéré (MR 6-D_4, à droite en rouge) lors de la mesure de la liaison totale

Sur l'image suivante, seules des teintes orangées attestant de la superposition du MR 6-D_0 en jaune et du MR 6-D_4 en rouge sont présentes. Cela démontre le fait que quelle que soit la concentration déposée, les peptides cocristallisent bien et que la quantification ne souffrira d'aucun biais dû à un dépôt inhomogène pour la détermination ultérieure des constantes d'affinité.

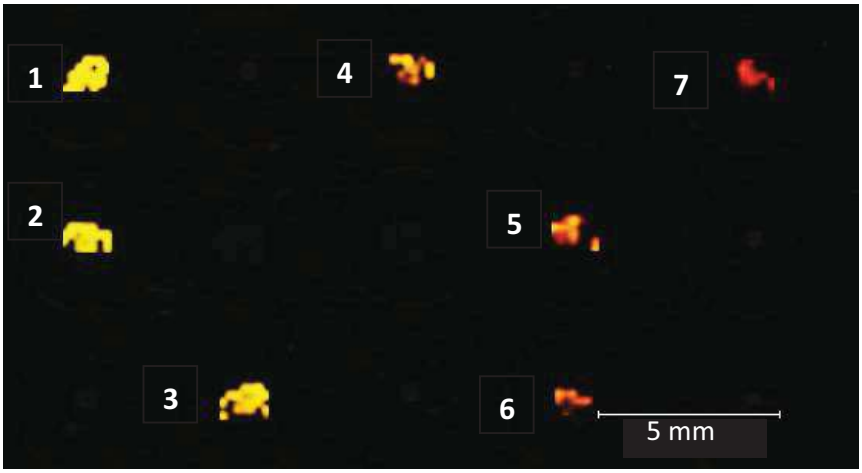


Figure 174 : Cliché d'imagerie représentant la répartition des deux peptides cocristallisés lors de la mesure de la liaison totale

IX.E.2. Imagerie sur la liaison non spécifique

Les mêmes expériences d'imagerie ont été effectuées sur les dépôts issus de la mesure de liaison non spécifique. En effet, ces expériences comprennent l'ajout d'un compétiteur qui va saturer le récepteur V_{1A}, autrement dit un troisième peptide en mélange. Il est alors nécessaire de visualiser la répartition au sein du dépôt de ces peptides pour vérifier la fiabilité de la quantification ultérieure. Les concentrations et quantités de matière déposées sont décrites dans le Tableau 54 ci-dessous.

Entrée	JMV4854 mis en jeu (nM)	n (fmol)	JMV4854 calculée (nM)	n (fmol)	JMV4854-d_4 (nM)	n (fmol)
1	600	600	634	634	100	100
2	300	300	301	301	100	100
3	150	150	120	120	100	100
4	75	75	78	78	100	100
5	38	38	29	29	100	100
6	19	19	524	524	100	100
7	9,4	9,4	61	61	100	100

Tableau 54 : Numérotation des dépôts provenant d'une mesure de liaison non spécifique associés aux concentrations et quantités de matières déposées pour l'analyse de la liaison non spécifique correspondante et un volume déposé de 1 µL

Les observations tirées de deux clichés suivants (voir Figure 175 ci-dessous) sont du même ordre que ce qui a été obtenu concernant la mesure de liaison totale, à savoir : une répartition des deux peptides sur l'ensemble du dépôt autour de points chauds principalement aux bords des dépôts et à l'extérieur des puits.

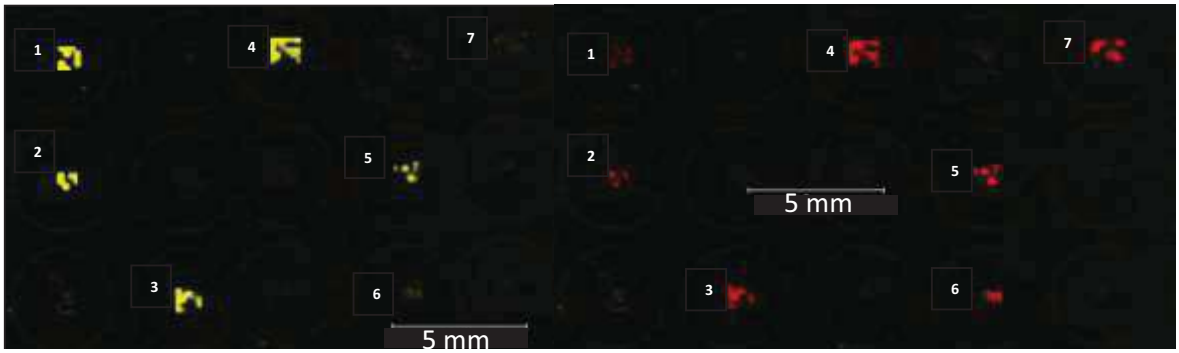


Figure 175 : Cliché d'imagerie représentant la répartition du peptide d'intérêt (MR 6-D_0, à gauche en jaune) et de l'étalon deutéré (MR 6-D_4, à droite en rouge) lors de la mesure de la liaison non spécifique

Dans ce cas-ci également (voir Figure 176 ci-dessous), la superposition des deux filtres correspondant aux deux peptides montre une répartition homogène sur l'ensemble du dépôt des deux composés traduite par les nuances d'orange, ce qui une fois de plus assure la fiabilité de la quantification par MALDI-SID-MS via des tirs laser qui impacteront de manière identique l'analyte (MR 6-D_0) et l'étalon (MR 6-D_4).

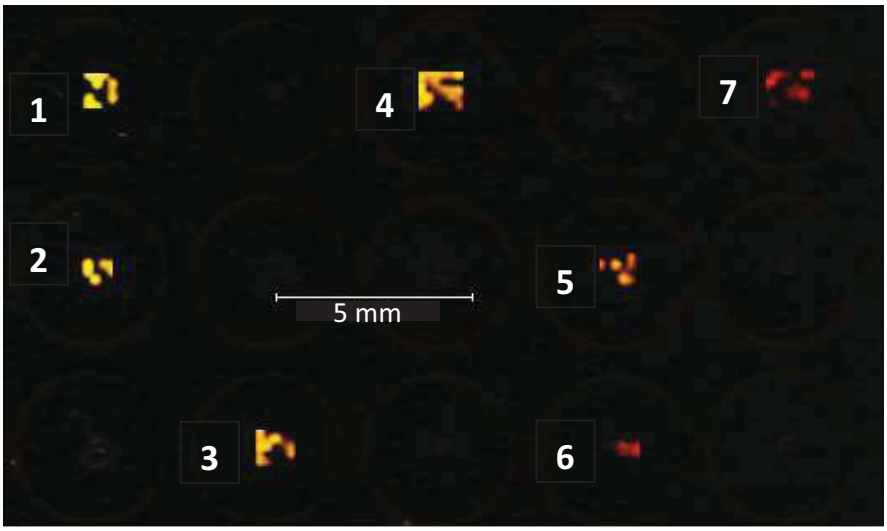


Figure 176 : Cliché d'imagerie représentant la répartition des deux peptides cocristallisés lors de la mesure de la liaison non spécifique

L'image de la Figure 177 ci-dessous filtre uniquement le compétiteur en excès pour la mesure de la liaison non spécifique. Ce cliché montre une répartition de la molécule autour de points chauds, eux aussi concentrés aux bords de la zone de dépôt et hors du puit. Néanmoins ce peptide semble réparti différemment et de manière bien plus localisée par rapport aux deux peptides d'intérêt pour la quantification par MALDI-SID-MS.

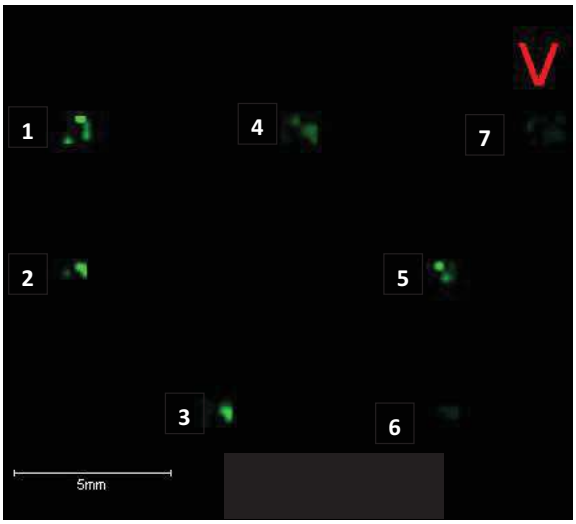


Figure 177 : Cliché d'imagerie représentant la répartition de l'AVP dans les dépôts lors de la mesure de la liaison non spécifique

Le dernier cliché (voir Figure 178 ci-dessous) montre les filtres correspondant aux trois peptides appliqués simultanément. Cela permet de constater que les nuances d'orange, essentielles pour assurer une quantification fiable, sont bien présentes et très peu ou pas perturbées par l'AVP qui reste très localisée et dont les nuances de vert sont à peine visibles. Dans le cadre de ces travaux, cela est très satisfaisant puisque cette absence de colocalisation sur l'ensemble du dépôt permet de

se soustraire à toute compétition à l'ionisation lors des tirs lasers localisés sur une zone ciblée ne présentant pas d'AVP.

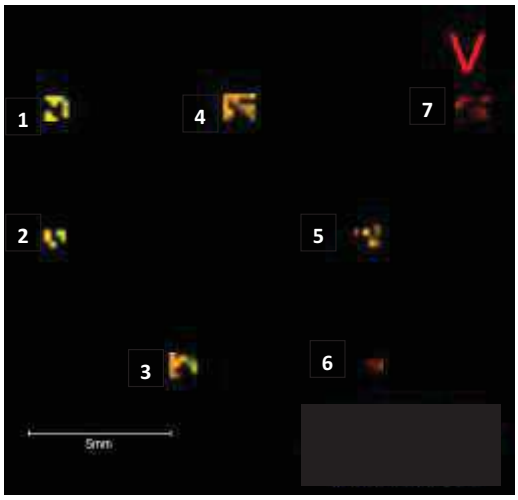


Figure 178 : Cliché d'imagerie représentant la superposition des filtres correspondant aux trois peptides (MR 6-D_0 et MR 6-D_4 et MR 6– AVP)

En conclusion de cette étude par imagerie, il est important de retenir que les peptides d'intérêt aussi bien l'analyte que l'étalon cocristallisent parfaitement bien autour de points chauds essentiellement regroupés aux abords des puits et à l'extérieur de ces dernier, assurant une ionisation optimale en tirant parti de l'effet photoélectrique. En outre, la présence d'un troisième peptide, quel qu'il soit (conçu pour l'expérience de pharmacologie ou pour une autre plate-forme de détection), n'interfère pas du tout ou très peu avec la cristallisation des deux peptides principaux, assurant une quantification parfaitement fiable du point de vue de la répartition des composés sur la surface de la plaque MALDI.

X. Etude de détection du peptide MR 6-D_0 en ESI sur QqQ et Q-ToF

Dans ce paragraphe, nous allons nous focaliser sur des essais effectués par ionisation ESI du peptide dont le marquage a été conçu spécifiquement pour la spectrométrie de masse MALDI et évaluer son comportement.

X.A. Expériences de détection par MRM sur QqQ

Ces expériences de détection du peptide MR 6-D_0 par suivi de transition en MRM ont été conduites pour évaluer la capacité du marquage HCCA, spécifiquement conçu pour l'ionisation MALDI, à fournir des ions en grande quantité et démontrer ou non son utilité envers une autre technique d'ionisation, à savoir l'ESI. Le choix des transitions à étudier a été effectué et validé suite à l'analyse préliminaire d'un spectre de fragmentation du peptide. Cela a permis d'observer deux transitions majeures à suivre pour une détection fiable du peptide (voir Figure 179 ci-dessous). Les transitions étudiées prennent place entre le peptide dichargé à 583,3 Th et un fragment à 321,3 Th

qui correspond à l'ion a_1 (également bien visible en MALDI-MS) d'une part, et entre le peptide dichargé à 583,3 Th et un fragment relativement intense en ESI à 524,6 Th, dont l'intensité relative est très faible en MALDI-MS, qui correspond à l'ion y_4*.

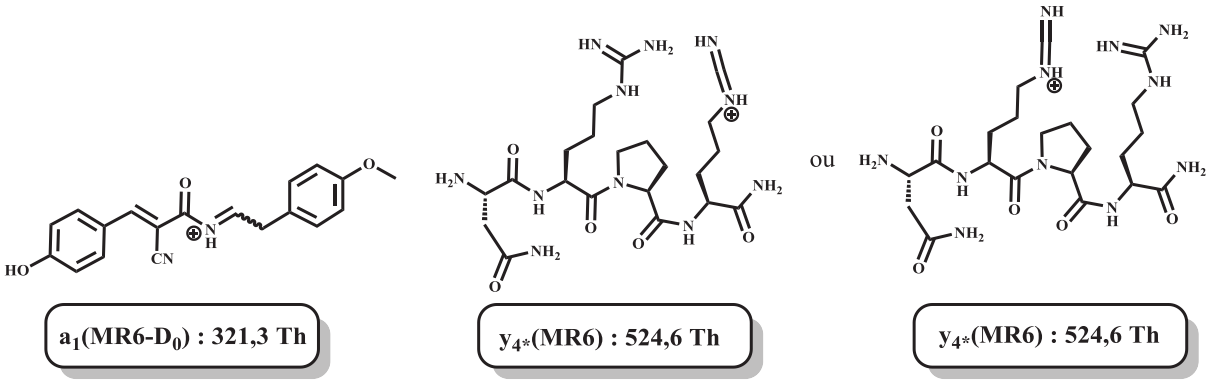


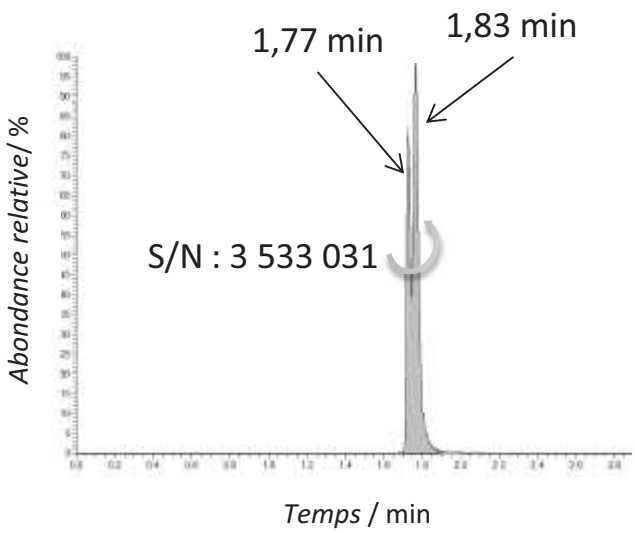
Figure 179 : Fragments y_{4*} et a_1 observé en MRM sur QqQ. Ils serviront à la détection spécifique et sensible par MRM en suivant les transitions 582,8 → 524,6 et 582,8 →321,3 pour un ion parent dichargé

Ces expériences ont été sujettes à une optimisation des conditions expérimentales du QqQ. L'optimisation des conditions d'analyse se fait automatiquement grâce au logiciel eXcalibur et son ensuite éditée sous forme d'un fichier et affichées (voir Tableau 55 ci-dessous). Le prérequis pour cela est de définir les transitions qui devront être scrutées et suivis par l'appareil.

	Value	Readback	Unit
Tension de spray	4500	4517	V
Température du vaporiseur	396	397	K
Pression du gaz de gaine	20	20	Psi
Pression de gaz de balayage d'ions	2	2	Psi
Pression de gaz auxiliaire	5	5	K
Température du capillaire	273	273	V
Tension d'offset du tube	SRM Table	241	V
Offset du skimmer	-14	-14	V
Pression de collision	1,4	1,4	Psi
Energie de collision	SRM Table	-28 +14	V

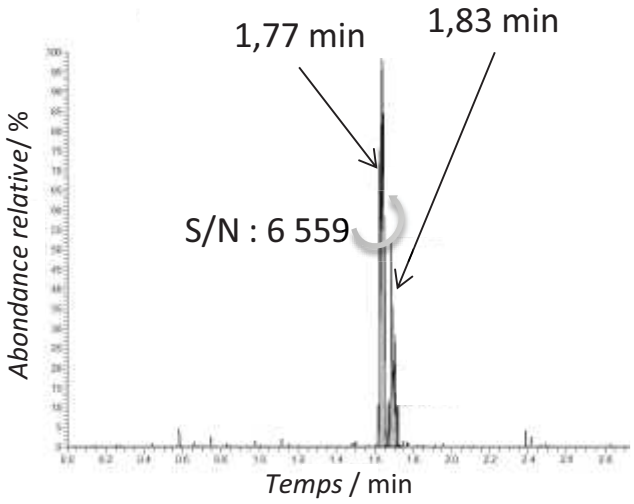
Tableau 55 : Conditions optimisées de MRM

Le Chromatogramme 1 ci-dessous montre qu'à 100 µmol.L^{-1} le peptide est parfaitement visible grâce au suivi des transitions spécifiques définies ci-dessus (voir Figure 179 ci-dessus). Il est même possible de discerner deux pics qui correspondent aux deux stéréoisomères du MR 6-D_0 du fait de la présence de la molécule HCCA sur la fonction N-terminale et de l'équilibre entre ses formes « Z » et « E » dont il a été question au paragraphe IV.C p.244.



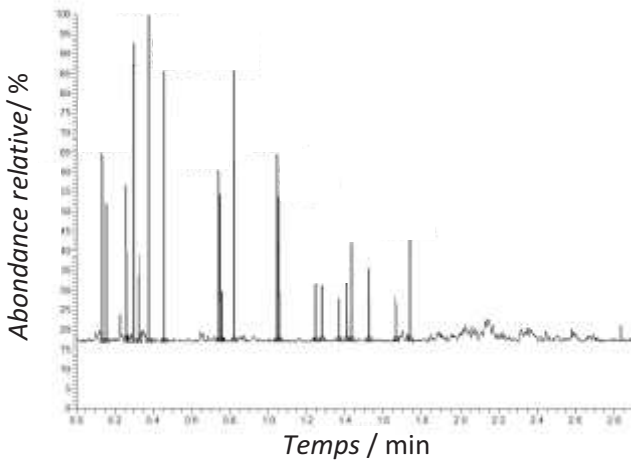
Chromatogramme 1 : Chromatogramme MRM de suivi de transition du peptide MR 6-D_0 à une concentration injectée de 100 µmol.L^{-1}

En s'intéressant au Chromatogramme 2 ci-dessous, on s'aperçoit que les transitions sont toujours visibles, avec toutefois un bruit de fond plus important et des rapports S/N des pics 1 000 fois inférieurs à ceux du Chromatogramme 1 ci-dessus, ce qui est inhabituel dans le cas de peptides standards ne comportant pas de marqueur en position N-terminale sachant que les concentrations sont liées par un facteur 10.



Chromatogramme 2 : Chromatogramme MRM de suivi de transitions du peptide JMV4854 à une concentration injectée de 10 µmol.L^{-1}

Par la suite, les résultats ont permis de montrer qu'il était possible de détecter le peptide d'intérêt (MR 6-D_0) jusqu'à une concentration de 10 µmol.L^{-1} sans ambigüité. Ceci demeurant bien loin de la limite de détection obtenue en MALDI qui a été fixée à 5.10^{-13} mol.L^{-1}.



Chromatogramme 3 : Chromatogramme MRM de suivi de transitions du peptide MR 6-D_0 à une concentration injectée de 1 µmol.L^{-1}

En conclusion de ce paragraphe, les expériences de suivi de transition par MRM d'un peptide marqué à l'HCCA montrent qu'il n'est pas possible de détecter de tels peptides, de façon fiable, en dessous de 10 µmol.L^{-1}. Ce qui amène à la conclusion que le marquage par HCCA de peptides ne permet pas d'obtenir une sensibilité en détection également les performances obtenus en MALDI-MS, technique analytique pour laquelle le marquage a été spécifiquement conçu.

X.B. Expériences de détection sur Synapt-G2-S

Après avoir effectué les expériences de détection sur triple quadripôle, les peptides ont été analysés sur le Synapt G2-S afin de tirer partir de son efficacité et de sa sensibilité en détection dans le cas de ces peptides en particuliers. Les expériences ont eu pour objet d'étude le peptide MR 5, qui ne comporte pas de fragment HCCA, et le peptide MR 6-D_0 marqué par le fragment HCCA. Certains paramètres ont subi une optimisation notamment la tension de cône et la tension du capillaire, deux paramètres fortement impliqués dans l'ionisation de type ESI. Malgré cela, les résultats (voir Tableau 56 ci-dessous) ont montré qu'il n'était pas possible de détecter les peptides analysés en-dessous de la micromole par litre.

Concentration injectée (mol.L^{-1})	MR 5- Homo-HO-LVA (aire)	MR 6-D_0 (aire)
10^{-6}	62 894	29 027
10^{-7}	n.d	n.d
10^{-8}	n.d	n.d
10^{-9}	n.d	n.d
10^{-10}	n.d	n.d

Tableau 56 : Présentation des aires correspondant aux ions à partir du courant d'ions extraits

Cette courte étude montre bien qu'une construction chimique dans une perspective analytique spécifiquement conçu pour une plate-forme d'analyse ne saurait être appliquée à une autre technique d'ionisation en atteignant la même sensibilité.

XI. Le modèle ligand/récepteur AVP/V_{1A}

XI.A. Les différents supports pour la mesure de la liaison d'un ligand à son récepteur membranaire

Il existe deux supports possibles pour effectuer des expériences de mesure de la liaison d'un ligand envers son récepteur membranaire. Le premier étant la cellule entière maintenue en culture dans un milieu nutritif adapté et dans des conditions adéquates au développement des colonies de cellules. En ayant recours à des cellules modifiées pour surexprimer un récepteur en particulier, en l'occurrence celui nécessaire à l'étude souhaitée, il est alors possible de réaliser la mesure de la liaison de la molécule à son récepteur qui traduit son affinité. Le second support existant est la préparation membranaire. Celle-ci s'obtient à partir de cellules dont les récepteurs sont surexprimés pour les besoins de l'étude, le résultat étant l'obtention des membranes cellulaires contenant le récepteur souhaité en suspension dans une solution. Cela permet d'obtenir une solution plus homogène de récepteurs pouvant contenir une grande quantité de récepteurs. Cependant cela nécessite quelques étapes de plus pour la préparation des membranes.

XI.A.1. Travail sur préparation membranaire

La préparation des membranes est un long processus qui débute par la modification des cellules lors d'une étape appelée « transfection », puis la culture de celles-ci qui comprend des étapes de repiquage avant d'arriver à la préparation des membranes à proprement parler.

XI.A.2. La transfection : principe général appliqué aux cellules CHO-V_{1A}

Dans le cadre de ces travaux de thèse, le gène codant pour le récepteur V_{1A} a été transfecté par B. MOUILLAC à l'IGF de Montpellier dans des cellules CHO de manière stable pour être surpexprimé. Ceci sera le système cellulaire qui servira de modèle aux études pharmacologiques décrites aux paragraphes XI.B et XI.C de ce chapitre.

La transfection consiste en l'intégration d'un brin d'ADN sous forme de plasmide dans une cellule, en l'occurrence CHO (Chinese Hamster Ovary cell). La transfection, dont il est question ici, permet l'intégration d'un gène codant pour la protéine membranaire V_{1A}, donc la séquence primaire intégrée à la membrane cellulaire est représentée en Figure 180 ci-dessous. A celui-ci est associé un second gène codant pour une résistance à une drogue notée « Geneticin G-418 Sulfate ». Cette résistance permettra au moment de la croissance des cellules d'opérer une sélection des cellules ayant intégré le gène codant pour V_{1A}. En effet les deux gènes étant associés, la survie des cellules

grâce à leur résistance signifiera que le plasmide aura bien été intégré et que, par conséquent, la cellule exprimera la protéine membranaire V_{1A}.

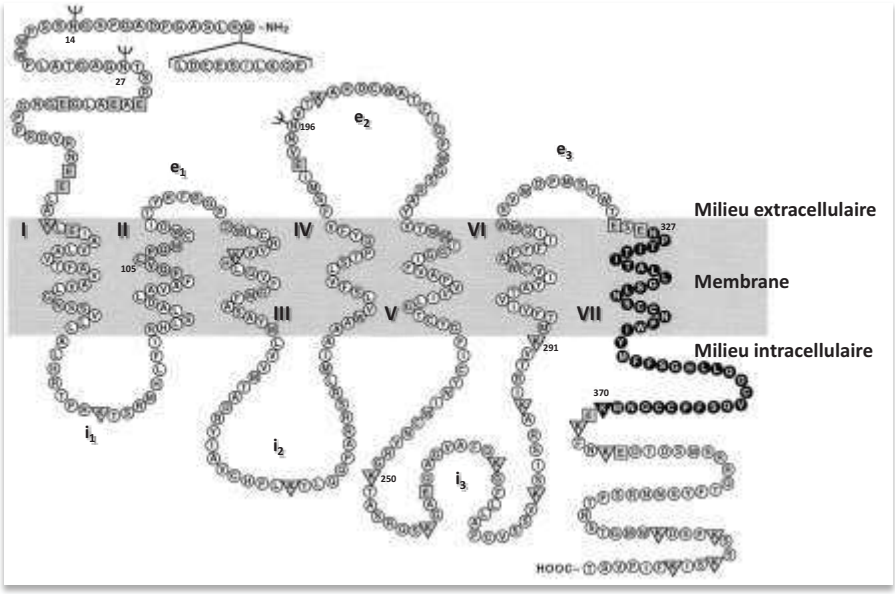


Figure 180 : Enchaînement des résidus d'acides aminés qui composent la séquence du récepteur V_{1A} obtenu à partir d'ADNc. Les fourches symbolisent des sites potentiels de glycosylation[576]

Le brin d'ADN transfecté est un ADNc (cDNA en Anglais pour « coding **d**esoxyribo**n**ucleic **a**cid » ou « complementary **d**esoxyribo**n**ucleic **a**cid ») qui est une copie fidèle de l'ARN (RNA en Anglais pour « **r**ibo**n**ucleic **a**cid ») ne contenant pas les « introns ». Les « introns » sont des zones de l'ARN qui ne codent pas pour un composé mais qui ont néanmoins un rôle d'hybridation. Cela signifie que ces zones qui ont des affinités particulières entre elles peuvent induire une boucle dans la séquence qui peut par la suite être reconnue et coupé par une enzyme. Cela ayant pour conséquence le retrait d'une partie en particulier de l'ARN, d'où le terme d'hybridation. Ce brin est constitué d'une partie régulatrice et d'une partie structurelle. La première va réguler l'activation du codage du gène, tandis que la seconde contient les informations codantes du gène, c'est-à-dire vouées à être transcrites puis traduites en protéine. Dans ce cas-là, la partie régulatrice est constitutive du CMV (« **c**yto**m**égalo**v**irus »)[577,578] qui agit en tant que promoteur pour contrôler la transfection. Ainsi le gêne transfecté est en permanence activée dans les cellules grâce à des agents stimulants présents dans V_{1A} et amenés par le milieu de culture. Par voie de conséquence la cellule transfectée exprime en permanence la protéine V_{1A} à sa surface.

Le même processus peut être appliqué pour d'autres récepteurs à d'autres lignées cellulaires, car tous les récepteurs ne peuvent pas tous être surexprimés de manière stable dans n'importe

[576] S. Phalipou, N. Cotte, E. Carnazzi, R. Seyer, E. Mahe, S. Jard, C. Barberis, B. Mouillac, *J. Biol. Chem.* **1997**, *272*, 26536–26544
[577] Wenger R.H. et al, *Anal. Biochem.* **1994**, *221*(2): 416-418
[578] Liu Z. et al, *Anal. Biochem.* **1997**, *246*(1): 150-152

quelle cellule. Il est possible de citer l'exemple du récepteur CCK-B (ou CCK-2) qui est exprimé de manière stable au sein de la lignée cellulaire HEK293 pour « Human Embryon Kidney 293 cells ».[579] L'étude de ce récepteur nécessite donc l'utilisation d'une autre lignée cellulaire avec des conditions différentes de sélection et de transfection[580] et un milieu de culture différent.[581]

XI.A.3. Le Repiquage

Les cellules, en l'occurrence de la lignée CHO-V_{1A}, incubent dans un incubateur, réglé à 37 °C avec un flux de CO_2 à 5% qui sert à maintenir un pH élevé avec la participation des carbonates et bicarbonates une fois le gaz dissous en solution.[582] Elles sont contenues dans des flacons dont un côté de plus grande surface a été traité pour permettre l'adhésion des cellules sur la paroi et leur croissance dans de bonnes conditions. Il est admis pour les cellules cancéreuses, comme les CHO-V_{1A} que leur population double toutes les 24 h. Cet intervalle est à prendre en compte au moment du repiquage. Lors de la croissance cellulaire, un composé supplémentaire, la généticine[583], est ajoutée. Ce composé est une drogue qui va entraîner la destruction des cellules n'exprimant pas la protéine V_{1A}. En effet lors de la transfection, étape qui permet d'intégrer le gène codant pour la protéine V_{1A} dans la cellule, un second gène est associé pour induire une résistance à la généticine. Ainsi les cellules exprimant V_{1A} résistent également à la généticine et restent les seules à croître dans le milieu de culture.

Le repiquage est effectué lorsque les cellules sont dites confluentes, c'est-à-dire qu'elles ont atteint leur population maximale pour un contenant donné présentant une surface donnée. Au-delà de celle-ci, les cellules en surpopulation se mettent à produire des composés acides en trop grande quantité, ce qui constitue un stress pour elles-mêmes et risque de nuire à leur développement pour *in fine* conduire à leur mort. Lorsque le milieu de culture devient jaune/orangé, cela signifie que les cellules sont confluentes et qu'il est temps de les repiquer.

[579] P. Laverman, S. Roosenburg, M. Gotthardt, J. Park, W. J. G. Oyen, M. de Jong, M. R. Hellmich, F. P. J. T. Rutjes, F. L. van Delft, O. C. Boerman, *Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging* **2008**, *35*, 386–392.
[580] B. Olszewska-Pazdrak, C. M. Townsend, M. R. Hellmich, *J. Biol. Chem.* **2004**, *279*, 40400–40404
[581] G. Yan, L. Zhang, T. Fang, Q. Zhang, S. Wu, Y. Jiang, H. Sun, Y. Hu, *FEBS Lett.* **2012**, *586*, 3263–3270
[582] B. Chini, B. Mouillac, Y. Ala, M. N. Balestre, S. Trumpp-Kallmeyer, J. Hoflack, J. Elands, M. Hibert, M. Manning, S. Jard, *EMBO J.* **1995**, *14*, 2176–2182
[583] Geneticin G418-sulfate

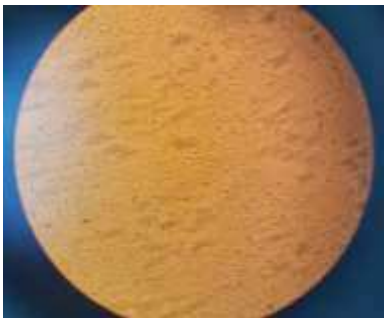


Figure 181 : Cellules confluentes observées au microscope optique

Le repiquage se déroule en plusieurs étapes et sous hotte stérile à flux laminaire en salle de culture cellulaire dédiée. La première étape consiste en l'aspiration du milieu de culture qui est envoyé dans un erlenmeyer contenant de l'eau de javel. Le but étant de détruire le matériel biologique. Ceci permet un traitement de solution aqueuse standard par la suite. La deuxième étape est le lavage des cellules avec une solution de PBS (« Phosphate Buffered Saline ») qui ne doit pas contenir de sérum car celui-ci comporte des protéines qui inhiberaient l'action ultérieure de la trypsine. La troisième étape, quant à elle, est un ajout de solution de ladite trypsine dans le flacon d'incubation avec une agitation douce. Ceci ayant pour objectif et conséquence de couper les liaisons qu'ont créées les cellules avec la paroi du flacon pour les mettre en suspension et ainsi pouvoir les prélever. Il est également possible de décrocher mécaniquement les cellules sans avoir recours à l'ajout de trypsine. La quatrième étape est fonction du nombre de jours prévus de croissance des cellules et consiste en le prélèvement d'une fraction de la solution de cellules confluentes à déposer dans un nouveau flacon incubateur. En effet, l'objectif est d'arriver à obtenir un échantillon de cellules confluentes au bout de « n » jours sachant que la population cellulaire doublera à chaque journée passé. Ce qui donne une fraction $1/2^n$ à repiquer. Par exemple pour obtenir des cellules confluentes le lundi en les repiquant le vendredi, sachant qu'il y a 3 jours il faudra en prélever $1/2^3$ = 1/8. La fraction minimale pouvant être prélevée étant admise à 1/30, au-delà de laquelle les cellules sont trop diluées et redémarrent leur croissance beaucoup plus lentement et avec plus de difficulté. En pratique la limite est fixée à 1/20 avec un maximum de 30 repiquages au-delà desquels les cellules ne parviennent plus à croître correctement. La cinquième étape consiste en l'ajout d'un milieu de culture complet qui comprend : un milieu de culture standard (commercial) avec des éléments nutritifs et contenant 19 des 20 acides aminés essentiels mis à part la glutamine qui se dégrade au cours du temps, une solution de glutamine fraîche, des antibiotiques et du sérum. Ce sérum peut provenir d'embryon de veau, de cheval, de bœuf ou de veau nouveau-né. Le milieu de culture standard peut également contenir ou non du rouge de phénol en fonction des récepteurs mis en jeu dans les expériences prévues. En effet, les récepteurs à œstrogène sont sensibles au motif

phénolique du rouge de phénol qui induit une activité anti œstrogénique et un fort bruit de fond.[584] C'est la raison pour laquelle il existe des milieux de culture commerciaux sans rouge de phénol. Le milieu de culture une fois complet doit ensuite être incubé (au dernier moment) à 37 °C juste avant de l'ajouter à la solution de cellules. Après cela, les cellules vont se mettre à adhérer à la paroi chimiquement traitée et entamer leur croissance. Une seule paroi est traitée avec des fonctions ammonium, similaires à des lysines, qui permettent aux cellules d'adhérer à la paroi. La sixième et dernière étape est la mise à l'incubateur du flacon ainsi préparé.

Figure 182 : Repiquage de cellules en flacon

La préparation des membranes se fait en plusieurs étapes qui diffèrent légèrement de celles prévues pour le repiquage des cellules. La première étape consiste en l'aspiration du milieu de culture suivi de l'ajout d'une quantité suffisante de trypsine pour recouvrir la surface sur laquelle ont adhéré les cellules. Il est également possible de décrocher mécaniquement les cellules sans avoir recours à l'ajout de trypsine. Une fois que les cellules sont bien décrochées elles sont aspirées et transférées dans un falcon en complétant par du milieu de culture avant centrifugation. Cela permet de diluer la trypsine pour éviter qu'elle n'endommage les cellules. La solution de cellules en suspension est alors centrifugée à 1 000 tours/minute pendant 10 minutes. Le surnageant est éliminé par aspiration dans un erlenmeyer contenant de l'eau de javel. La deuxième étape est un lavage par deux fois avec une solution de PBS des cellules du culot suivis de centrifugations et éliminations du surnageant. Par la suite on ajoute du tampon BH (tampon de liaison des expériences de saturation à l'équilibre et de liaison compétitive) qui contient de la bacitracine, un antibiotique produit par *Bacillus subtilis* utilisé comme inhibiteur d'isomérase de protéine disulfure (PDI pour « Protein Disulfide Isomerase).[585]

[584] J. E. Moreno-Cuevas, D. A. Sirbasku, *In Vitro Cell. Dev. Biol. Anim.* **2000**, *36*, 447–464.
[585] N. Dickerhof, T. Kleffmann, R. Jack, S. McCormick, *FEBS Journal* **2011**, *278*, 2034–2043

Composé	Titre/concentration
BSA	1 $mg.mL^{-1}$
Tris	50 $mmol.L^{-1}$
$MgCl_2.6H_2O$	5 $mmol.L^{-1}$
EDTA	2,5 $mmol.L^{-1}$
Bacitracine	30 $\mu g.mL^{-1}$

Tableau 57 : Composition du tampon de liaison « BH »

Ce tampon peut également contenir du PMSF[586] pour arriver à un volume total de d'environ 9,6 mL à aliquoter par 400 µL dans des eppendorfs. Le PMSF est un inhibiteur de protéases pour protéger les membranes de la dégradation due aux enzymes libérées lors des cycles de congélation/décongélation décrits à l'étape suivante. La troisième étape fait suite à l'aliquotage des cellules et consiste donc en des cycles de congélation/décongélation à -180 °C dans l'azote liquide. Ils doivent être supérieurs à 1 et inférieurs à 4, habituellement 2 cycles sont effectués. Ceci ayant pour but de faire éclater les cellules pour récupérer les membranes. La quatrième étape est la centrifugation des aliquots et l'élimination du surnageant. Le culot qui contient les membranes est conservé et on rajoute 400 µL de tampon BH par aliquot. Enfin, les différents micro-tubes sont stockés à -80 °C en conservant un aliquot pour le dosage des protéines.

XI.A.4. Le comptage des cellules

Le comptage des cellules permet, en connaissant leur nombre, de pouvoir estimer le nombre de récepteur moyen par cellule après estimation du B_{max}. Cela permet de connaître le nombre approximatif de cellules dans un flacon de culture au moment du repiquage (ou de la préparation de membranes) quand les cellules sont confluentes.

Le comptage des cellules est relativement approximatif car basé sur un contrôle visuel d'une solution supposée homogène (car préparée de telle sorte qu'elle le soit) contenant les cellules. Le contrôle se fait sur une cellule de MALLASEZ. Cette cellule est une épaisse lamelle en verre sur laquelle est gravé un carré de 1 mm×1 mm, subdivisé en 10 carrés sur la longueur et 10 carrés dans la largeur eux-mêmes subdivisés en 5×4 carrés, formant ainsi une grille régulière qui va faciliter le comptage.

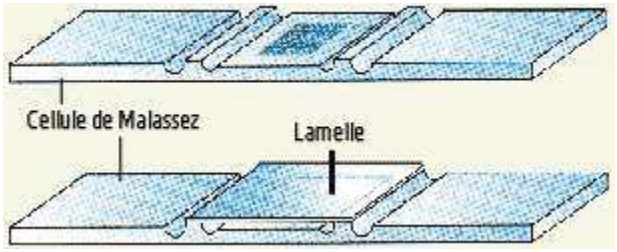


Figure 183 : Cellule de Mallassez

[586] Phenylmethylsulfonyl fluoride – CAS : 329-98-6

Autour de la grille de comptage il y a deux surélévations de 1 mm sur lesquelles on pose une lamelle. Cela créé une zone de 1 mm^3 dans laquelle on insère un peu de la solution contenant les cellules à compter. Cela permet de rapporter le nombre de cellules comptées à 1 mm^3 pour extrapoler cette quantité et en déduire la quantité de cellules totale dans l'échantillon. Parmi les échantillons testés au laboratoire, le nombre de cellules dans l'un d'eux a été estimé à 200 millions de cellules selon cette méthode de calcul sachant que 8 flacons pouvant contenir chacun 30 millions de cellules environ ont été utilisés.

XI.A.5. Dosage des membranes

Le dosage selon la méthode de Bradford est une méthode de dosage des protéines spécifique et sensible à celles-ci, insensible aux interférences, bon marché, rapide et simple. Elle a gagné en popularité dans le cadre d'études écologiques de plantes.[587,588] Cette méthode repose sur la liaison entre l'indicateur coloré appelé « bleu brillant de Coomassie G-250 » et une protéine qui produit un complexe absorbant à 595 nm. L'indicateur coloré existe sous plusieurs formes, dont une cationique, neutre et anionique. Cependant, seul l'anion se lie à une protéine. L'anion réactif n'est pas libre au pH de l'indicateur coloré mais il est généré en présence de protéine. L'indicateur coloré requiert des conditions spécifiques pour une liaison avec des macromolécules présentant des groupements fonctionnels particuliers comme une arginine, un autre résidu basique ou aromatique. De plus, l'indicateur coloré ne se liera pas avec des acides aminés libres, des polypeptides de bas poids moléculaire (moins de 6 à 10 résidus) ou toute autre molécule contenant de l'azote ou présentant des similitudes avec une protéine. Pour que la méthode fonctionne, il faut que la protéine soit en solution pour permettre une bonne liaison avec l'indicateur coloré.[589]

Cette méthode de dosage des protéines a également été largement utilisée pour le dosage de protéines animales. Une étude a permis de démontrer la linéarité de cette méthode pour une gamme de titre de protéine BSA[590] en tant que gamme étalon, celui-ci devant alors être comprise entre 0,2 et 2 mg/mL. Cette conclusion a été rendue possible suite à une étude théorique et expérimentale sur de l'albumine de sérum bovin. La partie théorique de cette étude a permis de mettre en avant l'intervalle de titre de protéine BSA dans lequel une relation linéaire liait ce dernier à la densité optique mesurée grâce à l'utilisation de modèles mathématiques. Une autre publication fait état d'une précision accrue dans le dosage de protéines via cette méthode de Bradford. [591] Les auteurs ont eu recours à l'utilisation d'un modèle mathématique basé sur une normalisation de mesures par rapport aux différents résidus acides aminés des protéines utilisées pour obtenir des

[587] S. H. Faeth, *Ecology* **1985**, *66*, 870–875
[588] R. F. Denno, L. W. Douglass, D. Jacobs, *Ecology* **1986**, *67*, 116–123
[589] Jones, C. G.; Daniel Hare, J.; Compton, S. J. *J. Chem. Ecol.* **1989**, *15*, 979
[590] Bovin Serum Albumin
[591] Ku, H.-K.; Lim, H.-M.; Oh, K.-H.; Yang, H.-J.; Jeong, J.-S.; Kim, S.-K. *Anal. Biochem.* **2013**, *434*, 178

données avec une fiabilité accrue. Enfin la méthode a même été utilisée dans d'autres situations et en présence de polymères médicaux et de polymères de poly(éthylène glycol) démontrant ainsi son large champ d'utilisation.[592,593]

Le dosage des protéines membranaires de la lignée de cellules CHO-V_{1A} a été effectué sur un aliquot de préparation membranaire conservé pour l'opération. Le procédé consiste à tracer une droite d'étalonnage grâce à une gamme de BSA en solution. Dans un second temps, l'absorbance du tampon de BSA est mesurée afin d'être soustrait à la mesure d'absorbance de l'aliquot de préparation membranaire qui sera dilué dans ce tampon.

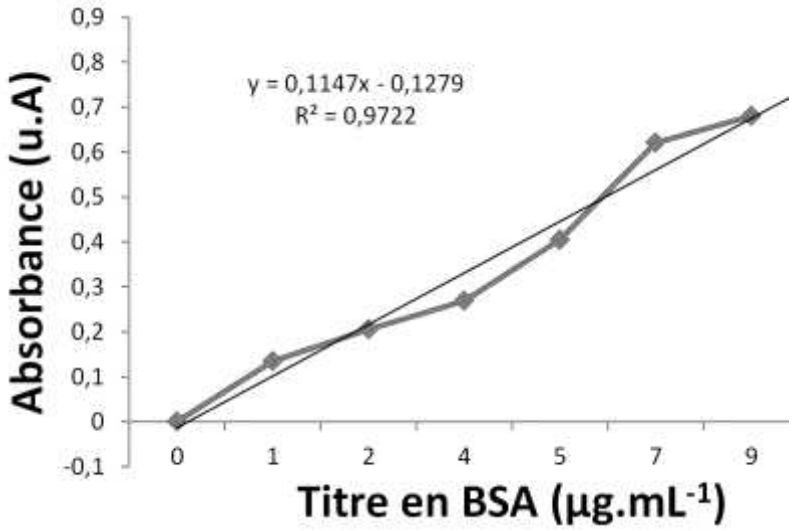


Figure 184 : Droite d'étalonnage pour la mesure de l'absorbance UV de solutions de préparation membranaire obtenues à partir de cellules CHO-V_{1A} surexprimant le récepteur V_{1A}

Enfin, plusieurs mesures de la préparation membranaires sont effectuées sur différents aliquots afin d'obtenir, grâce à la régression linéaire (voir Figure 184 ci-dessus) le titre de protéines pour chaque mesure effectuée (voir Tableau 58 ci-dessous). Dans le cas du lot de préparation membranaire, un titre en protéine moyen de 1,5 mg.mL^{-1} a été calculé et sera utilisé pour déterminer le nombre d'aliquots de préparation membranaire à utiliser pour chaque expérience de pharmacologie.

	Absorbance (u.A)	Titre de protéines membranaires (µg.mL^{-1})
Mesure 1	0,2121	1 480
Mesure 2	0,2351	1 590
Mesure 3	0,2351	1 580

Tableau 58 : Tableau donnant les mesures d'absorbance des préparations membranaires de cellule CHO-V_{1A} surexprimant le récepteur V_{1A} CCKB et des titres associés

[592] Barbosa, H.; Slater, N. K. H.; Marcos, J. C. *Anal. Biochem.* **2009**, *395*, 108
[593] Carlsson, N.; Borde, A.; Wölfel, S.; Åkerman, B.; Larsson, A. *Anal. Biochem.* **2011**, *411*, 116

XI.A.6. Les conditions particulières d'utilisation des préparations membranaires VS travail sur cellules entières

Le recours à des préparations membranaires dans le cadre d'expérience pharmacologique de type saturation/compétition peut être très intéressant car il est tout à fait possible de produire des membranes à partir de cultures cellulaires en grande quantité pour ensuite les entreposer au congélateur à -80 °C en vue d'une utilisation ultérieure car il est tout à fait possible de les conserver pendant une longue période au contraire des cellules. En effet, il faut prévoir une période durant laquelle faire les faire croître avant de pouvoir enchaîner par différents tests prévus dans lesquels les mettre en jeu. Parfois cela peut nécessiter un temps important en particulier lorsque les cellules sortent de conservation. Il faut alors prendre le temps de les faire remonter en température puis de les mettre en culture avant de les faire croître à nouveau. Cette phase de remise en culture peut être longue, une à deux semaines, avant de pouvoir les fractionner pour obtenir plusieurs lots de cellules.

Un autre point important à noter est le tampon utilisé pour manipuler les cellules et les membranes qui diffèrent en fonction de l'élément choisi. Le tampon BH (voir Tableau 57 p.314) est utilisé pour la manipulation des préparations membranaires. La BSA est utilisé pour empêcher la liaison non spécifique du ligand sur le contenant tandis que le TRIS et l'EDTA servent à équilibrer le pH à 7,4. Le chlorure de magnésium, quant à lui, était à l'origine utilisé pour faciliter la précipitation du complexe récepteur-radioligand lors d'une étape de centrifugation et a été depuis conservé, la bacitracine étant présente pour empêcher toute dégradation enzymatique des récepteurs. En ce qui concerne l'utilisation des cellules entières pour le même type d'expérience, le tampon diffère légèrement en ce sens qu'il doit correspondre de manière proche à un milieu de culture. C'est la raison pour laquelle du PBS (pour « Phosphate Buffer Saline ») est ajouté au chlorure de calcium et de magnésium auxquels peut être rajouté du PMSF pour protéger les cellules.

PBS	**96 %v (pH = 7,4)**
$CaCl_2.2H_2O$	1 mM
$MgCl_2.6H_2O$	5 mM
BSA	0,1 %w
PMSF	1 mM
Bacitracine	40 µg/mL

Tableau 59 : Composition du tampon de liaison TagLite® pour cellules entières

Les préparations membranaires sont réalisées selon un protocole établi. Tout d'abord, les cellules croissent dans un nombre donné de boîtes de culture cellualire jusqu'à confluence pour donner environ 10 millions de cellules par boîte. Suite à cela et après avoir rassemblé le contenu des boîtes, deux cycles congélation/décongélation dans l'azote liquide sont effectués avant la centrifugation à 10 000 g pendant 20 minutes et à 4 °C pour maintenir la préparation dans le froid

par mesure supplémentaire de précaution pour éviter toute dégradation. Par la suite, la préparation est fractionnée dans plusieurs microtubes contenant un volume identique et connu de solution tout en gardant une petite quantité pour le dosage des protéines de la préparation membranaire. Cela permet d'utiliser plus facilement et de façon plus indépendante des récepteurs membranaires en requérant toutefois des étapes de préparation supplémentaires.

XI.B. Expériences de saturation (radioactivité et MALDI)

Parmi les deux types d'expérimentations proposés dans de chapitre, l'ordre est important. En effet, il est nécessaire d'effectuer en premier lieu une mesure de la constante de dissociation par saturation à l'équilibre d'un ligand traceur, MR 6-D_0 dans le cadre de ce projet AVP/V_{1A}, qui servira dans un second temps à mesurer des constantes de dissociation de molécules non marquées par compétition à l'équilibre.

L'ensemble des résultats présentés dans les paragraphes suivant ont été obtenus à partir de mesures effectuées lors d'expériences ayant pour support des préparations membranaires, de cellule CHO-V_{1A} dans le cadre du projet AVP/V_{1A}. En outre l'ensemble des résultats présentés l'ont été avec les conditions optimisées de manipulation et de préparation des échantillons pour l'analyse par MALDI-SID-MS et ont bénéficié d'un étalonnage préalable selon la méthode décrite au paragraphe VIII p.290). Une discussion à propos du traitement des données sera proposée au paragraphe XI.D p.334.

XI.B.1. Saturation sur préparation membranaire CHO

Dans un premier temps, une expérience de mesure d'affinité du peptide d'intérêt, MR 6-D_0, a été effectuée sur une préparation membranaire à partir de cellules CHO non transfectées et donc ne présentant pas de récepteur V_{1A} surexprimé. Cela a été entrepris dans le but de confirmer l'absence de sites de liaison saturables sur une membrane de cellule non transfectée pour s'assurer d'un niveau de liaison basal nul.

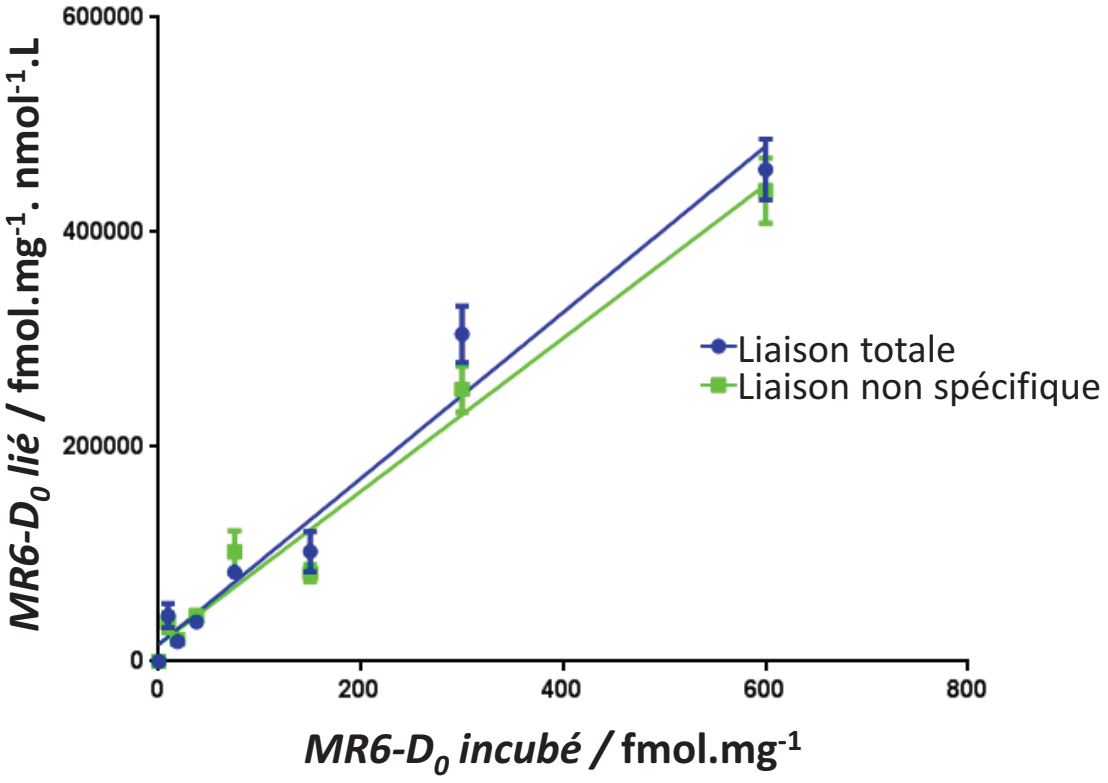


Figure 185 : Courbe de saturation obtenue par MALDI sur préparation membranaire CHO

La courbe présentée par la Figure 185 ci-dessus, a été obtenue par mesure de la liaison totale et non spécifique du MR 6-D_0. Le résultat constaté est un tracé de deux droites s'éloignant progressivement l'une de l'autre, avec donc une différence croissante, démontrant l'absence de liaison saturable et donc de liaison spécifique. Ceci permet d'obtenir un blanc biologique et l'assurance d'un bruit de fond biologique nul.

	Liaison totale (T)			**Liaison non spécifique (NS)**			
[MR 6-D_0] incubé en nmol.L^{-1}	Moyenne (fmol.mg^{-1})	SEM (fmol.mg^{-1})	CV (%)	Moyenne (fmol.mg^{-1})	SEM (fmol.mg^{-1})	CV (%)	**T – NS théorique (fmol.mg^{-1})**
600	458 353	28 393	15 %	438 627	30 408	17 %	**35 648**
300	305 020	26 445	21 %	253 804	21 352	21 %	**17 948**
150	102 510	18 273	44 %	82 353	7 773	23 %	**9 098**
75	83 431	6 002	18 %	102 275	19 315	46 %	**4 673**
38	36 784	5 409	36 %	43 020	4 348	25 %	**2 461**
19	18 400	1 662	20 %	20 569	1 908	23 %	**1 354**
9	42 608	11 251	65 %	36 196	9 200	62 %	**801**
0	0	0	-	0	0	-	**248**

Tableau 60 : Présentation des valeurs moyennes, de l'erreur sur la moyenne et le coefficient de variation concernant la mesure de liaison totale et non spécifique pour la Figure 185 p.319

Les résultats numériques sont présentés dans le Tableau 60 ci-dessus qui décrit également la différence entre les valeurs théoriques issues de régressions linéaires de la liaison totale et de la liaison non spécifique. L'information à en tirer est l'augmentation de cette différence qui concorde avec l'hypothèse selon laquelle une absence de surexpression du récepteur V_{1A} entraîne une absence de sites de liaison saturables par le peptide MR 6-D_0 et donc le tracer de droites correspondant à des sites de liaison non saturables.

XI.B.2. Mesure de radioactivité

Les expériences de mesure de radioactivité par scintigraphie ont eu pour objectif de caractériser dans un premier temps l'affinité du ligand marqué par de l'iode 125 envers le récepteur V_{1A}. Le protocole mis en œuvre est résumé avec la Figure 186 ci-dessous.

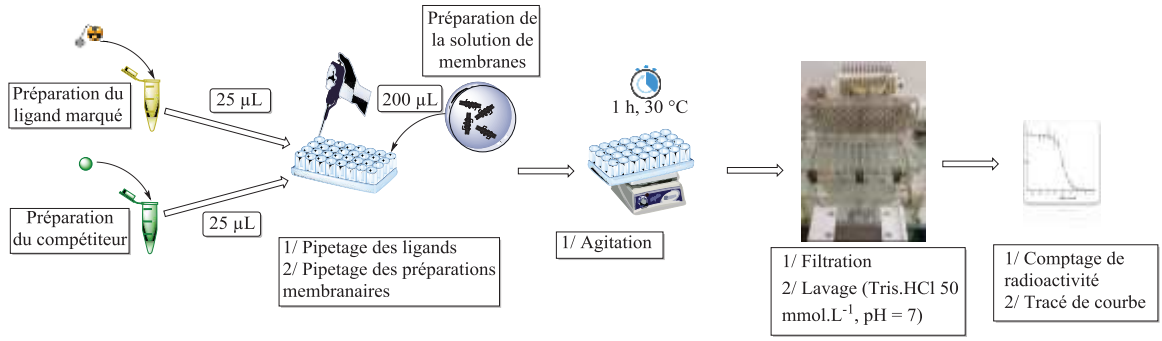


Figure 186 : Protocole pharmacologique résumé « at a glance » dans le cadre de l'analyse par scintigraphie

Cela a permis de mesurer dans un premier temps, la liaison totale du ligand [^{125}I]MR 5 envers le récepteur V_{1A}, puis dans un second temps la liaison non spécifique de celui-ci en ajoutant un compétiteur de forte affinité pour ce même récepteur en très large excès par rapport à [^{125}I]MR 5 et dont le rôle est de saturer le récepteur pour empêcher le ligand dont l'affinité est mesurée de se lier au récepteur. Cela conduit ce dernier à se lier sur des sites non spécifique. Ainsi, le ligand récupéré après filtration et lavage permet de déterminer cet aspect non spécifique (en vert, Figure 187 ci-dessous) de la liaison totale (en bleu, Figure 187 ci-dessous).

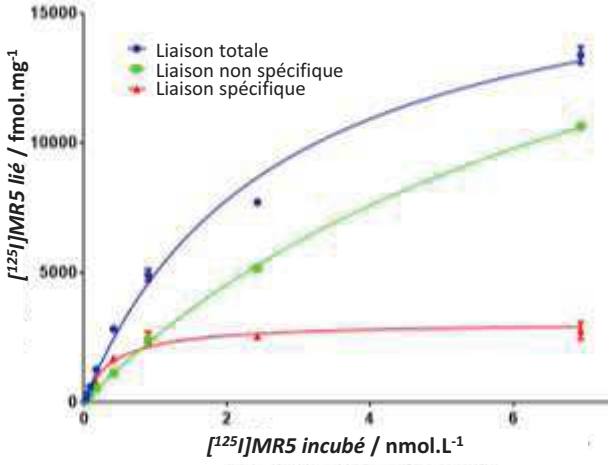


Figure 187 : Courbe de saturation du peptide MR 5 marqué à l'iode 125 pour une quantification par scintigraphie

Une fois les liaisons totales et non spécifiques mesurées, la seconde est soustraite à la première afin d'obtenir la composante spécifique de la liaison totale (en rouge, Figure 187 ci-dessus). Ce tracé des 2 composantes de la liaison totale et de cette dernière permet de déterminer le B_{max} comme étant la valeur asymptotique de l'équation mathématique modélisant la liaison spécifique. Le K_d, quant à lui, correspond à l'abscisse du point d'ordonné égal à 50 % de la valeur du B_{max}. Concernant ces expériences, la constante de dissociation a été évaluée à K_d ([^{125}I]MR 5) = 0,65 ± 0,25 nmol.L-1 et la quantité de sites de liaison à B_{max} ([^{125}I]MR 5) = 2,3 ± 0,7 fmol.mg^{-1}.

Il est intéressant de noter, concernant la liaison non spécifique que, dans un premier temps, celle-ci est assimilable à une droite entre les abscisses 0 et 0,9 avant de devenir, dans un second temps parallèle à la courbe de liaison totale. Cela est caractéristique d'une liaison spécifique arrivée à saturation et qui a, de fait, atteint une valeur maximale constante qui constitue la différence entre la valeur de liaison totale et la valeur de liaison non spécifique. D'où cet aspect parallèle aux hautes concentrations.

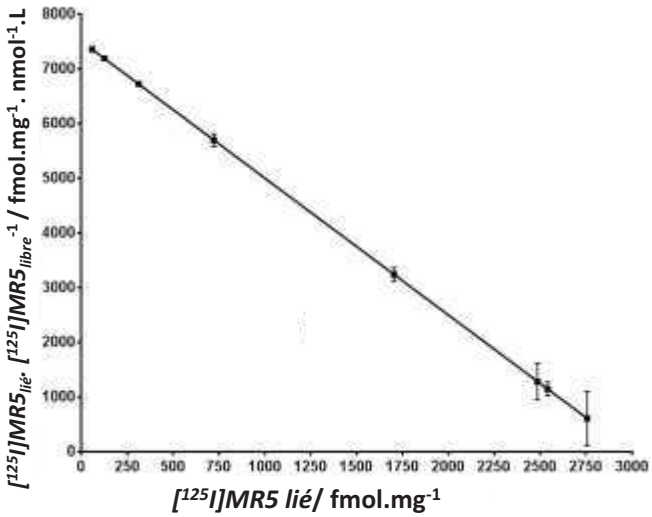


Figure 188 : Représentation de Scatchard de la Figure 187 p.321

La liaison spécifique de la Figure 187 ci-dessus peut-être décrite selon la représentation de Scatchard qui consiste à linéariser l'expression de la concentration en ligand lié (voir Figure 22 p.44). Le résultat est présenté par la Figure 188 ci-dessus. Cela permet de déterminer très aisément et précisément les valeurs de K_d et de B_{max} qui correspondent respectivement à l'opposé inverse de la pente et à l'ordonnée à l'origine de la droite.

	Liaison totale			Liaison non spécifique			Liaison spécifique		
[(^{125}I)MR 5] incubé en nmol.L^{-1}	Moyenne (fmol.mg^{-1})	SEM (fmol. mg^{-1})	CV (%)	Moyenne (fmol.mg^{-1})	SEM (fmol. mg^{-1})	CV (%)	Moyenne (fmol.mg^{-1})	SEM (fmol. mg^{-1})	CV (%)
6,94	13 392	199	3 %	10 636	119	2 %	2 756	199	13 %
2,43	7 720	62	1 %	5 180	23	1 %	2 541	62	3 %
0,90	4 906	134	5 %	2 421	23	2 %	2 486	134	9 %
0,41	2 826	50	3 %	1 123	29	5 %	1 703	50	5 %
0,17	1 260	46	6 %	538	4	1 %	722	46	11 %
0,09	588	4	1 %	277	16	10 %	311	4	2 %
0,04	273	8	5 %	147	2	2 %	125	8	11 %
0,02	131	4	5 %	74	1	1 %	57	4	12 %

Tableau 61 : Tableau résumé des points de mesure concernant la mesure de la constante de dissociation du peptide [^{125}I]Homo-HO-LVA ([^{125}I]MR 5) représenté par la Figure 187 p.321

Les résultats numériques d'une expérimentation sur les deux effectuées sont affichés dans le Tableau 61 ci-dessus. Il est intéressant de noter l'extrême précision des valeurs calculées pour l'ensemble des moyennes avec des erreurs de l'ordre du pourcentage ainsi que la précision des mesures avec des coefficients de variation de l'ordre de 10 %.

XI.B.3. Mesure MALDI

Dans le cadre de la mesure par MALDI-SID-MS, le protocole utilisé diffère dans les étapes menées mais toujours avec le même objectif. La première étape consiste à préparer le compétiteur à la concentration nécessaire au bon déroulement de l'expérimentation et le ligand dont l'affinité est recherchée aux différentes concentrations prévues.

La sélection des concentrations ne se fait pas de façon anodine puisqu'il s'agit de démarrer de faibles concentrations comme 10 % du K_d, valeur à laquelle une très faible proportion de ligand se liera au récepteur, jusqu'à des valeurs atteignant ou dépassant les 90 % du K_d auxquelles le ligand se liera en quantités beaucoup plus importantes.[594]

[594] C. A. Flanagan, in *Methods in Cell Biology*, Elsevier, **2016**, pp. 191–215

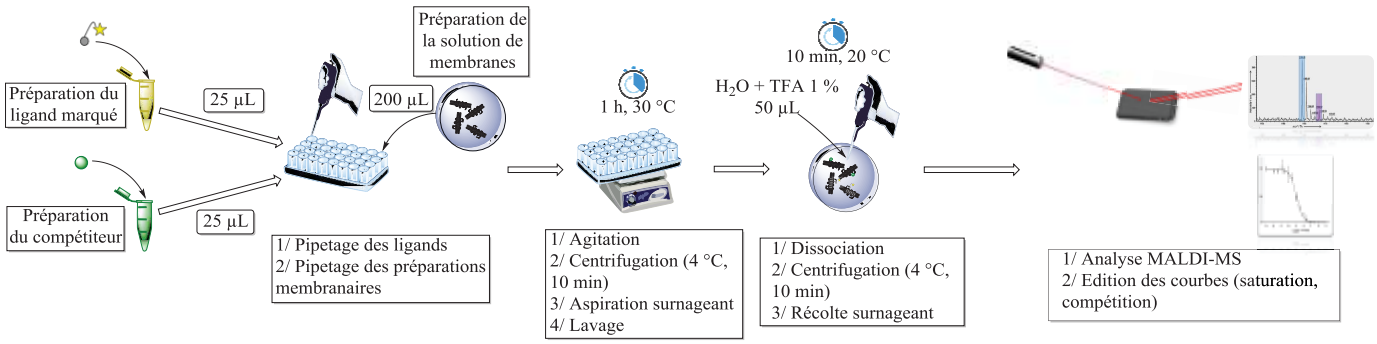


Figure 189 : Protocole pharmacologique résumé « at a glance » dans le cadre de l'analyse par MALDI-SID-MS

Une fois la gamme de concentration déterminée pour encadrer la valeur du K_d, la solution de membranes est ensuite préparée. Puis les différents éléments sont ajoutés en terminant par la solution de membranes pour « laver » les bords des micro-tubes. Par la suite les micro-tubes sont agités pour l'incubation à une température contrôlée de 30 °C pendant 1 h. La durée nécessaire pour atteindre l'équilibre est connue et oscille entre 45 et 60 minutes.[595] Par la suite, les micro-tubes vont subir une centrifugation, l'aspiration du surnageant et une étape de lavage. S'en suis alors la dissociation des ligands liés aux récepteurs, une centrifugation et enfin la récolte du surnageant qui contient les ligands libérés de leur récepteur (voir Figure 189 ci-dessus). Les échantillons sont conservés à -25 °C en vue de l'analyse par MALDI-MS et de l'édition des courbes de saturation ou de compétition opérée après la mesure et le tracé systématiques de courbes d'étalonnage.

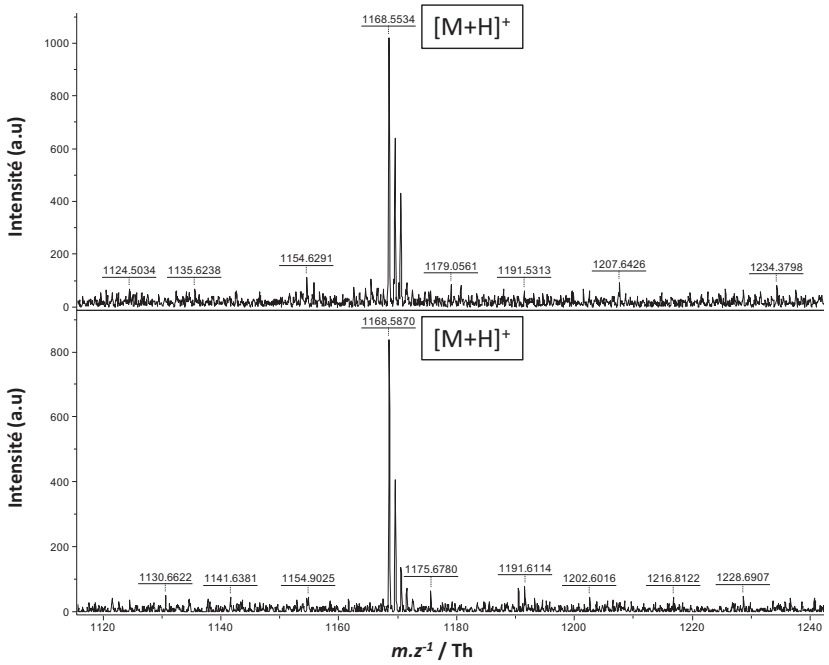


Figure 190 : Spectres MALDI obtenus à partir de réplicats contenant 0 nmol.L^{-1} de ligand traceur (blancs) auxquels a été ajouté l'étalon à 1 164,6 Th lors pour la quantification de la série de mesures complète

[595] A. Tahara, M. Saito, T. Sugimoto, Y. Tomura, K. Wada, T. Kusayama, J. Tsukada, N. Ishii, T. Yatsu, W. Uchida, et al., *British Journal of Pharmacology* **1998**, *125*, 1463–1470

Au cours de ces expériences, un triplicata de mesure a été destiné à la mesure de blancs en n'introduisant aucun ligand marqué. Cela a permis (voir Figure 190 ci-dessus), d'une part de montrer qu'il n'y avait aucun bruit de fond perceptible à la valeur de m/z attendue pour le peptide d'intérêt (m/z = 1 164,6 Th), d'autre part de légitimer une régression linéaire pour la mesure de liaison non spécifique par le point d'abscisse et d'ordonnée égales à 0. Le résultat graphique est présenté en Figure 191 ci-dessous. La liaison non spécifique a été tracée selon les valeurs obtenues par régression linéaire. Ce procédé est couramment utilisé dans la mesure où une liaison non spécifique est représentée par une droite de manière intrinsèque caractéristique de sites de liaison non saturables que sont les sites de liaison non spécifique.

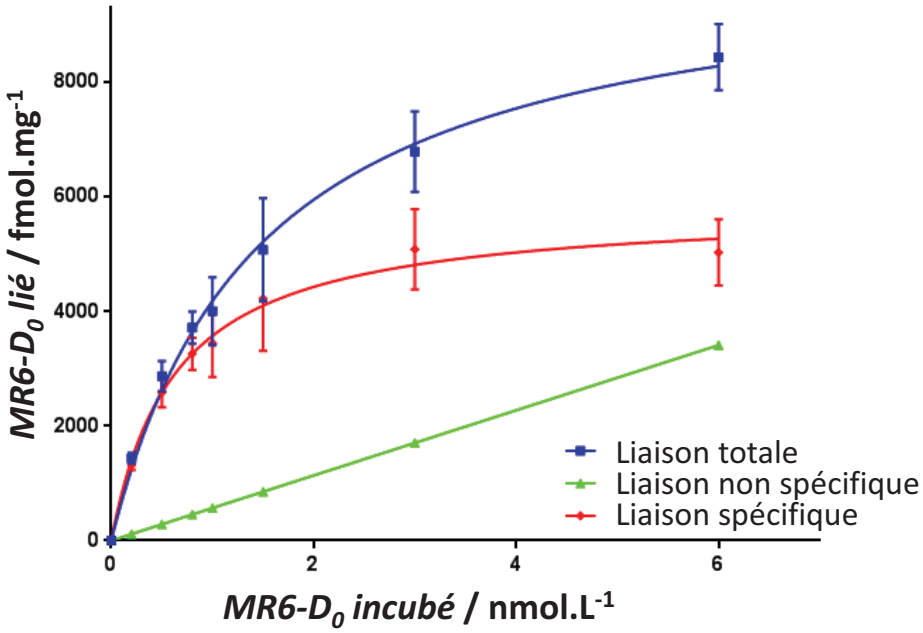


Figure 191 : Courbe de saturation du peptide MR 6-D_0 portant un marquage HCCA pour une quantification par MALDI-SID-MS après étalonnage préalable au cours de la même série d'analyses

Deux répétitions de cette expérience ont été effectuées puis analysées par MALDI-SID-MS. Les résultats ont donné des résultats cohérents pour obtenir une valeur de constante de dissociation K_d (MR 6-D_0) = 0,69 ± 0,24 nmol.L^{-1} associé à B_{max} (MR 6-D_0) = 5,5 ± 1,4 pmol.mg^{-1}. Ces valeurs bénéficient d'une erreur très satisfaisante compte-tenu du total de 3 séries de mesure effectuées.

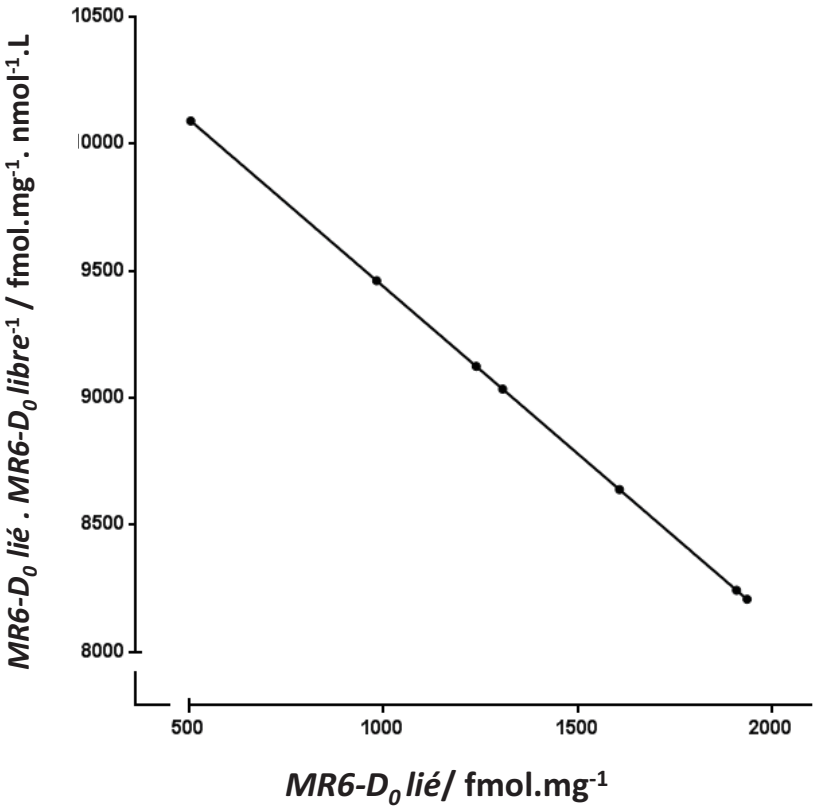


Figure 192 : Représentation de Scatchard de la Figure 191 p.324

Les valeurs ont été déterminées grâce au logiciel Graphpad Prism 6© qui utilise des algorithmes de calcul mathématique pour modéliser les courbes de liaison à partir des valeurs de ligand lié mesurées. Cela permet de s'affranchir de l'étape de linéarisation et de la représentation de Scatchard. Néanmoins celle-ci a été obtenue en effectuant le calcul des paramètres de la droite (pente et ordonnée à l'origine) puis tracée (voir Figure 192 ci-dessus).

	Liaison totale			**Liaison non spécifique**				**Liaison spécifique**		
MR 6-D_0 incubé en nmol.L^{-1}	**Moyenne (fmol. mg^{-1})**	SEM (fmol. mg^{-1})	CV (%)	**Régression linéaire (fmol. mg^{-1})**	Moyenne (fmol.mg^{-1})	SEM (fmol. mg^{-1})	CV (%)	**Moyenne (fmol. mg^{-1})**	SEM (fmol. mg^{-1})	CV (%)
6	**8 440**	578	17 %	**3413**	3 758	318	21 %	**5 032**	576	28 %
3	**6 791**	700	25 %	**1707**	1 311	141	26 %	**5 088**	700	34 %
1,5	**5 077**	903	44 %	**853**	750	270	88 %	**4 223**	906	53 %
1	**4 005**	590	36 %	**569**	224	-	-	**3 443**	589	42 %
0,8	**3 718**	279	18 %	**455**	225	-	-	**3 262**	280	21 %
0,5	**2 872**	262	22 %	**284**	0	0	-	**2 589**	262	25 %
0,2	**1 438**	92	16 %	**114**	0	0	-	**1 323**	91	17 %
0	**0**	0	-	**0**	0	0	-	**0**	0	-

Tableau 62 : Tableau résumé des points de mesure concernant la constante de dissociation du peptide MR 6-D_0 représenté par la Figure 191 p.324

Les résultats de l'expérience représentée par la Figure 191 p.324 sont résumés dans le Tableau 62 ci-dessus. Celui-ci reprend les moyennes des valeurs de titre calculées à partir des concentrations mesurées par MALDI-SID-MS. Ces dernières sont accompagnées de leur erreur et de leur coefficient de variation. La plupart des mesures affichent une précision convenable au travers de ces coefficients de variation de même que les erreurs sur les moyennes qui sont toutes de l'ordre de 10 %. Cela montre la précision des mesures effectuées compte-tenu de l'état de développement de la méthodologie et de la maîtrise des différentes étapes expérimentales et analytiques.

L'ensemble des données numériques à propos des deux stratégies de quantification est résumé dans le Tableau 63 ci-dessous. Cela permet de constater la similitude entre les deux mesures de constante de dissociation ce qui, d'une part prouve que la modification opérée en position N-terminale pour rendre le peptide détectable à des concentrations infimes n'a aucun impact sur l'affinité de ce dernier envers le récepteur, d'autre part que les deux stratégies sont équivalentes en terme de précision au niveau de la répétition des expériences via leurs erreurs sur leur moyennes respectives.

	MALDI-SID-MS	**Radiomarquage (scintigraphie)**
Ligand traceur	MR 6-D_0	[^{125}I]MR 5– [^{125}I]Homo-HO-LVA
Compétiteur (liaison non spécifique)	MR 4 – AVP	MR 4 – AVP
K_d (nmol.L^{-1})	0,69 ± 0,24 (n = 3)	0,65 ± 0,25 (n = 2)
B_{max} (pmol.mg^{-1})	5,5 ± 1,4	2,3 ± 0,7

Tableau 63 : Résumé des constantes de dissociation mesurées par MALDI-SID-MS et par scintigraphie par expérience de saturation à l'équilibre

XI.C. Expériences de compétition

XI.C.1. Mesure de radioactivité

Les expériences de compétition à l'équilibre ont été effectuées en plaçant le ligand peptidique traceur radiomarqué ([^{125}I]MR 5) à concentration constante correspondant à 50 % ou moins de la valeur du Kd, soit environ 0,2 nmol.L^{-1} dans le cas ce dernier, et ainsi éviter la saturation des récepteurs, condition *sine qua non* à une mesure fiable selon l'expression de l'équation de Cheng-Prusoff (voir Equation 1 p.45). Différents compétiteur à des concentrations variant de 10^{-12} à 10^{-5} mol.L^{-1} ont été mis en jeu dans le but d'évaluer leur constante de dissociation en mesurant l'IC_{50} qui correspond à la concentration en compétiteur à laquelle 50 % des récepteurs occupés le sont par ce compétiteur, le reste étant occupé par le ligand traceur. Cela permet, grâce à l'équation de Cheng-Prusoff de déterminer la constante de dissociation K_i du ligand dont l'affinité est recherchée.

Le résultat des deux expériences de compétitions effectuées une fois avec les peptides MR 6-D_0 et MR 5 sont représentés par la Figure 193 ci-dessous.

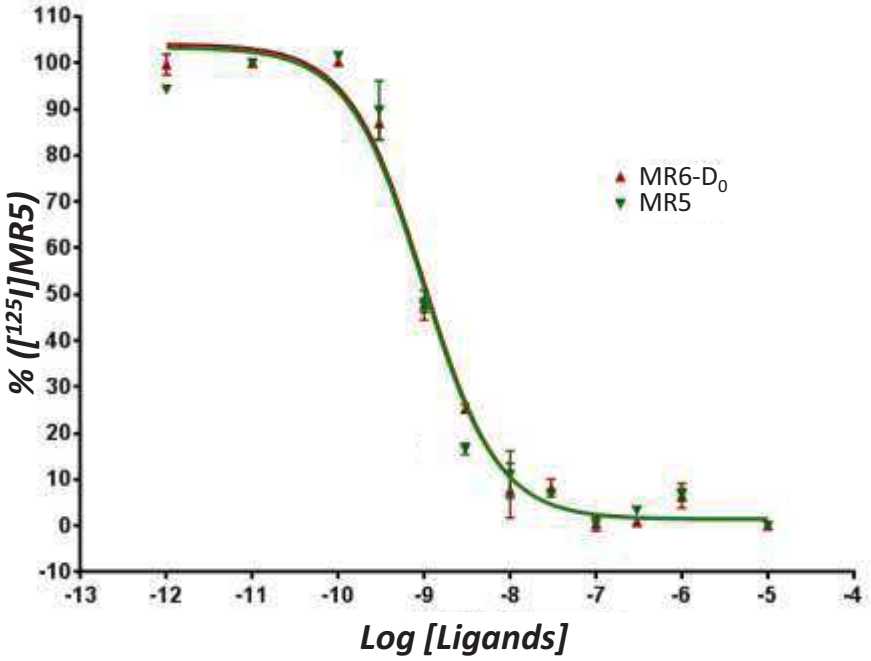


Figure 193 : Courbe de compétition entre le ligand [^{125}I]MR 5et différents compétiteurs, à savoir les peptides MR 6-D_0 et MR 5. Les résultats sont exprimés en pourcentage de liaison du ligand traceur

En ce qui concerne la première molécule, sa constante de dissociation a été évaluée à K_i(MR 6-D_0) = 0,71 nmol.L^{-1} tout autant que celle du peptide MR 5 qui a été évaluée également à K_i(MR 5) = 0,71 nmol.L^{-1}. Cela permet de confirmer deux points : premièrement, les deux peptides ont la même affinité ce qui atteste de l'absence total d'impact de la modification en position N-terminale du peptide ; deuxièmement, le peptide MR 5 possède la même affinité envers le récepteur que son analogue radiomarqué par l'iode 125.

Ligand traceur	**[^{125}I]MR 5**			**[^{125}I]MR 5**		
Compétiteur	**MR 6-D_0**			**MR 5**		
Log [Ligands]	**Moyenne (%)**	**SEM (%)**	**CV (%)**	**Moyenne (%)**	**SEM (%)**	**CV (%)**
-5	0	0	-	0	0	-
-6	6	3	72 %	7	1	35 %
-6,5	1	0	55 %	3	1	37 %
-7	0	2	580 %	0	0	0 %
-7,5	8	2	40 %	7	0	4 %
-8	8	6	134 %	11	5	79 %
-8,5	25	1	7 %	17	1	13 %
-9	48	3	12 %	48	2	6 %
-9,5	87	4	7 %	90	6	12 %
-10	100	0	0 %	102	0	0 %
-11	100	1	1 %	100	0	1 %
-12	100	2	4 %	94	0	0 %

Tableau 64 : Présentation des valeurs moyennes, de l'erreur sur la moyenne et le coefficient de variation pour la Figure 193 p.327. Les résultats sont exprimés en pourcentage de liaison du ligand traceur, le peptide [^{125}I]MR 5

Le Tableau 64 ci-dessus rassemble les moyennes du pourcentage de liaison du ligand traceur en fonction du logarithme de la concentration en compétiteur ajouté. La plupart des mesures montrent une bonne voire excellente précision mis à part les valeurs situées entre les abscisses -8 et -6, ce qui s'explique par le tracé qui prend en compte la soustraction de la valeur de liaison non spécifique moyenne. Cela entraîne pour certaines valeurs un résultat négatif qui à son tour entraîne une valeur particulière de coefficient de variation ; preuve en est, les très faibles erreurs sur les valeurs des moyennes.

XI.C.2. Mesure MALDI-SID-MS

La première expérience de mesure d'affinité par MALDI-SID-MS a été effectuée avec le peptide MR 5en tant que compétiteur envers le peptide MR 6-D_0 en tant que ligand traceur introduit à concentration constante à 5 nmol.L^{-1}, occasionnant une mesure de liaison non spécifique non nulle, dans le but d'assurer une quantification dans une gamme de concentrations confortable pour démontrer la faisabilité de l'étude avant de passer à une concentration introduite équivalente à ce qui est proposée en mesure de radioactivité. Le résultat est représenté par la Figure 194 ci-dessous avec des points de mesure aux valeurs entières du logarithme de la concentration en compétiteur. Dans ce graphique, la valeur de liaison non spécifique correspondant à la quantité de ligand traceur détecté à l'abscisse -5 est déjà soustraite en moyenne à tous les points de la courbe, ce qui occasionne des barres d'erreur qui franchissent l'axe des abscisses et des coefficients de variations anormalement élevés (voir Tableau 65 p.329).

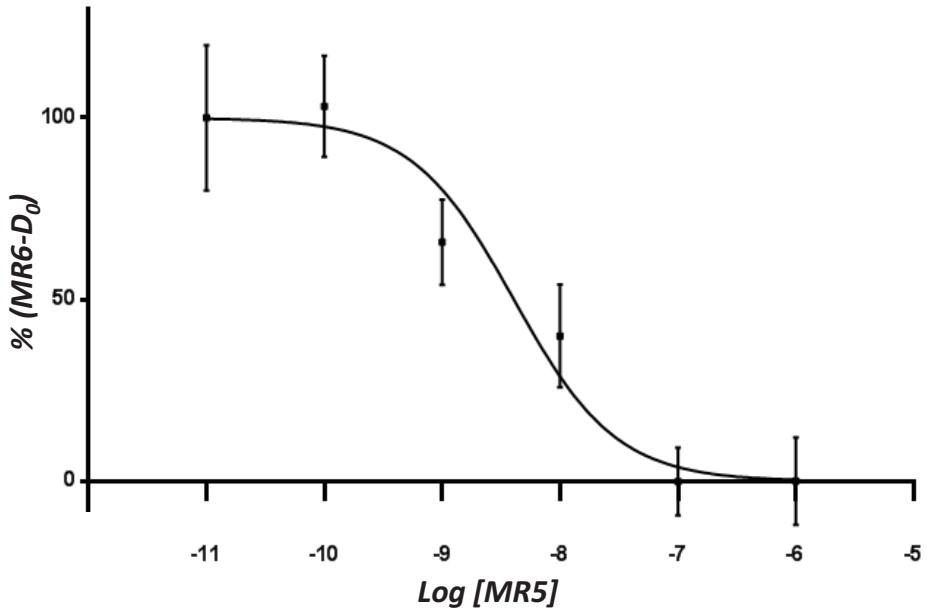


Figure 194 : Courbe de compétition entre le ligand MR 6-D_0 et le peptide MR 5 en tant que compétiteur. Les résultats sont exprimés en pourcentage de liaison du ligand traceur

Les analyses démarrent à la valeur -6 et non -5 comme cela devrait être le cas à cause d'une interférence causée par l'adduit sodium du peptide MR 5 auprès du massif isotopique du ligand traceur (voir Figure 195 ci-dessous). En effet, à haute concentration en peptide MR 5, c'est-à-dire au-dessus de 10^{-6} mol.L^{-1}, cet adduit sodium est fortement visible et impacte directement la valeur de peptide MR 6-D_0 lié mesurée.

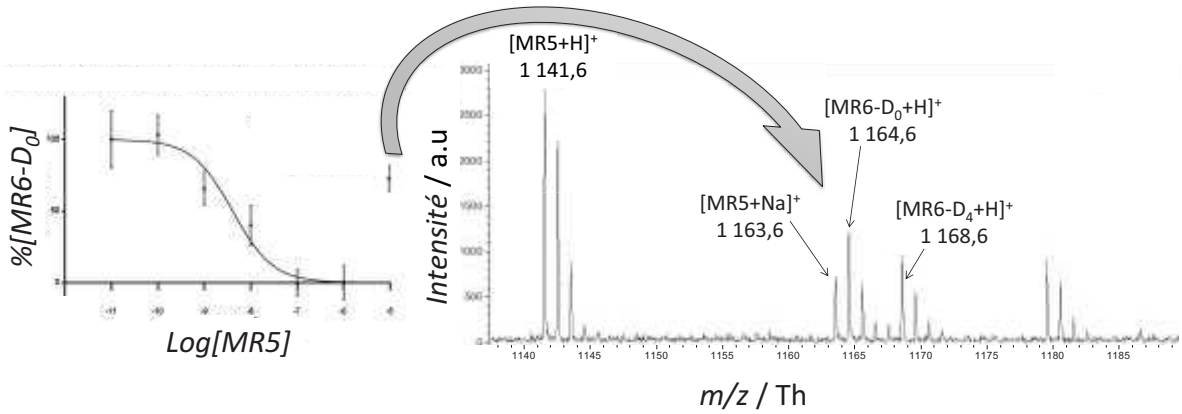


Figure 195 : Illustration de l'interférence créée par l'adduit sodium du peptide MR 5 à 10^{-5} mol.L^{-1} envers le peptide MR 6-D_0

Les résultats numériques correspondant à cette expérience sont présentés avec le Tableau 65 ci-dessous. Bien que les coefficients de variation correspondant aux abscisses -6 et -7 soient anormalement élevés, la précision de la moyenne n'en est pas affectée lorsque les erreurs sur la moyenne sont également considérées, ce qui permet de contrecarrer l'effet des valeurs négatives des pourcentages de liaison qui résultent de la soustraction de la valeur moyenne de liaison non spécifique.

	Quantification directe		
Log [MR 5]	**Moyenne (%)**	**SEM (%)**	**CV (%)**
-6	25	8	80 %
-7	20	7	78 %
-8	51	9	45 %
-9	68	8	28 %
-10	94	9	24 %
-11	91	13	36 %

Tableau 65 : Présentation des valeurs moyennes, de l'erreur sur la moyenne et le coefficient de variation pour la Figure 194 p.328. Les résultats sont exprimés en pourcentage de liaison du ligand traceur

Cependant, une telle représentation de l'équilibre de compétition est beaucoup trop restreinte et mérite une meilleure précision qui passe par un nombre bien plus important de prises de mesures, incluant des points aux demi-logarithmes. Cela a été effectué avec succès en introduisant une concentration pour incubation de 0,25 nmol.L^{-1} et est représenté avec la Figure 196

ci-dessous. Celle-ci montre une progression régulièrement et bien définie de la proportion de ligand traceur lié au récepteur étudié qui diminue petit-à-petit à mesure que la concentration en compétiteur augmente.

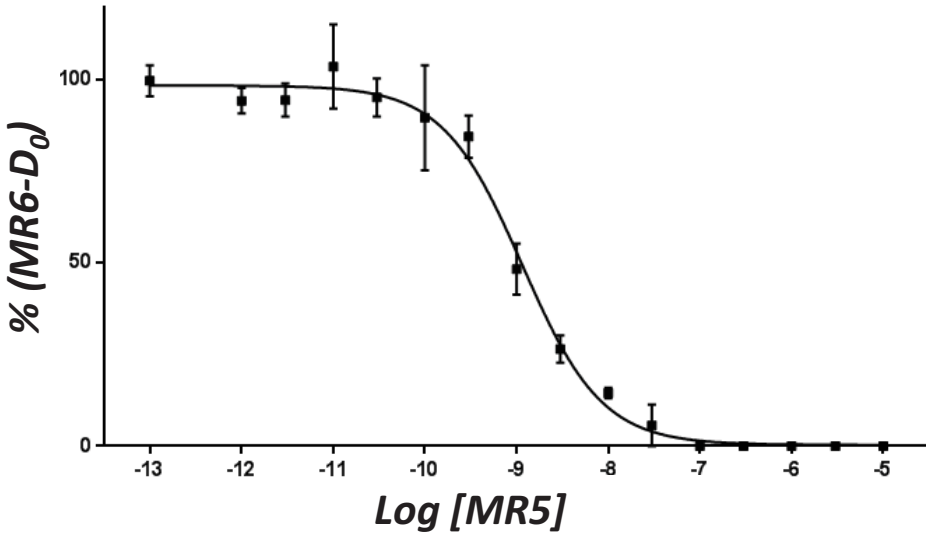


Figure 196 : Courbe de compétition entre le ligand MR 6-D_0 et le peptide MR 5en tant que compétiteur avec points aux demi-logs. Les résultats sont exprimés en pourcentage de liaison du ligand traceur

Dans le cadre de cette étude, le ligand traceur a été introduit à une concentration de 0,25 nmol.L^{-1}, ce qui correspond à environ 36 % du K_d de la molécule.

	Quantification par étalonnage		
Ligand traceur	**MR 6-D_0**		
Log [MR 5]	**Moyenne (%)**	**SEM (%)**	**CV (%)**
-5	0	0	-
-5,5	0	0	-
-6	0	0	-
-6,5	0	0	-
-7	0	0	-
-7,5	6	6	245
-8	15	1	25
-8,5	27	4	35
-9	48	7	35
-9,5	85	6	17
-10	90	14	39
-10,5	95	5	13
-11	104	11	27
-11,5	95	4	12
-12	94	3	9
-13	100	4	9

Tableau 66 : Présentation des valeurs moyennes, de l'erreur sur la moyenne et le coefficient de variation pour la Figure 196 p.330. Les résultats sont exprimés en pourcentage de liaison du ligand traceur

Cela a eu pour conséquence de voir le ligand totalement déplacé par le compétiteur aux hautes concentrations de ce dernier et donne une valeur de liaison non spécifique nulle, comme en atteste le Tableau 66 ci-dessus où il est possible de constater des moyennes nulles, des erreurs sur ces moyennes nulles et l'absence de coefficient de variation étant donné que ce dernier prévoit la division d'un nombre par une moyenne qui, étant nulle, est une opération mathématique impossible. En outre la valeur de 245 % de coefficient de variation s'explique par plusieurs mesures de signal nul du peptide d'intérêt pour une mesure non nulle. La valeur d'IC_{50} mesurée a été la suivante : IC_{50}(MR 5) = 1,03 ± 0,12 nmol.L^{-1}. En considérant la constante de dissociation du ligand traceur (K_d(MR 6-D_0) = 0,69 nmol.L^{-1}), la constante de dissociation obtenue a été : K_i(MR 5) = 0,76 ± 0,09 nmol.L^{-1}.

Par la suite, cette expérience de compétition à l'équilibre a été effectuée avec des ligands non peptidiques dont les constantes de dissociation sont connues dans la littérature et qui sont présentées dans la Figure 197 ci-dessous, à savoir le Relcovaptan© et le Satavaptan©.

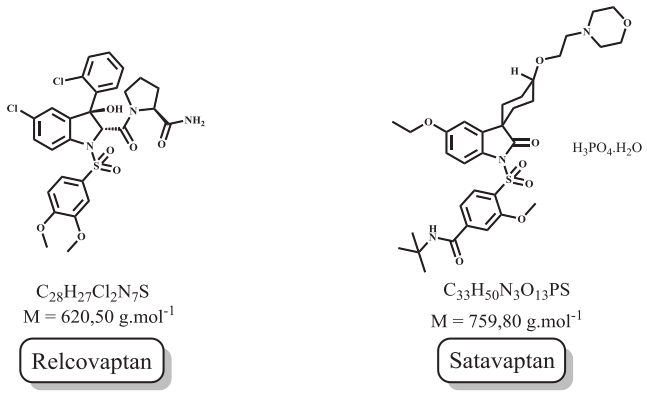


Figure 197 : Structures chimiques, formule chimique et masse molaire du Relcovaptan® et du Satavaptan®

Le même procédé standardisé de manipulation a été suivi pour ces deux molécules avec deux mesures de constantes de dissociation effectuées pour chacune d'entre elles. Les résultats d'une expérience par molécules sont présentés dans la Figure 198 ci-dessous. Les deux expériences ont été faites sur le même lot de préparation membranaire, ce qui a rendu possible la fixation d'une consigne de niveau basal de liaison non spécifique dans le logiciel Graphpad Prism 6© pour la modélisation de la courbe relative au Satavaptan. Cela permet au logiciel de ne pas considérer le point d'abscisse -5 de cette dernière courbe comme un point à 0 % de liaison et donc de calculer correctement la valeur d'IC_{50} à partir de laquelle est obtenue la constante de dissociation K_i grâce à l'équation de Cheng-Prusoff.

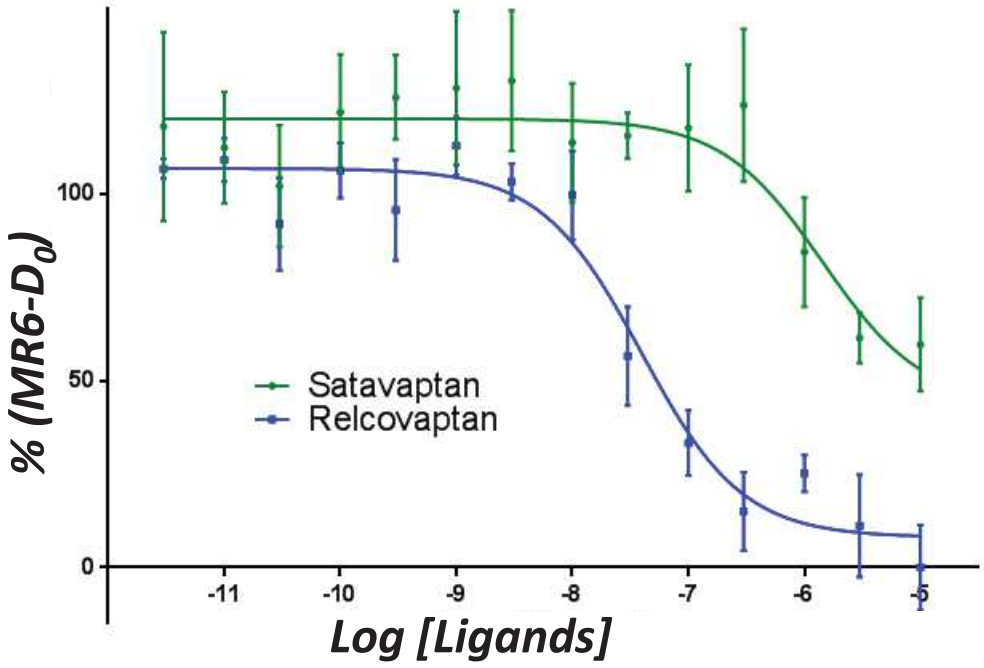


Figure 198 : Courbe de compétition entre le ligand MR 6-D_0 et deux ligands non peptidiques, à savoir le relcovaptan et le satavaptan avec points aux demi-logs. Les résultats sont exprimés en pourcentage de liaison du ligand traceur

La première information à noter est la différence d'affinité visible entre les deux molécules matérialisée par la différence au niveau de l'abscisse du point d'inflexion de la sigmoïde. Les valeurs d'IC_{50} mesurées sont respectivement IC_{50}(Relcovaptan©) = 30,3 ± 10 nmol.L^{-1} et IC_{50}(Satavaptan©) = 1 807 ± 367 nmol.L^{-1}. En considérant la constante de dissociation du ligand traceur (K_d(MR 6-D_0) = 0,69 nmol.L^{-1}), les constantes de dissociation obtenues sont les suivantes : respectivement K_i(Relcovaptan©) = 22,2 ± 7,3 nmol.L^{-1} et K_i(Satavaptan©) = 1 326 ± 269 nmol.L^{-1}. Les résultats numériques correspondant aux tracés de ces deux courbes sont présentés dans le Tableau 67 ci-dessous. Le décalage qui existe entre les deux plateaux des deux courbes entre les abscisses -11,5 et -9 provient de l'utilisation de la même préparation membranaire à deux instants différents de la journée et donc soumis à deux pipetages différents occasionnant, malgré l'homogénéisation préalable de la solution de membranes, une différence en termes de quantités de membranes et donc de récepteurs présents et, *in fine*, une différence au niveau de la valeur de liaison totale qui doit être de 100 % aux basses concentrations en compétiteur.

	Quantification par étalonnage (Satavaptan®)			Quantification par étalonnage (Relcovaptan®)		
Ligand traceur	**MR 6-D_0**			**MR 6-D_0**		
Log [Ligands]	**Moyenne (%)**	**SEM (%)**	**CV (%)**	**Moyenne (%)**	**SEM (%)**	**CV (%)**
-5	60	13	42	0	11	-
-5,5	62	7	27	11	14	301
-6	85	15	42	25	5	48
-6,5	124	20	37	15	11	171
-7	118	17	29	33	9	64
-7,5	116	6	13	57	13	57
-8	114	16	34	100	12	29
-8,5	130	19	32	103	5	12
-9	129	21	39	113	8	17
-9,5	126	11	22	96	13	31
-10	122	16	31	106	7	16
-10,5	102	16	36	92	12	27
-11	113	15	32	109	6	13
-11,5	118	25	52	107	3	6

Tableau 67 : Présentation des valeurs moyennes, de l'erreur sur la moyenne et le coefficient de variation pour la Figure 198 p.332. Les résultats sont exprimés en pourcentage de liaison du ligand traceur

Les valeurs des constantes de dissociation et d'IC_{50} sont résumées dans le Tableau 68 ci-dessous. Cela permet de comparer aisément les résultats obtenus. La principale information à noter est la parfaite concordance, erreur sur la moyenne prise en compte, de la constante de dissociation mesurée par scintigraphie et par MALDI-SID-MS ; en outre, le K_i mesuré pour le Relcovaptan© est bien significativement différent de ce qui est connu de la littérature compte-tenu de l'erreur associée tout en restant dans un intervalle acceptable de variation dû à la variabilité du vivant incarné par les préparations membranaires utilisées. En revanche le K_i mesuré pour le Satavaptan© est relativement différent de ce qui a été publié même en considérant l'erreur sur la moyenne. Toutefois, la conclusion concernant l'affinité de la molécule est la même, à savoir que cette dernière est beaucoup moins affine pour le récepteur V_{1A} que le Relcovaptan© comme d'autres études l'ont démontré.

	MALDI-SID-MS			**Radiomarquage (scintigraphie)**	
Ligand traceur	MR 6-D_0			[^{125}I]MR 5– [^{125}I]Homo-HO-LVA	
Compétiteur	MR 5	**Relcovaptan®**	**Satavaptan®**	MR 5	MR 6-D_0
K_i (nmol.L^{-1})	0,76 ± 0,09 (n = 3)	22,2 ± 7,3 (n = 2) (7.9)[596]	1 326 ± 269 (n = 2) (316)[597]	0,71 (n = 1)	0,71 (n = 1)
IC_{50} (nmol.L^{-1})	1,03 ± 0,12	30,3 ± 10	1 807 ± 367	1,0	1,0

Tableau 68 : Résumé des constantes de dissociation mesurées par MALDI-SID-MS et par scintigraphie par expérience de compétition à l'équilibre

[596] ***Valeurs tirées de la littérature***: iuphar database (http://www.guidetopharmacology.org).
[597] Voir note de bas de page 596 ci-dessus

XI.D. Comparaison entre une quantification « directe » par dilution isotopique et une quantification avec droite d'étalonnage

Au cours de ce paragraphe nous allons comparer deux traitements de données proposés avec la méthodologie de quantification par MALDI-SID-MS. Il s'agit dans un premier temps de quantifier le peptide d'intérêt, en l'occurrence MR 6-D_0, directement à partir de l'équation donnant la concentration de ce dernier en fonction de celle de l'étalon et du rapport de leur aire respective. Cela nécessite en amont l'étape de validation statistique qui est commune à la seconde méthode de traitement des données. Suite à cela, le calcul de la liaison spécifique se fait par régression linéaire avec passage par le point d'abscisse et d'ordonnée 0, légitimée par la Figure 190 p.323, et sans. La seconde méthode de traitement consiste à se servir de l'étalonnage fin sur 2 ordres de grandeur pour calculer la concentration en peptide d'intérêt ; la droite d'étalonnage peut voir son passage forcé ou non par le point d'abscisse et d'ordonnée 0, légitimée par la Figure 200 p.335. Par la suite la même opération est répétée pour le calcul de la liaison non spécifique, grâce à la Figure 190 p.323. La principale différence entre les deux méthodes, outre l'utilisation d'un étalonnage, est le temps passé en phase d'analyse qui est augmenté par la nécessité d'effectuer cet étalonnage.

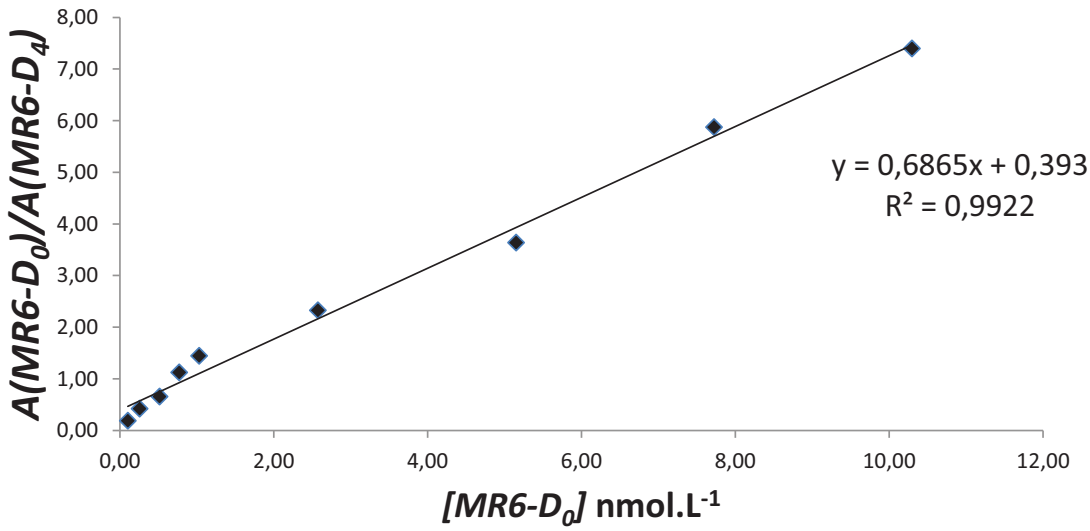


Figure 199 : Etalonnage effectué avant la quantification par MALDI-SID-MS pour la mesure de liaison totale et non spécifique. Cette étape est effectuée systématiquement avant chaque quantification

Concernant la méthode requérant un étalonnage, ce dernier a été effectué systématiquement avant chaque expérience de mesure de liaison totale et non spécifique. Le résultat de l'un d'entre eux est présenté en Figure 199 ci-dessus. Cette droite, bien que montrant une pente relativement faible, affiche un excellent coefficient de régression linéaire. Les résultats numériques de cet étalonnage sont présentés dans le Tableau 69 ci-dessous et montrent une précision des mesures tout à fait correcte et des erreurs sur les moyennes de l'ordre de 10 % de celles-ci.

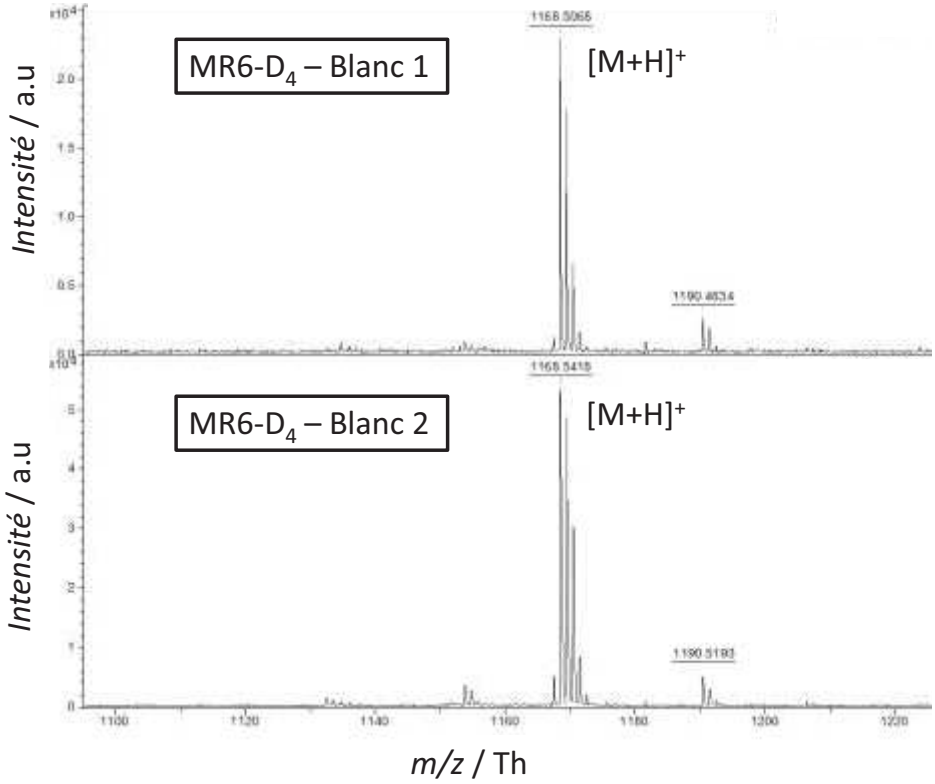


Figure 200 : Spectres obtenus à partir de mesures de blanc contenant uniquement l'étalon deutéré à la concentration utilisée pour la quantification et l'étalonnage (10^{-9} mol.L^{-1}). Les conditions de manipulation et de dépôt de l'échantillon sont identiques au résultat de l'optimisation (HCCE 1, GSP-M1/2)

Il est intéressant de noter également l'évolution du biais théorique qui augmente progressivement, passant de valeurs négatives à des valeurs positives et qui reflète directement l'aspect de la courbe de validation statistique obtenue (voir Figure 200 ci-dessus).

A(MR 6-D_0) / A(MR 6-D_4) théorique	[MR 6-D_0] nmol.L^{-1}	Moyenne générale	CV	SEM	Biais de régression	Valeurs de régression	Biais théorique
9,90	10,30	7,40	19 %	0,56	- 1 %	7,46	-25,3%
7,43	7,73	5,87	27 %	0,64	3 %	5,70	-20,9%
4,95	5,15	3,63	12 %	0,18	-8 %	3,93	-26,6%
2,48	2,58	2,33	9 %	0,08	8 %	2,16	-6,1%
0,99	1,03	1,44	31 %	0,18	31 %	1,10	45,6%
0,74	0,77	1,12	22 %	0,10	21 %	0,92	50,7%
0,50	0,52	0,65	8 %	0,02	-12 %	0,75	32,2%
0,25	0,26	0,42	36 %	0,08	-26 %	0,57	69,6%
0,10	0,10	0,18	12 %	0,01	-60 %	0,46	86,0%

Tableau 69 : Représentation des résultats d'un étalonnage dans le cadre du projet AVP/V_{1A}. La moyenne et son erreur associée, ainsi que les coefficients de variation et les biais des mesures par rapport à la droite de régression linéaire sont affichés de même que les valeurs théoriques provenant de cette régression linéaire et le biais théorique par rapport au rapport d'aire théoriquement attendu et correspondant au rapport des concentrations préparées donné par l'Equation 14 p.281

Ces deux traitements ont été dans un premier temps appliqué à la mesure de liaison spécifique (voir Figure 201 ci-dessous). Les deux courbes obtenues affichent une progression similaire jusqu'au plateau de saturation sans pour autant affecter la mesure de l'affinité. Cela se retrouve dans les valeurs de constantes de dissociations obtenues qui sont les suivantes : K_d(directe) = 0,69 ± 0,24 nmol.L^{-1} et K_d(étalonnage) = 0,76 ± 0,23 nmol.L^{-1}. Ces deux valeurs sont toutes deux suffisamment proches en prenant en compte l'erreur sur la moyenne pour qu'elles puissent être confondues. Celles-ci proviennent du traitement des données qui a été effectué et rend compte directement de l'erreur imputable aux différentes méthodes qui vont se servir d'une droite de régression linéaire passant le point d'abscisse et d'ordonnée 0 concernant la liaison non spécifique, rendue légitime par la Figure 190 p.323, ainsi qu'une droite d'étalonnage passant par ce même point d'abscisse et d'ordonnée 0, rendue légitime par la Figure 200 ci-dessus.

En outre, lorsque l'intérêt se tourne vers les valeurs de B_{max}, à savoir B_{max}(directe) = 5 546 ± 1 447 fmol.mg^{-1} et B_{max}(étalonnage) = 8 173 ± 1 302 fmol.mg^{-1}, il est possible de constater, qu'en tenant compte de l'erreur sur la moyenne, les deux valeurs peuvent être confondues.

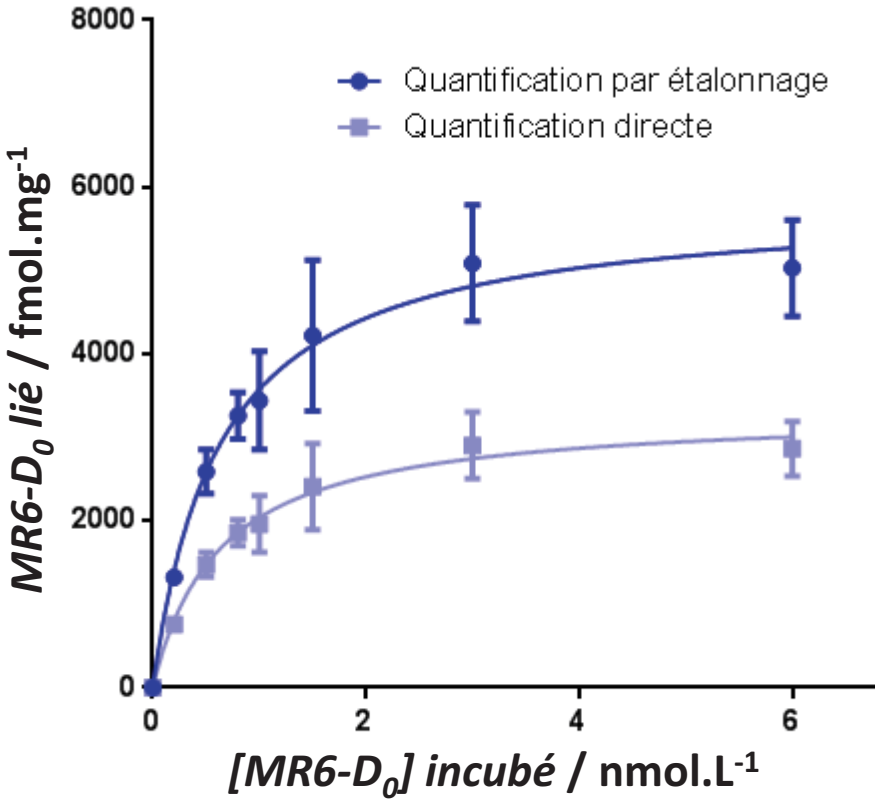


Figure 201 : Courbes de saturation du peptide MR 6-D_0 représentant deux tracés de la liaison spécifique obtenus par deux méthodes de calculs différentes après quantification par MALDI-SID-MS

Les résultats numériques relatifs à cette étude comparative sont présentés dans le Tableau 70 ci-dessous qui présente les moyennes, leur erreur et le coefficient de variation des mesures.

D'après les mesures obtenues, quel que soit le traitement mathématique utilisé pour l'extraction des métadonnées, celui-ci n'a pas d'impact significatif sur la précision des valeurs dans le sens où les coefficients de variations et les erreurs restent dans le même ordre de grandeur.

	Liaison spécifique (Directe)			Liaison spécifique (étalonnage)		
[MR 6-D_0] incubé en (nmol.L^{-1})	Moyenne (fmol.mg^{-1})	SEM (fmol.mg^{-1})	CV (%)	Moyenne (fmol.mg^{-1})	SEM (fmol.mg^{-1})	CV (%)
6,0	2 787	330	29 %	5 032	576	28 %
3,0	2 934	400	33 %	5 088	700	34 %
1,5	2 499	516	51 %	4 223	906	53 %
1,0	2 067	337	40 %	3 443	589	42 %
0,8	1 976	159	20%	3 262	280	21 %
0,5	1 602	150	23%	2 589	262	25 %
0,2	892	53	15%	1 323	91	17 %
0,0	0	0	-	0	0	-

Tableau 70 : Tableau résumé des points de mesure concernant la constante de dissociation du peptide MR 6-D_0 représenté par la Figure 201 p.336

Les résultats des constantes de dissociation et des titres maximum en récepteurs calculés selon les deux méthodes de traitement sont résumés dans le Tableau 83 ci-dessous pour une comparaison rapide entre les valeurs numériques. Cela montre à quel point les deux méthodes de calculs aboutissent, bien qu'avec des valeurs numériques différentes, à des résultats comparables.

	Directe		Etalonnage		Combinaison des deux traitements	
	Moyenne	SEM	Moyenne	SEM	Moyenne	SEM
K_d (nmol.L^{-1})	0,69	0,24	0,76	0,23	0,73	0,24
B_{max} (fmol.mg^{-1})	5 546	1 447	8 173	1 302	6 860	1 375

Tableau 71 : Résumé des constantes de dissociation obtenues par saturation et B_{max} mesurés par MALDI-SID-MS selon les deux méthodes de calculs proposées

Dans un second temps, ces deux traitements mathématiques ont été appliqués à la mesure de la constante de dissociation du ligand non peptidique non affin pour le récepteur V_{1A}, à savoir le Satavaptan© (voir Figure 202 ci-dessous). La constatation est encore plus frappante, à savoir que les deux courbes montrent très peu de différence entre elles avec les valeurs de constantes de dissociation suivantes : K_i(directe) = 973 ± 7 nmol.L^{-1} et K_i(étalonnage) = 1 013 ± 1 nmol.L^{-1}. Dans ce cas-ci les deux constantes ne peuvent pas être confondues sur la base seule de leur erreur associée. En revanche, elles restent équivalentes d'un point de vu pharmacologique car du même ordre de grandeur. En outre, lorsque le regard se tourne vers les valeurs de IC_{50}, à savoir IC_{50}(directe) = 1 378 ± 7 nmol.L^{-1} et IC_{50}(étalonnage) = 1 436 ± 2 nmol.L^{-1}, la constatation est la même.

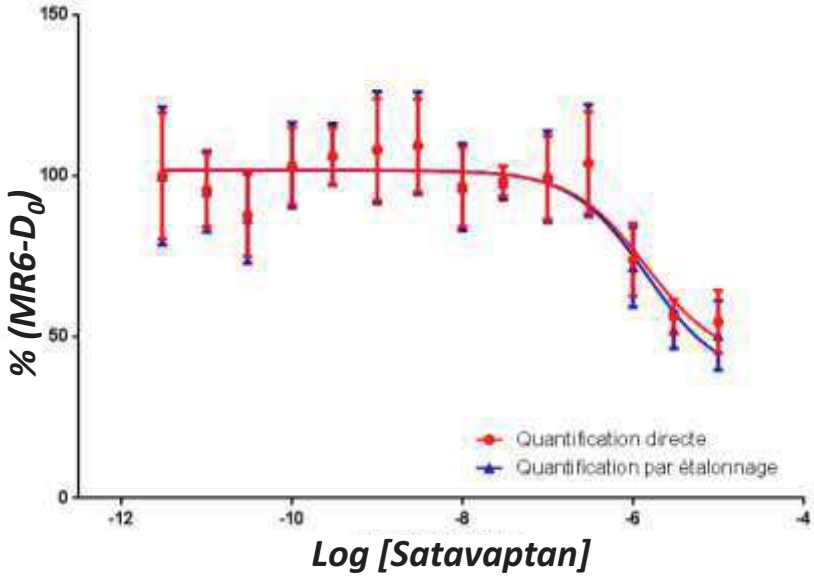


Figure 202 : Courbes de compétition à l'équilibre entre le peptide MR 6-D_0 (ligand traceur) et le satavaptan représentant deux tracés de la mesure du déplacement du ligand traceur par deux méthodes de calculs différentes après quantification par MALDI-SID-MS

Les résultats numériques relatifs à cette étude comparative sont présentés dans le Tableau 72 ci-dessous avec les moyennes, leur erreur et le coefficient de variation des mesures exprimées en pourcentage de liaison du ligand traceur, le peptide MR 6-D_0. L'information à extraire de cela est l'absence d'impact, quel que soit le traitement mathématique utilisé pour l'extraction des métadonnées, sur la précision des valeurs dans le sens où les coefficients de variations et les erreurs restent dans le même ordre de grandeur.

	Quantification par étalonnage			Quantification directe		
Ligand traceur	**MR 6-D_0**			**MR 6-D_0**		
Log [Satavaptan®]	**Moyenne (%)**	**SEM (%)**	**CV (%)**	**Moyenne (%)**	**SEM (%)**	**CV (%)**
-5	51	11	42	55	10	36
-5,5	52	6	27	56	5	23
-6	72	12	42	74	11	37
-6,5	105	17	37	104	16	34
-7	100	14	28	100	13	26
-7,5	98	5	13	98	5	12
-8	97	14	34	97	12	31
-8,5	110	16	32	109	14	30
-9	109	17	39	108	16	36
-9,5	107	10	22	106	9	20
-10	103	13	31	103	12	29
-10,5	87	14	36	88	13	33
-11	95	13	32	96	11	29
-11,5	100	21	52	100	20	48

Tableau 72 : Tableau résumé des points de mesure concernant la constante de dissociation du peptide MR 6-D_0 représenté par la Figure 202 p.338. Les résultats sont exprimés en pourcentage de liaison du ligand traceur

Les résultats des constantes de dissociation et des valeurs d'IC_{50} calculés selon les deux méthodes dans le cas du Satavaptan© sont résumés dans le Tableau 73 ci-dessous pour une comparaison rapide entre les valeurs numériques. En outre, lorsque les valeurs des deux méthodes de traitement sont combinées, les valeurs calculées sont cohérentes avec les données de la littérature en prenant en compte leur erreur (voir Tableau 68 p.333).

Méthode de quantification	Directe		Etalonnage		Combinaison des deux traitements	
	Moyenne	SEM	Moyenne	SEM	Moyenne	SEM
IC_{50} (nmol.L^{-1})	1 378	7	1 436	2	1 408	13
K_i (nmol.L^{-1})	973	5	1 013	1	997	9

Tableau 73 : Résumé des constantes de dissociation obtenues par compétition et IC_{50} mesurés par MALDI-SID-MS selon les deux méthodes de calculs proposées dans le cas du Satavaptan©

Malgré la proximité des valeurs, les deux méthodes de calcul fournissent clairement des valeurs de constante de dissociation significativement différentes compte-tenu des erreurs sur la moyenne. En revanche, lorsque les deux traitements sont combinés, on obtient des valeurs avec une erreur sur la moyenne correcte et en accord avec les données de la littérature compte-tenu de la variabilité du vivant.

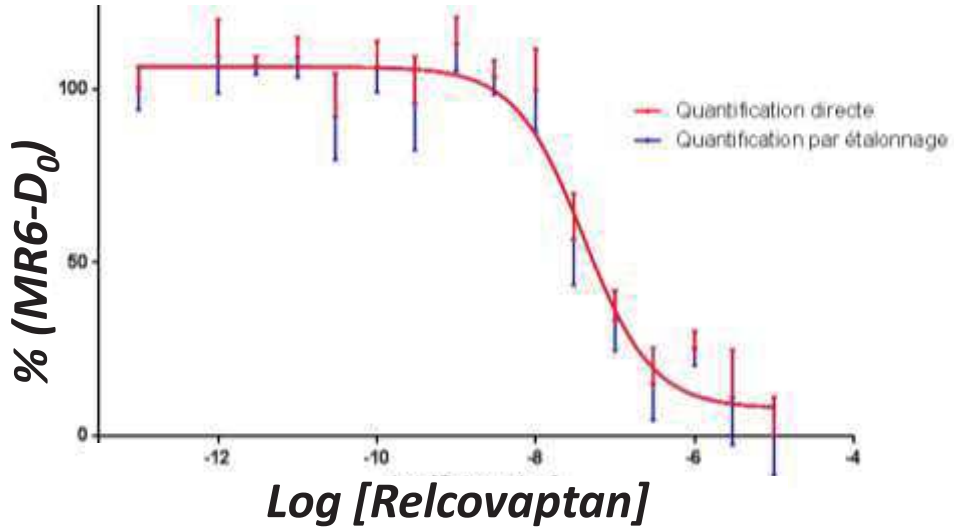


Figure 203 : Seconde application de la comparaison des méthodes de traitement à un ligand non peptidique de forte affinité pour le récepteur d'étude V_{1A}. Celle-ci montre une parfaite similitude entre les deux traitements de données par quantification directe en rouge et par quantification via un étalonnage en bleu

Une seconde comparaison a été opérée sur le Relcovaptan©, ligand non peptidique affichant une forte affinité pour le récepteur V_{1A}. Celle-ci est brièvement illustrée par la Figure 203 ci-dessus. Les deux tracés sont tout à fait superposés l'un à l'autre et les valeurs des grandeurs pharmacologiques sont les suivantes : IC_{50} (directe) = IC_{50} (étalonnage) = 40,2 nmol.L^{-1} et K_i (directe) = K_i (étalonnage) = 28,4 nmol.L^{-1}. C'est un résultat éminemment étonnant compte-tenu du niveau de

similitude mais bien réel. Et cela démontre, dans ce cas d'un ligand non peptidique de forte affinité, l'identité existante entre les deux méthodes de traitement.

En conclusion, le traitement des données ne joue en aucun cas sur la mesure de l'affinité fournie, les deux peuvent ainsi être mis en œuvre, en première approche pour gagner du temps, et en seconde approche pour obtenir une valeur plus fiable au pris d'une erreur sur les constantes calculées.

Conclusion

Pour conclure sur les expériences menées dans le cadre du projet portant sur le système chimique AVP/V_{1A}, l'ensemble des synthèses tant sur le plan des marqueurs chimiques que sur celui des peptides a mené à l'obtention des différentes séquences nécessaires à l'étude approfondie du récepteur et de l'affinité des différentes molécules utilisées. A l'issue de ces synthèses un important et conséquent travail d'optimisation de toute la chaîne expérimentale a continué avec l'étude des conditions de dépôt, de matrice et d'analyse de la séquence peptidique d'intérêt sans oublier l'étude du dépôt par imagerie une fois celui-ci sec. Cela s'est conclu avec une étude statistique dans le but d'apporter un outil supplémentaire de validation et de comparaison de mesures, suivie par la mise au point d'un protocole d'étalonnage. La stratégie de marquage de séquence peptidique par un fragment HCCA a également fait l'objet d'une courte étude par ESI-MS qui s'est soldée par le constat selon lequel cette stratégie spécifiquement conçue pour le MALDI-MS n'y est pas transposable. En outre, les expériences de pharmacologie ont permis d'une part de mesurer avec précision les constantes pharmacologiques (K_d, B_{max}, IC_{50} et K_i) de différentes molécules, d'autre part de caractériser le récepteur avec différents composés d'affinité variable. Enfin, deux méthodes de traitement des données ont été proposées et se sont montrées équivalentes en termes numériques démontrant leur complémentarité sur le plan de la rapidité d'exécution et de la précision des valeurs fournies.

Le chapitre suivant sera consacré au projet dont le sujet d'étude est le récepteur CCKB notamment sur le plan des synthèses entreprises, de l'application de la méthodologie analytique en spectrométrie de masse ainsi que l'application des protocoles pharmacologiques mis en œuvre.

Chapitre 3 : le projet CCKB-R

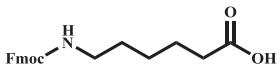
I. Introduction

L'objectif affiché de cette étape de synthèse est bien d'obtenir en quantité suffisante les peptides nécessaires aux études sur le second récepteur CCKB-R destiné à valider la méthodologie analytique globale développée sur un autre récepteur.

Dans ce chapitre nous allons donc nous intéresser à la partie synthèse de peptides et d'acides aminés modifiés qui a été entreprise pour pallier cette problématique d'oxydation. Dans un premier temps, nous nous pencherons sur les différentes méthodes de synthèse utilisées et contrôles effectués avant de passer, dans un second temps, à l'étude en spectrométrie de masse du peptide sélectionné pour, dans un troisième temps, aborder l'application du développement en MALDI-SID-MS sur la mesure de l'interaction entre le récepteur CCKB-R et un ligand modifié. Enfin, une étude sur la fragmentation des acides aminés modifiés sera proposée.

II. La synthèse manuelle de peptides sur support solide

Dans le cadre de la synthèse de peptide de ce projet, un acide aminé particulier a fait l'objet d'une étape de protection de son amine terminale en prévision de l'étape de couplage ultérieure. Il s'agit de l'amine de l'acide 6-aminohexanoïque protégée par un groupement Fmoc. Cela permet d'introduire cet acide aminé particulier en tant que bras espaceur entre la zone N-terminale et le site de couplage de l'HCCA en tant que marqueur dans la synthèse des peptides MR 9 et MR 10. Le mode opératoire suivi pour cette synthèse fait intervenir une base organique en milieu homogène et le Fmoc-OSu.[598] Le produit (MR 8, voir ci-dessous) a été obtenu à hauteur de 90 %

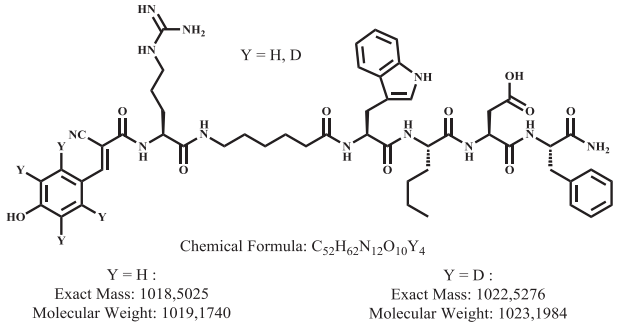


MR 8 : Synthèse de l'acide aminé Fmoc-Ahx-OH à partir d'acide 6-aminohexanoïque pour l'obtention de MR 10-D_0 et MR 10-D_4

La synthèse du peptide suivant a été effectuée dans le cadre de l'étude d'un second récepteur, le récepteur CCKB-R. Les trois premiers acides aminés ont été montés sur résine consécutivement. Compte-tenu de la différenciation des séquences des peptides MR 9 et MR 10 au quatrième acide aminé, la résine utilisée a été fractionnée après ce troisième couplage. La séquence MR 9 a été mise au point par G. MIRALLES lors de sa thèse.[599] Lors du stockage du peptide, des états d'oxydation du tryptophane ont été détectés (voir V.A p.352) ; raison pour laquelle la seconde

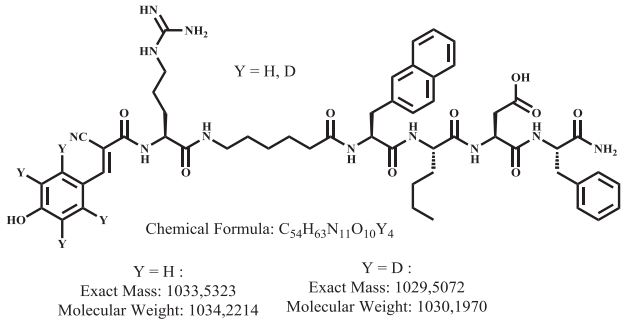
[598] Sakamoto, T.; Mahara, A.; Yamagata, K.; Iwase, R.; Yamaoka, T.; Murakami, A. *Biophys. J.* **2005**, *89*, 4122
[599] Guillaume MIRALLES, « Conception et synthèse de nouveaux outils chimiques pour l'étude des phosphoprotéines et la caractérisation de la liaison d'un ligand à son récepteur par spectrométrie de masse MALDI-TOF », Thèse de doctorat en ingénierie moléculaire, sous la direction de Gilles Subra, Montpellier, Université de Montpellier 1, 2012

séquence a été conçue avec un acide aminé non naturel aromatique pour remplacer le tryptophane et éviter ces oxydations (voir paragraphe VII.A p.356).



MR 9 : Ligand traceur modifié pour le second récepteur modèle avec le résidu tryptophane, CCKB-R, synthèse en version hydrogénée (légère) et deutérée (lourde)

Les couplages des différents acides aminés se sont fait en conditions classiques utilisées en stratégie Fmoc/^{t}Bu, à savoir le couple HBTU/DIEA ; les déprotections des groupements Fmoc se sont faites avec une solution de pipéridine/DMF 20/80 (v/v). A la fin de chaque couplage d'un nouvel acide aminé et après chaque déprotection, un test de Kaiser est effectué pour contrôler de façon qualitative la réussite de des deux étapes avant de procéder aux suivantes. Le couplage final de la molécule de ^{t}Boc-HCCA et ^{t}Boc-HCCA-d_4 sont réalisées dans des conditions identiques à celles décrites au chapitre 2, paragraphe II p.219 pour les peptides MR 5, MR 6-D_0, et MR 6-D_4. Les peptides MR 9-D_0 et MR 9-D_4 ont été obtenus respectivement avec 4 % (2 × 5 mg) et 2 % (3 mg), ce qui met très probablement en évidence une erreur au niveau de l'étape de coupure de la résine qui est restée très limitée. Les peptides MR 10-D_0 et MR 10-D_4 ont, quant à eux, pu être synthétisés respectivement à hauteur de 69 mg (53 %) et 31 mg (23 %) après clivage acide de la résine, purification et lyophilisation.



MR 10 : Ligand traceur modifié pour le second récepteur modèle, CCKB-R, synthèse sous forme hydrogénée (légère) et deutérée (lourde)

III. La synthèse d'acides aminés modifiés

Dans le cadre de l'étude du récepteur CCKB-R, la détection de formes oxydées du tryptophane à + 4, + 16 et + 32 Th (voir Schéma réactionnel 17 ci-dessous, et spectre au paragraphe VII.A p.356 pour la discussion associée) a conduit à deux stratégies : le remplacement du tryptophane

par un acide aminé non sujet à l'oxydation d'une part, la synthèse des formes oxydées du tryptophane d'autre part. Ces dernières étant destinées à être incorporées dans la séquence peptidique. Un plan réactionnel a été conçu pour permettre l'accès à la fois aux acides aminés protégés par un groupement ^{t}Boc et Fmoc pour pouvoir envisager leur utilisation dans les deux stratégies de synthèses (Fmoc/^{t}Bu et Boc/bzl). Ainsi selon ce plan (voir Schéma réactionnel 17 ci-dessous), il est possible d'accéder aux différents états d'oxydation du tryptophane en un minimum d'étapes.

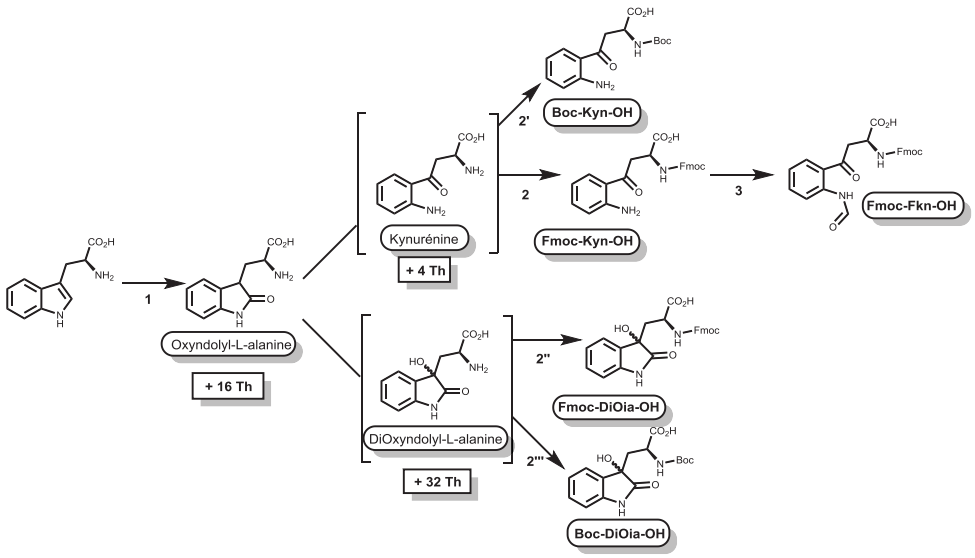
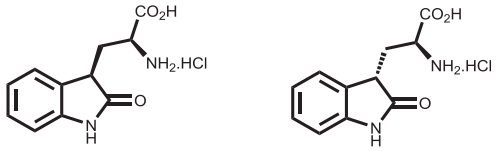


Schéma réactionnel 17 : Voies de synthèse d'acides aminés modifiés à partir du tryptophane en série Boc/Bzl et Fmoc/^{t}Bu

La première étape consiste à oxyder le tryptophane dans des conditions dures en ayant recours au DMSO, à de l'acide chlorhydrique concentré et de l'acide acétique glacial.[600]



MR 11 : Synthèse de l'oxindolyl-L-alanine (Oia). Le premier stéréoisomère (MR 11-A) a été désigné arbitrairement à gauche et le second stéréoisomère (MR 11-B) à droite

Cette méthode de synthèse a permis d'obtenir après une étape d'extraction l'acide aminé oxydé qui précipite naturellement dans le milieu réactionnel pour former une poudre beige et une solution qui passe d'une couleur marron à un violet très prononcé.

[600] T. Simat, K. Meyer, H. Steinhart, *Journal of Chromatography A* **1994**, *661*, 93–99

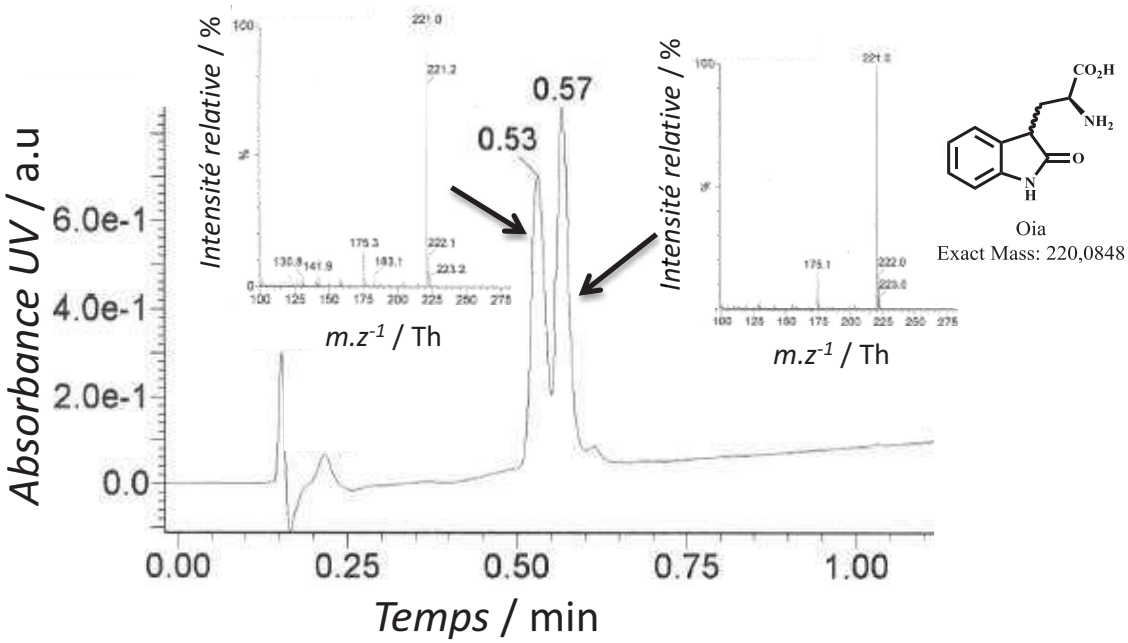


Figure 204 : Analyse MS du produit solide brut issu de la réaction de synthèse de l'Oia

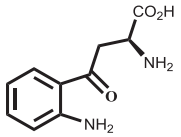
Après filtration, un filtrat (voir Figure 205 ci-dessous) est obtenu et le produit isolé avec 78 % de rendement après lavage et séchage sous vide. La couleur violette/rose avait été décrite dans la littérature comme faisant partie de la molécule.[601] La pureté obtenue via la Figure 204 ci-dessus conjuguée à la couleur du filtrat obtenu (voir Figure 205 ci-dessous) obtenue à 4 reprises conforte l'idée selon laquelle la couleur décrite ne correspond pas au produit attendu.

Figure 205 : Aspect du milieu d'oxydation du tryptophane après précipitation et filtration de l'oxindolylalanine

Par la suite, la synthèse de la kynurénine a été entreprise selon un protocole établi avec une température à 60 °C et un bullage d'air en milieu fortement basique qui, grâce à l'énergie thermique fournie, favorise les équilibres chimiques et la formation du produit thermodynamique, produit le plus stable qui n'a pas fait l'objet d'investigations.[602] Or il a été constaté que de telles conditions

[601] R. B. Labroo, L. A. Cohen, *The Journal of Organic Chemistry* **1990**, *55*, 4901–4904
[602] Nakagawa, M.; Kato, S.; Fukazawa, H.; Hasegawa, Y.; Miyazawa, J.; Hino, T. *Tetrahedron Lett.* **1985**, *26*, 5871.

nuisaient rapidement à la formation du produit attendu, la kynurénine. En effet, sur un temps de réaction de 2 h, il a été observé une apparition puis une disparition de ce dernier.



MR 12 : Kynurénine

La question du mécanisme réactionnel d'une telle transformation est particulièrement intéressant d'autant qu'il s'agit d'une ouverture de cycle. Du point de vue mécanistique, il est beaucoup plus probable, bien qu'aucune preuve expérimentale ne puisse être avancée à l'heure actuelle, que la transformation s'opère sur la forme énol de la molécule

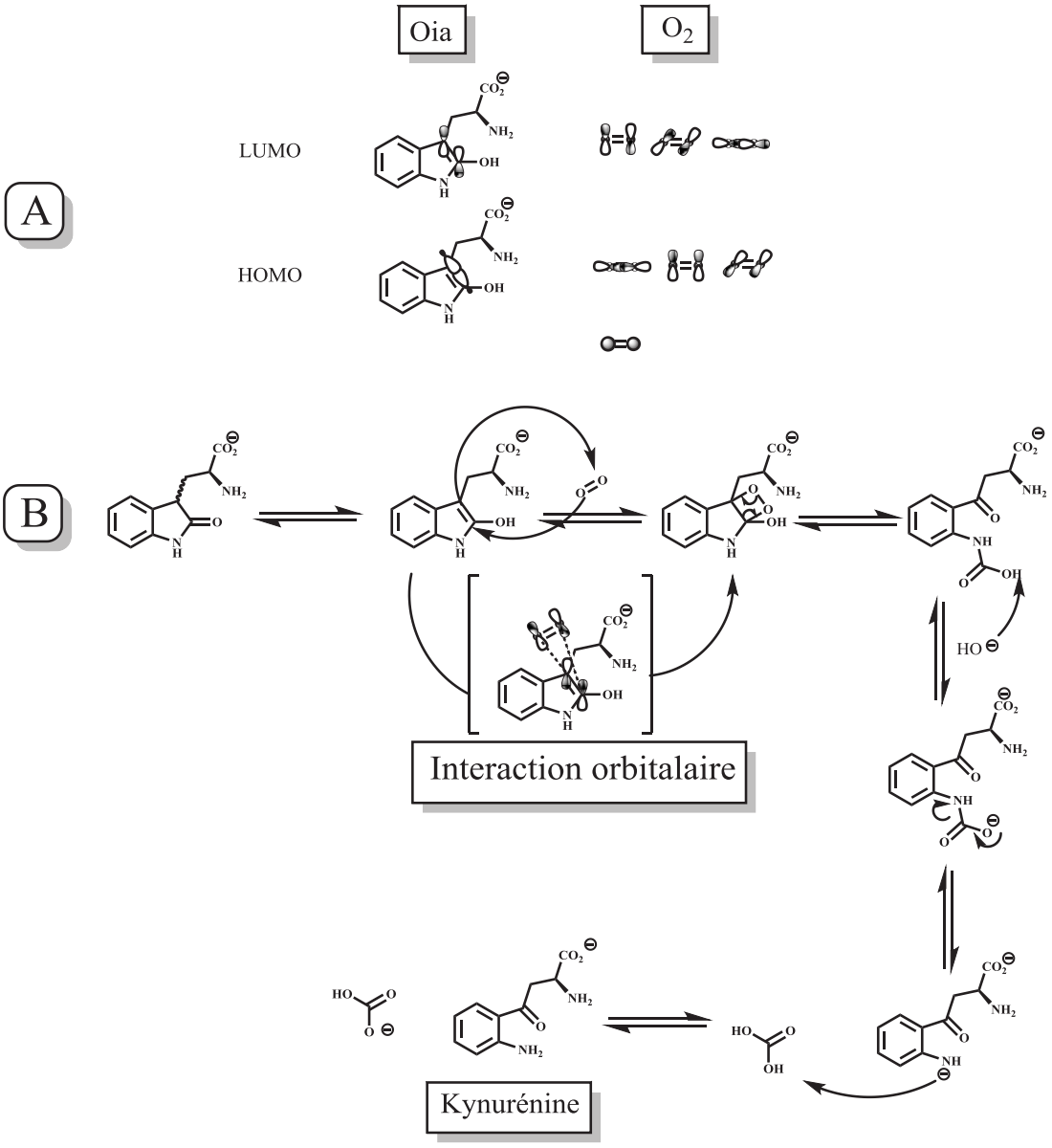
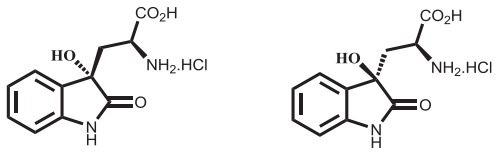


Schéma réactionnel 18 : Proposition de mécanisme réactionnel pour la formation de kynurénine à partir d'oxindolyl-L-alanine (Oia) faisant intervenir la théorie des orbitales moléculaires (A) au service de l'aspect mécanistique (B)

La température de la réaction a alors été modifiée et fixée à -5 °C pour se placer dans des conditions favorisante la formation du(des) produit(s) cinétique(s) de réaction, ce qui a conduit à la formation et à l'identification de deux sous-produit les stéréoisomères A et B de la dioxindolyl-L-alanine (voir MR 13 ci-dessous).



MR 13 : Stéréosisomères identifiés de la dioxindolyl-L-alanine ; à gauche le stéréoisomère A arbitrairement choisi et à droite le stéréoisomère B

Dans l'optique d'apporter un éclairage sur la formation de dioxindolyl-L-alanine, un second mécanisme réactionnel a été proposé (voir Schéma réactionnel 19 ci-dessous). Celui-ci fait intervenir la LUMO du dioxygène et la HOMO de l'oxindolyl-L-alanine avec un contrôle de la réaction qui se ferait par la charge (voir A, ci-dessous).

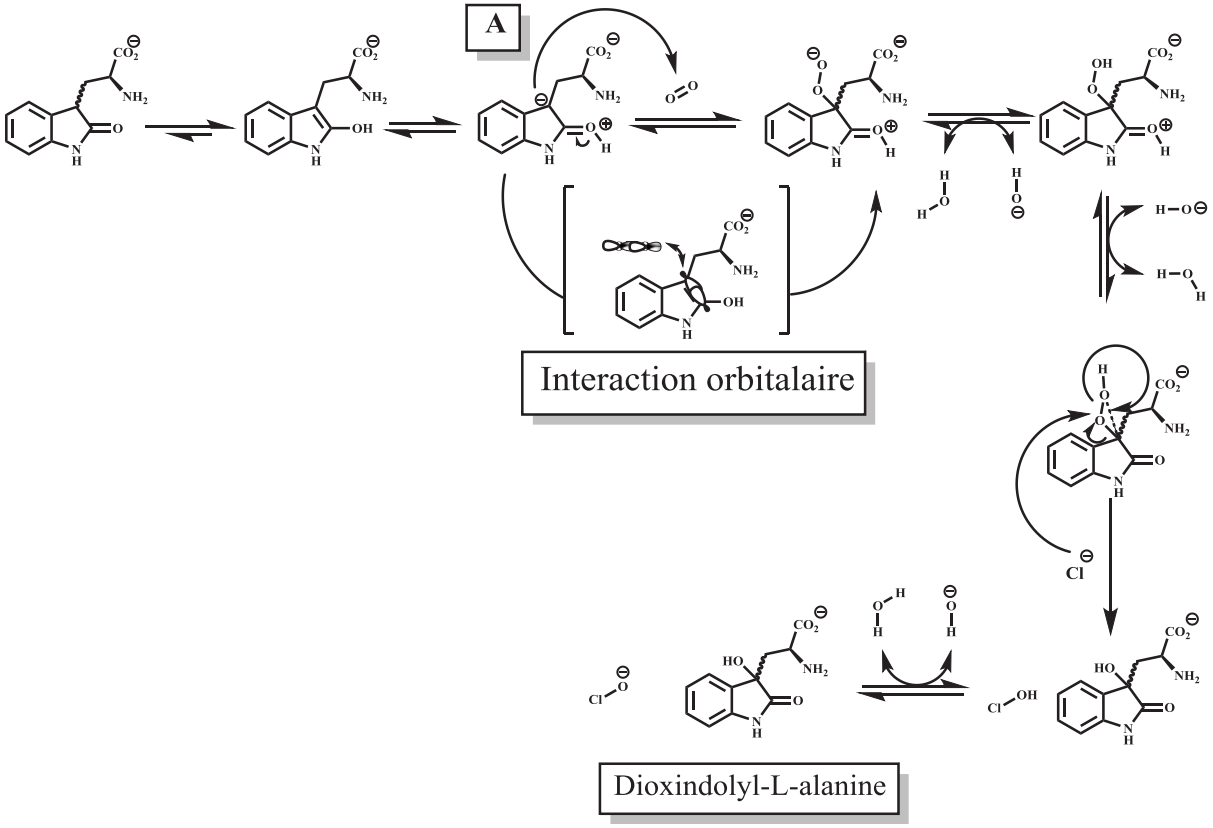


Schéma réactionnel 19 : Proposition de mécanisme réactionnel pour la formation de dioxindolyl-L-alanine (DiOia) à partir d'oxindolyl-L-alanine (Oia) avec assistance de la théorie des orbitales moléculaires

Dans un premier temps il a été observé qu'au bout d'une heure de réaction à pH = 13 et pH = 14, l'avancement de la réaction différait en consommant respectivement autant d'un isomère de l'oxindolyl-L-alanine que l'autre et le premier préférentiellement au second (voir Figure 207 p.347).

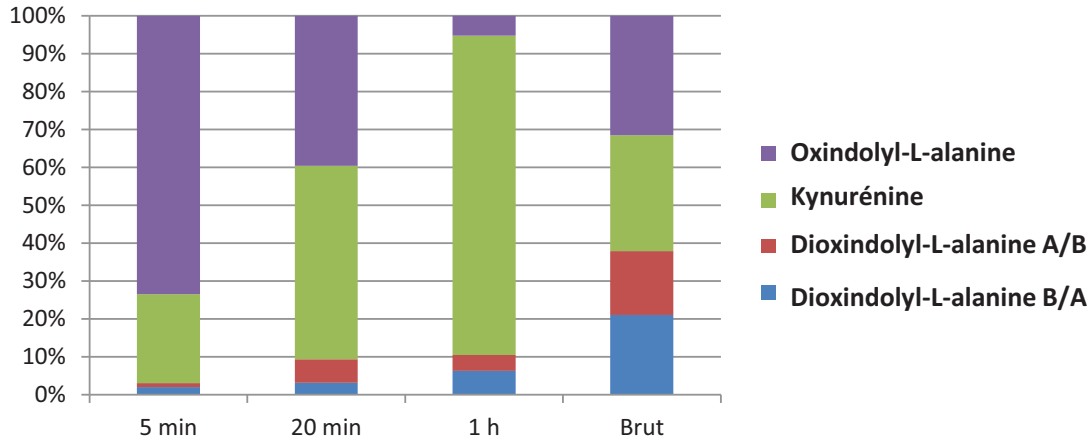


Figure 206 : Illustration de l'évolution de la proportion de kynurénine lors de sa synthèse à -5 °C à pH = 14 en fonction du temps de réaction

Cette même réaction a été répétée et le pH diminué pour en évaluer qualitativement l'impact. Cela a permis de mettre en évidence la formation à pH = 14 de la kynurénine en majorité tandis qu'un pH d'une valeur de 11 engendrait la formation préférentielle de la dioxindolyl-L-alanine. Un suivi HPLC a permis de montrer que l'on pouvait obtenir jusqu'à 90 % de DiOia (2 isomères confondus) en effectuant la première étape à pH = 11, tout étant égal par ailleurs (voir Figure 208 p.348).

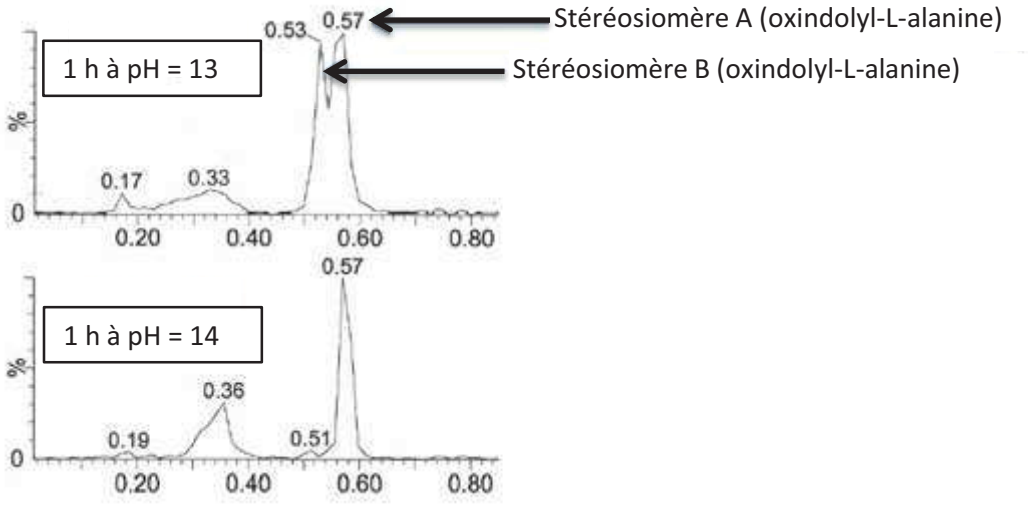


Figure 207 : Chromatogramme HPLC-UV du milieu réactionnel à 1 h de réaction à pH = 13 et pH = 14 montrant la conversion totale de l'un des deux isomères de l'oxindolyl-L-alanine. L'intensité relative des ions est représentée en ordonné et le temps d'élution en abscisse

En outre, après 16 h de réaction, l'oxindolyl-L-alanine restant avait été totalement convertie. Ce qui a permis d'estimer les proportions des molécules sur la base du chromatogramme UV à 63 % de kynurénine, 22 % de dioxindolyl-L-alanine (2 isomères confondus, voir Schéma réactionnel 21 p.348) et de 15 % de produits non caractérisés en masse. Cependant la neutralisation de la réaction par une solution acide de HCl et l'évaporation du solvant ont conduit à un changement radical des

proportions (brut, voir Figure 206 ci-dessus), à savoir : 32 % de kynurénine, 32 % d'oxindolyl-L-alanine, 36 % de dioxindolyl-L-alanine (2 isomères confondus ; voir Figure 206 ci-dessus).

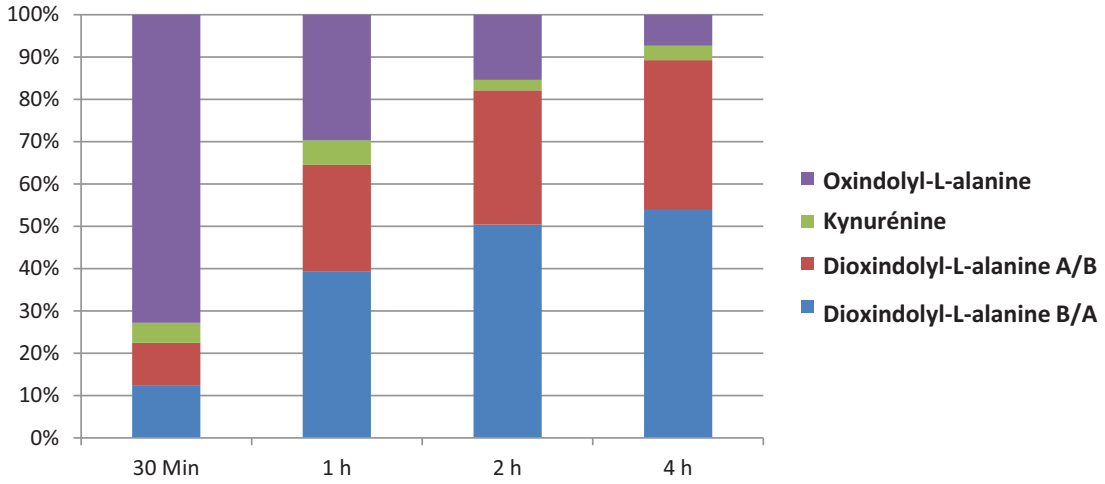


Figure 208 : Illustration de l'évolution de la proportion de dioxindolyl-L-alanine lors de sa synthèse à -5 °C à pH = 11 en fonction du temps de réaction

Cette observation laisse penser que le traitement conduisant à l'isolement du produit est contre-productif. Sachant que l'étape de protection par Fmoc-OSu se fait en milieu basique, il a été proposé d'effectuer les deux étapes consécutivement pour palier le problème de dégradation de la kynurénine en milieu acide chauffé qui avait été initialement envisagé.

C'est la raison pour laquelle le schéma réactionnel suivant a été proposé (voir ci-dessous). Celui-ci combine l'étape d'oxydation et de protection en deux phases consécutives avec ajustement du pH avant de passer à la protection pour éviter l'hydrolyse basique du groupement Fmoc-OSu.

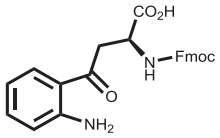


Schéma réactionnel 20 : Synthèse de Fmoc-Kyn-OH en one-pot

Ces conditions réactionnelles ont été également appliquées à la synthèse consécutive de Fmoc-DiOia-OH (voir Schéma réactionnel 21 ci-dessous). Cependant et en dépit de plusieurs essais, les deux essais n'ont pas permis d'isoler et de purifier ni le Fmoc-DiOia-OH ni le Fmoc-Kyn-OH. Toutefois, des expériences de fragmentation en masse ont permis d'élucider certaines structures et la formation de certains produits. Ceci sera détaillé au paragraphe IX p.372.

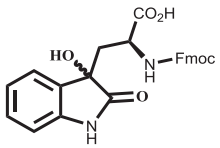


Schéma réactionnel 21 : Synthèse en one-pot de Fmoc-DiOia-OH

La synthèse des acides aminés en stratégie pour une utilisation en série Bob/benzyle a également été envisagée avec, cette fois, une réaction d'oxydation et de protection en simultané (voir Schéma réactionnel 22 ci-dessous). Les résultats ont permis de montrer que l'on pouvait former tous les produits d'oxydation du tryptophane sous forme protégée par le groupement ^{t}Boc (voir Figure 209 ci-dessous).

Schéma réactionnel 22 : Synthèse en one-pot de ^{t}Boc-Kyn-OH (à gauche) et ^{t}Boc-DiOia-OH (à droite)

Une étape de chromatographie préparative a été effectuée sur un lot pour tenter d'isoler et de purifier les produits d'intérêt et de les caractériser. Cependant, cela n'a permis que d'obtenir un enrichissement en produits d'intérêts dont les fractions étaient encore largement polluée par d'autres composés visibles en UV et non caractérisés en masse (voir Chromatogramme 4 p.350).

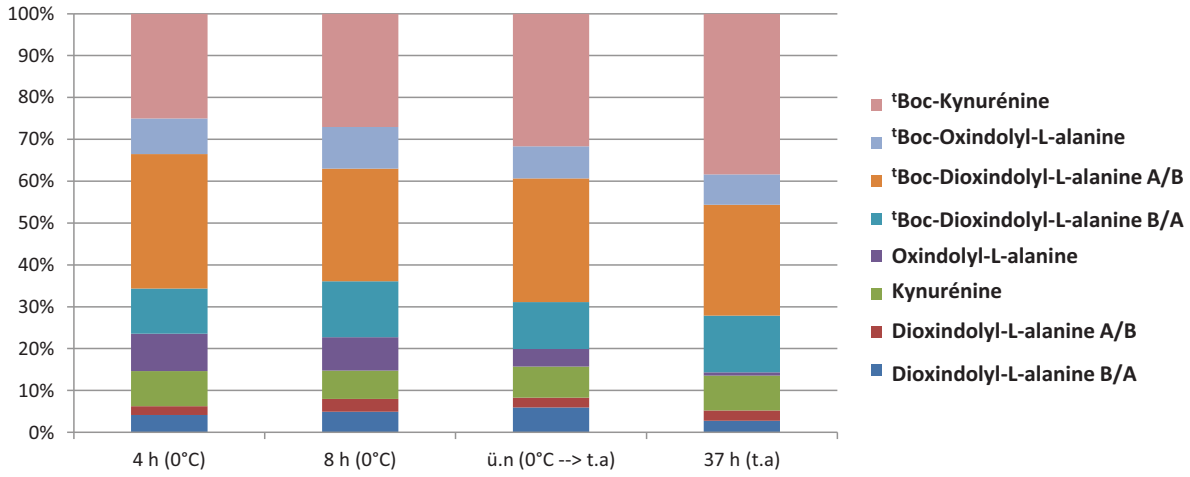
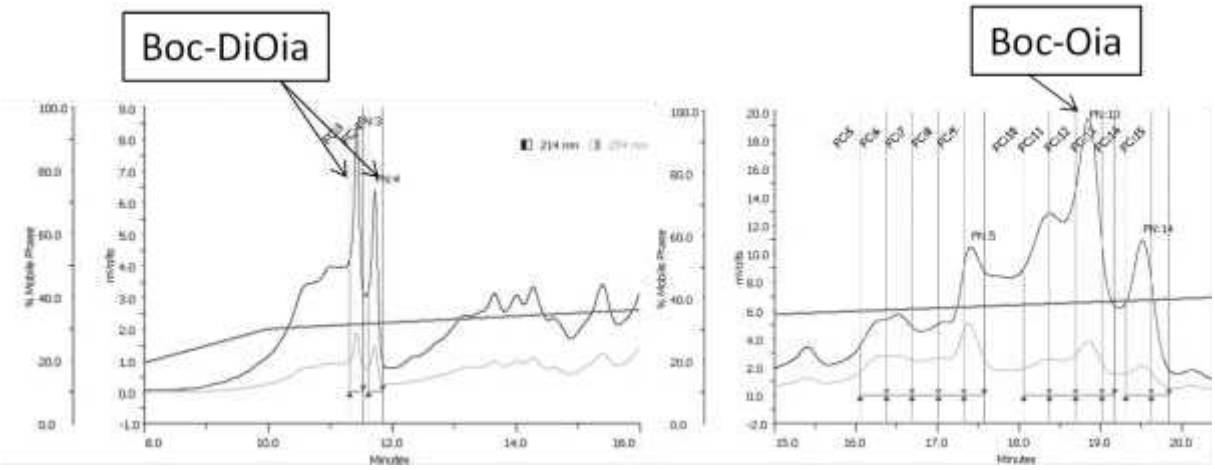


Figure 209 : Illustration de l'évolution de la proportion de formes oxydées du tryptophane et protégées lors de leur synthèse à t.a et à pH = 11

A l'issu des nombreuses expériences effectuées pour tenter de parvenir à la synthèse de ces formes oxydées et qui n'ont pu aboutir à l'obtention d'un acide aminé purifié et caractérisé entièrement, la stratégie de remplacement du tryptophane par un acide aminé non sujet à l'oxydation a été privilégiée. De plus, des études publiées dans la littérature ont montré que les observations d'oxydations du tryptophane proviendraient de la synthèse et des différentes manipulations avant analyse de peptides le contenant.[603] Cela suggère alors que le tryptophane ne s'oxyderait pas naturellement lors de la construction des protéines au sein de la machinerie cellulaire

[603] I. Perdivara, L. J. Deterding, M. Przybylski, K. B. Tomer, *Journal of the American Society for Mass Spectrometry* **2010**, *21*, 1114–1117

et confirmant la nécessité de trouver des substituts au tryptophane non sujets à l'oxydation lors de la manipulation des molécules.



Chromatogramme 4 : Zooms de la chromatographie préparatoire pour ^{t}Boc-Oia/^{t}Boc-DiOia

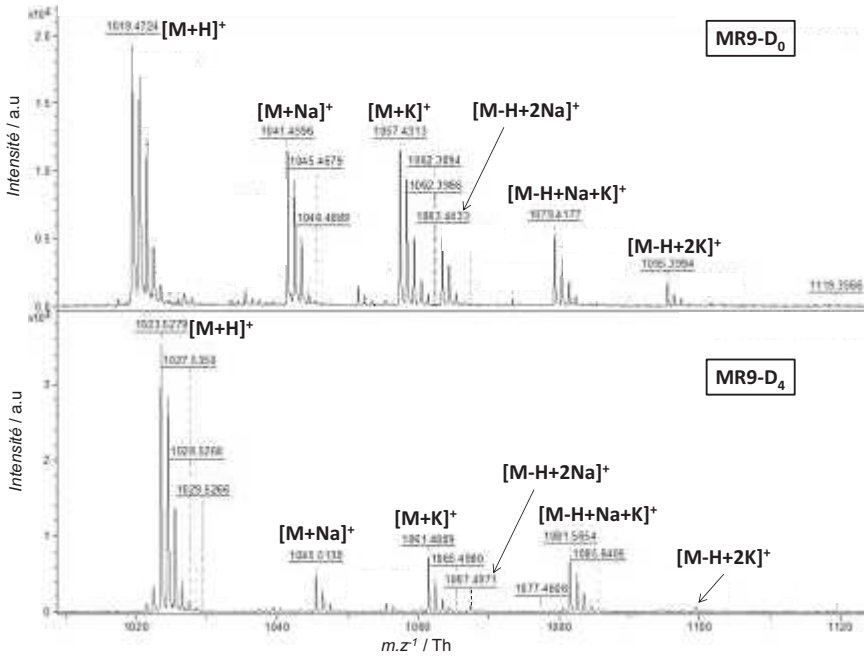
En outre, la synthèse n'a pas été poussée jusqu'à tenter d'obtenir la forme formylée de la kynurénine protégée pour deux hypothèses : premièrement du fait que cette dernière et la dioxindolylalanine sont isobares et de même formule brute, ce qui empêche leur différenciation par spectrométrie de masse ; deuxièmement du fait de l'absence dans les conditions de manipulation d'agent de formylation qui rend difficile la possibilité d'envisager une formylation de la kynurénine ; troisièmement, il est beaucoup plus probable qu'au contact d'un milieu oxydant (air, solvant solubilisant du dioxygène) et lors des différentes manipulations, le tryptophane s'oxyde de lui-même pour donner les formes à + 16 (oxindolylalanine) et + 32 Th (dioxindolylalanine) comme cela a déjà été décrit dans la littérature.[604]

IV. Contrôle qualité des peptides

IV.A. Les peptides MR 9–D_0 et MR 9–D_4

Après contrôle par MALDI-ToF-MS immédiatement après synthèse et purification, les deux peptides montrent des spectres d'ionisations tout à fait similaires, à la substitution des atomes de deutérium près. Les adduits protonés, sodés et potassés sont aisément identifiables tandis que des adduits monochargés à deux cations (sodium, potassium, sodium/potassium) sont également identifiables (voir Spectre 14 ci-dessous).

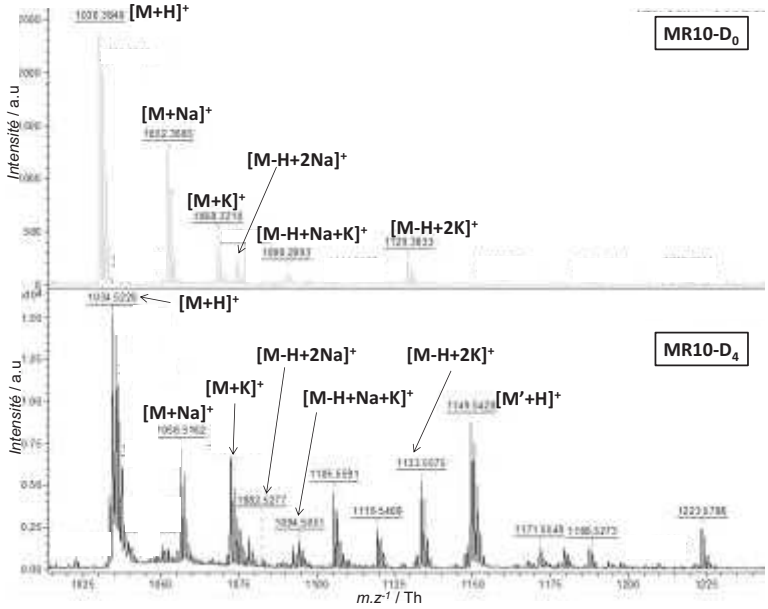
[604] Voir note de bas de page 600 p.344



Spectre 14 : Spectres de masse obtenus par MALDI-ToF des peptides MR 9–D_0 et MR 9–D_4 selon la méthode d'analyse standard de peptides

IV.B. Les peptides MR 10–D_0 et MR 10–D_4

Après contrôle par MALDI-ToF-MS immédiatement après synthèse et purification, les deux peptides montrent des spectres d'ionisations identiques, compte-tenu de la substitution des atomes de deutérium. Les adduits protonés, sodés et potassés sont aisément identifiables tandis que des adduits monochargés à deux cations (sodium, potassium, sodium/potassium) sont également identifiables (voir Spectre 15 ci-dessous). A noter dans le spectre du peptide MR 10–D_4 la présence d'une impureté identifiée comme provenant d'un double couplage d'acide aspartique à 1 1149,6 Th.



Spectre 15 : Spectres de masse obtenus par MALDI-ToF des peptides MR 10–D_0 et MR 10–D_4 selon la méthode d'analyse standard de peptides

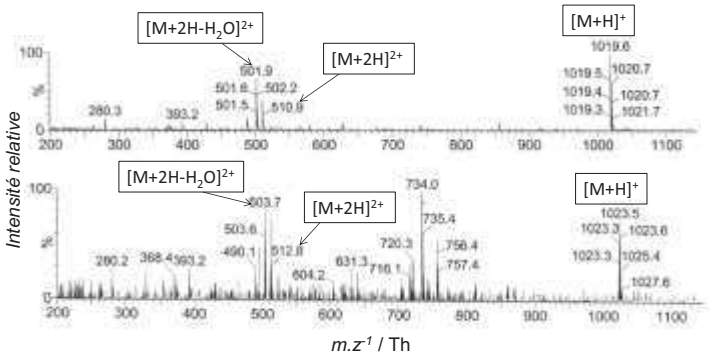
IV.C. Les peptides MR 10-D_0 et MR 10-D_4

Le chromatogramme UV a été obtenu après purification des deux peptides, leur caractérisation a été faite avec un gradient de 10 minutes de 20 à 70 % d'acétonitrile à 0,1 % de TFA et montre un échantillon d'une pureté satisfaisante compte-tenu du tampon contenant de la BSA (bosse à 5,4 min) dans lequel celui-ci a été analysé (voir Partie D – ***Partie expérimentale***, paragraphe II.F.4 p.432) avec un temps de rétention de 4,2 (MR 10-D_4) et 4,4 (MR 10-D_0) minutes.

V. LC-MS : massifs isotopiques

V.A. Les peptides MR 9–D_0 et MR 9–D_4

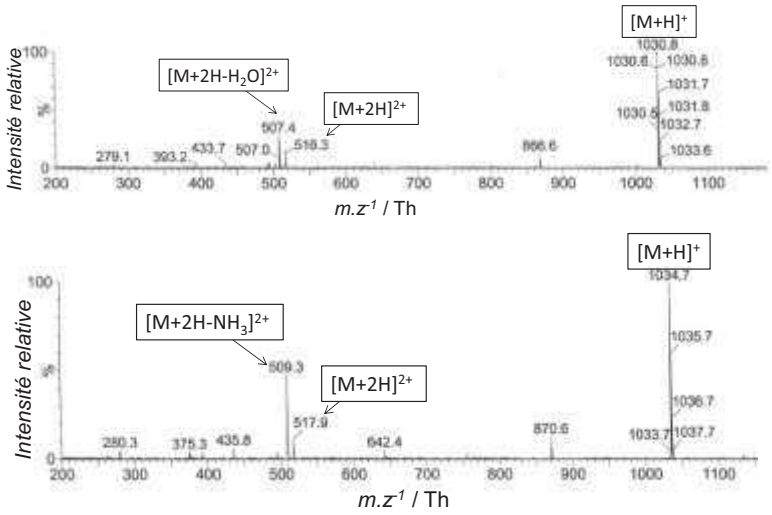
Ces deux peptides, qui n'ont pu être caractérisés par HPLC-UV, montrent des états d'ionisation particuliers. Les ions mono- et dichargés sont bien présents, mais ce qui est inhabituel compte-tenu des autres spectres obtenus, c'est la présence d'un ion dichargé avec perte d'eau sur un résidu, très probablement à partir de l'acide aspartique présent dans la séquence (voir Spectre 16 ci-dessous).



Spectre 16 : Spectres de masse obtenu sur système ZQ 2 000 pour les peptides MR 9–D_0 (en haut) et MR 9–D_4 (en bas), avec les ions mono- et dichargés avec une perte d'eau systématique sur l'ion dichargé

V.B. Les peptides MR 10-D_0 et MR 10-D_4

Ces deux peptides, quant à eux, montrent des états d'ionisation autrement particuliers. Les ions mono- et dichargés sont bien présents, mais ce qui est inhabituel compte-tenu des précédents spectres obtenus, c'est la présence d'un ion dichargé avec perte d'eau sur un résidu dans le cas du MR 10-D_0, très probablement à partir de l'acide aspartique présent dans la séquence, tandis que le MR 10-D_4 affiche un ion dichargé avec perte d'une molécule d'ammoniac, très probablement à partir de la chaîne latérale de l'arginine plutôt qu'au niveau de la fonction amide en position C-terminale (voir Spectre 17 ci-dessous).

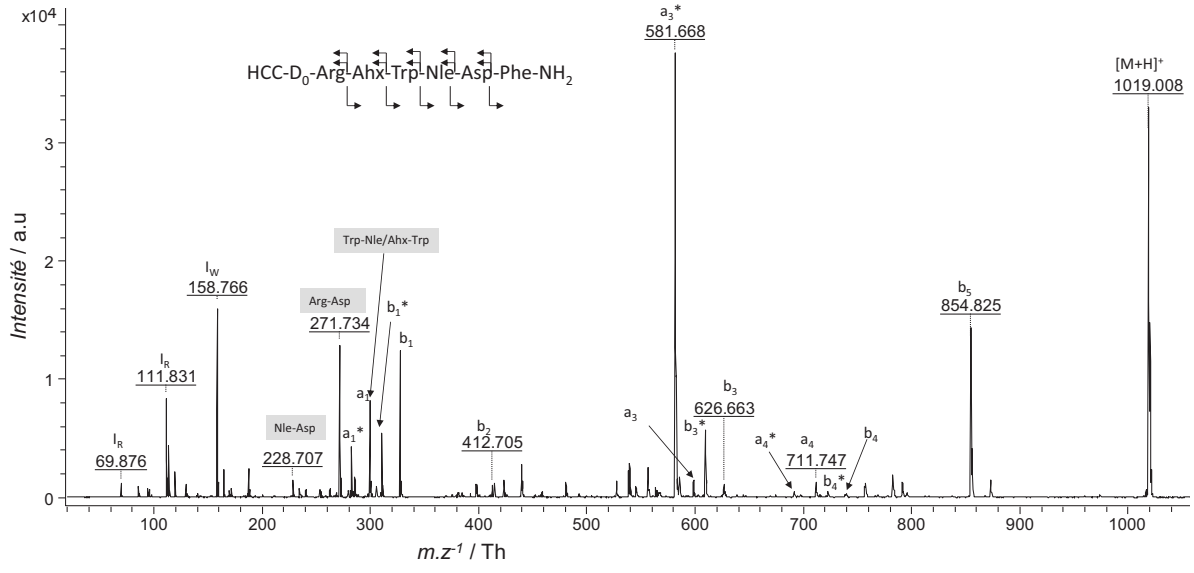


Spectre 17 : Spectres de masse obtenu sur système ZQ 2 000 pour les peptides MR 10-D_0 (en haut) et MR 10-D_4 (en bas), avec les ions mono- et dichargés avec une perte d'ammoniac et d'eau sur l'ion dichargé

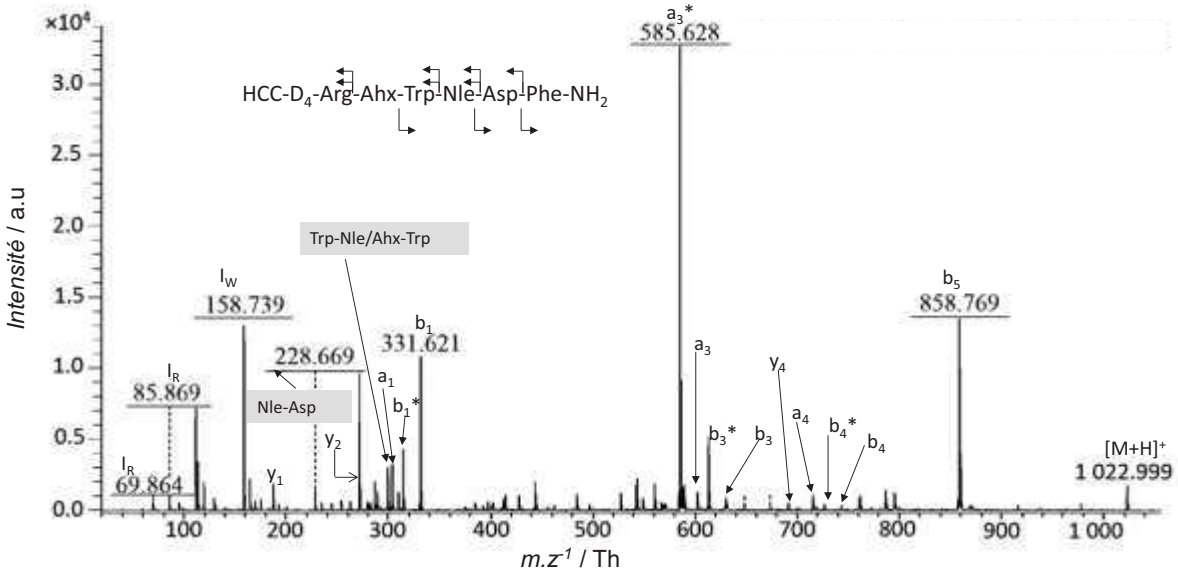
VI. Contrôle par MS^2 : caractérisation des séquences peptidiques

VI.A. Les peptides MR 9–D_0 et MR 9–D_4

La fragmentation de ces deux peptides a donné un bon nombre conséquent d'ions de séquence qui permettent par recoupement de couvrir l'ensemble de leur séquence. Différentes formes d'ions immonium de l'arginine ainsi que l'immonium du tryptophane (voir Spectre 18 et Spectre 19 ci-dessous) sont détectés sur ce spectre.



Spectre 18 : Spectre de fragmentation du peptide MR 9–D_0 obtenu sur MALDI-ToF/ToF Ultraflex III, Bruker Daltonics©



Spectre 19 : Spectre de fragmentation du peptide MR 9–D_4 obtenus sur MALDI-ToF/ToF Ultraflex III, Bruker Daltonics©

Remarquons l'intensité relative particulière de l'ion a_3* pour les formes légères et lourdes de la séquence. Une hypothèse en tant que proposition qui n'a pu être confirmée par des calculs théoriques et qui pourrait expliquer cela ferait intervenir la stabilisation de ce fragment par des interactions π-π entre l'HCCA et le cycle aromatique du tryptophane qui engendrerait la formation d'un cycle ; réarrangement qui serait plus couteux en énergie dans le cas de l'ion b correspondant (dont l'intensité relative est beaucoup plus faible) à cause de la rupture de la liaison C-C pour le départ d'une molécule de CO. Les cinétiques de formation de cycle ont été largement étudiées en phase liquide, en l'occurrence il s'agit d'un cycle à 11 chaînons dont la formation serait sans aucun doute beaucoup plus lente que celles des cycles de 8 à 10 chaînons si l'on partait du principe que les vitesses relatives de formation des cycles est conservé en phase gaz.[605] En revanche la flexibilité du squelette carboné ajouté à l'interaction π- π entre les noyaux aromatiques permettrait ce rapprochement des deux extrémités, en l'occurrence le carbonyle de la liaison amide entre l'arginine et le 6-aminohexanoyle et l'imminium du fragment tryptophane. Grâce à cette contrainte électronique, la cinétique de formation serait augmentée et la dépense énergétique moindre.

[605] J. Clayden, S. Warren, N. Greeves, P. Wothers, *Chimie organique*, De Boeck, Paris; Bruxelles, **2003**

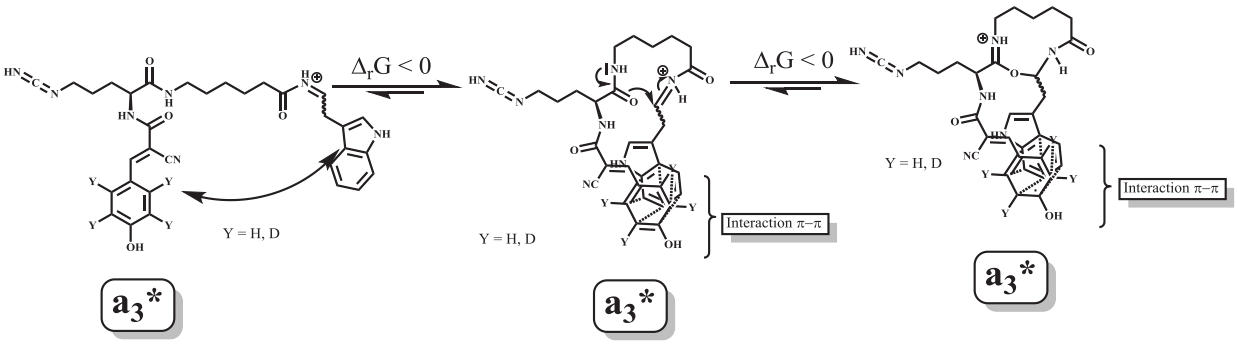
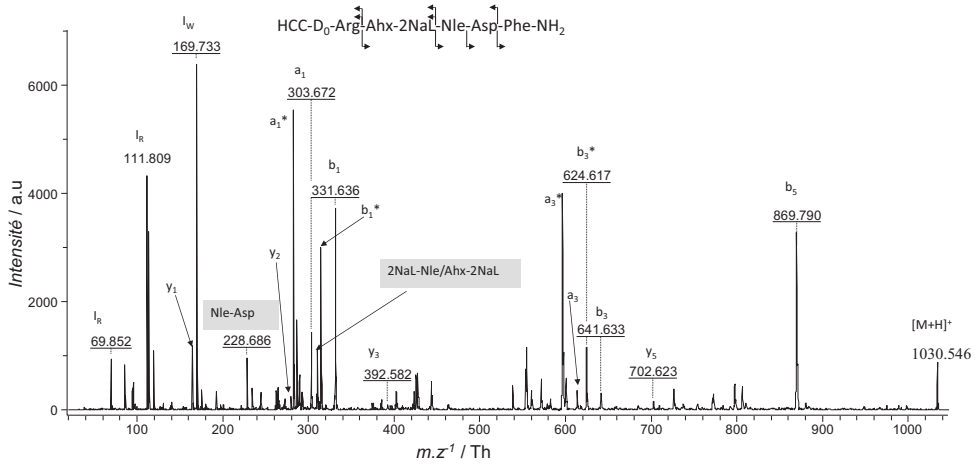


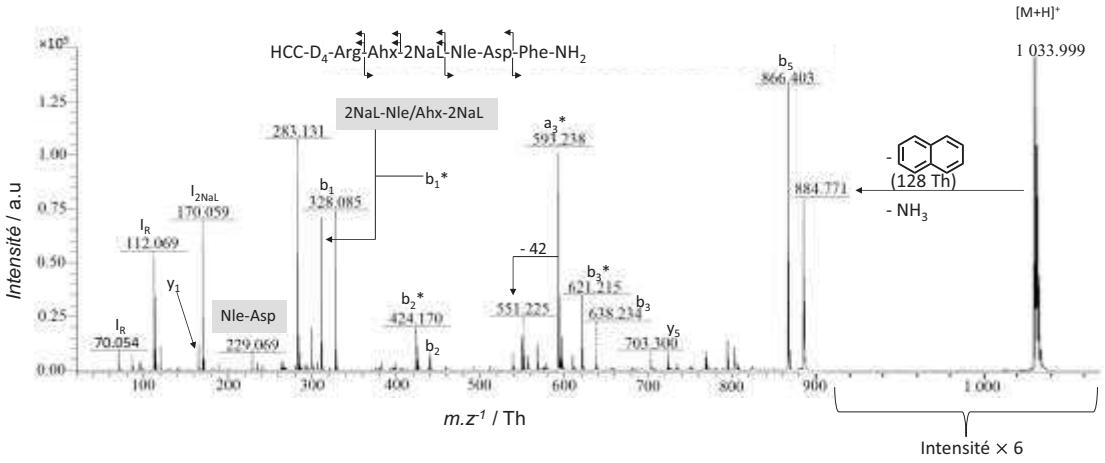
Figure 210: Proposition de réarrangement du fragment a_3* des peptides MR 10-D_0 et MR 10-D_4 particulièrement intense dans les spectres de MS² et structure proposée de celui-ci

VI.B. Les peptides MR 10-D_0 et MR 10-D_4

La fragmentation de ces deux peptides, en revanche a donné des ions de séquence particuliers relativement épars mais qui permettent par recoupement de couvrir l'ensemble de leur séquence sans toutefois assurer de l'enchaînement de certains résidus comme l'Ahx et le 2NaL. Différentes formes d'ions immonium de l'arginine ainsi que l'immonium du tryptophane (voir Spectre 20 et Spectre 21 ci-dessous) de manière similaire au spectres précédents.



Spectre 20 : Spectre de fragmentation du peptide MR 10-D_0 obtenu sur MALDI-ToF/ToF Ultraflex III, Bruker Daltonics©



Spectre 21 : Spectre de fragmentation du peptide MR 10-D_4 obtenu sur MALDI-ToF/ToF Ultraflex III, Bruker Daltonics©

VI.C. Analyse élémentaire des peptides MR 10

La même analyse élémentaire, similaire à ce qui a été proposé sur le peptide MR 6, a été effectuée sur un échantillon de peptide MR 10 pour donner les résultats présentés dans le Tableau 74 ci-dessous et un contenu peptidique évalué à 88 % en masse de l'échantillon total.

	C[%]	H [%]	N[%]	O[%]
Mesure 1	55,827	5,529	12,776	19,2
Mesure 2	56,171	5,65	12,825	18,889
Moyenne	55,999	5,590	12,801	19,045
Demi écart-type	0,244	0,086	0,034	0,22
Valeur haute	55,755	5,504	14,653	18,825
Valeur basse	56,243	5,676	14,727	19,265
Mesure théorique (1 sel de TFA)	58,780	5,990	14,470	16,780
Valeur mesurée/Valeur théorique			**88 %**	

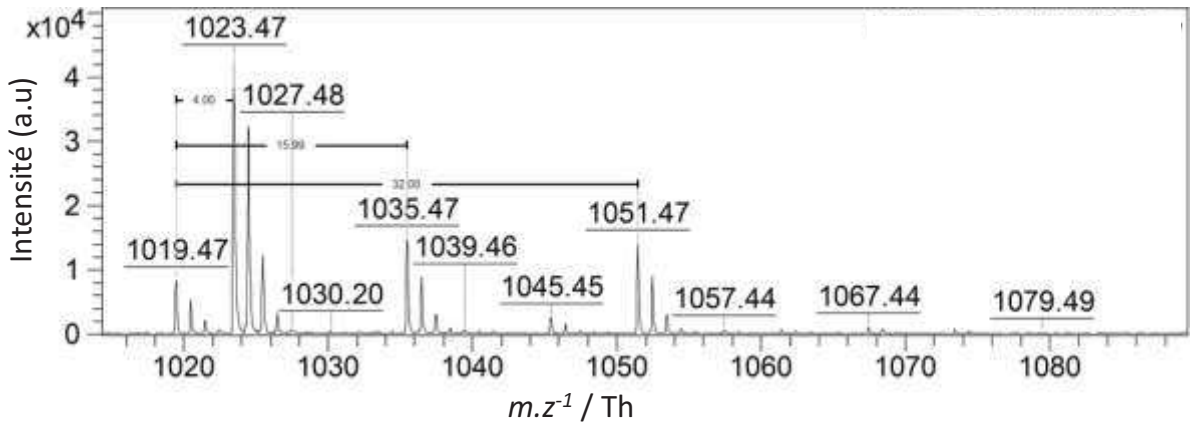
Tableau 74 : Analyse élémentaire du peptide MR 10

VII. Etudes en spectrométrie de masse des peptides du projet CCKB-R

Dans ce paragraphe, nous allons détailler et discuter des résultats obtenus qui concernent les peptides MR 9-D_0/D_4et MR 10-D_0/D_4.

VII.A. Etude du MR 9-D_0 et de ses états d'oxydation

Un échantillon en stock correspondant à ce peptide a été analysé par MALDI-SID-MS dans le but d'évaluer les proportions de formes oxydées du tryptophane parmi l'ensemble des peptides contenu dans l'échantillon en conditions de quantifications optimisées (HCCE 1 et GSP-M1/2). Cet échantillon provient des travaux effectués par G. MIRALLES et sur lequel différents états d'oxydation ont été détectés. L'étalon MR 6-D_4 a été utilisé pour la quantification, et bien que cela ne soit pas idéal, chacun des peptides quantifiés subira le même biais sans distinction.



Spectre 22 : Spectre de masse zoomé de l'échantillon de peptide stocké (synthétisé par G. MIRALLES et correspondant au peptide MR 9-D_0) montrant ses différents produits d'oxydation

D'après le Spectre 22 ci-dessus, il y aurait non seulement un peptide contenant de la kynurénine (+ 4 Th), mais aussi un peptide pouvant contenir l'oxindolyl-L-alanine (+16 Th) et un peptide pouvant contenir la dioxindolyl-L-alanine (+32 Th). D'où le choix de produire un peptide avec du tryptophane protégé et non protégé pendant la synthèse pour confirmer ou non l'oxydation du tryptophane au cours de la synthèse sur support.

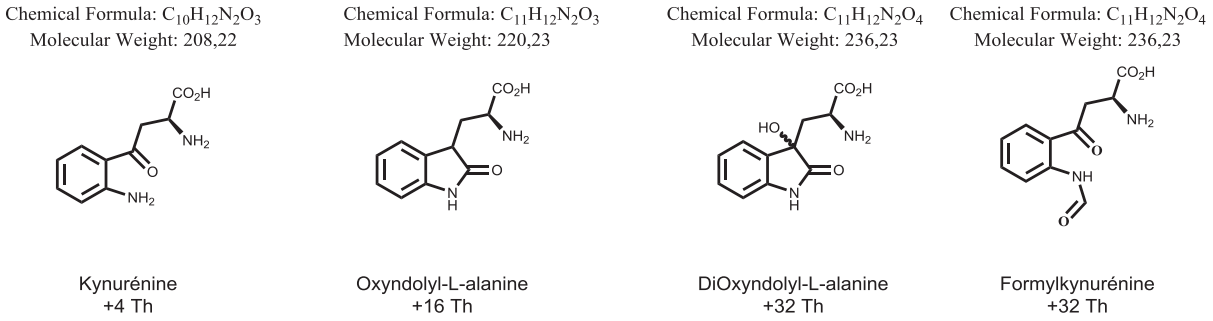


Figure 211 : Structures des formes oxydées du tryptophane connues dans la littérature

Grâce à la quantification par MALDI-SID-MS, il a été possible d'évaluer la proportion de chaque forme (oxydée ou non) du tryptophane dans l'échantillon correspondant à des concentrations de travail en pharmacologie (voir Figure 213 ci-dessous).

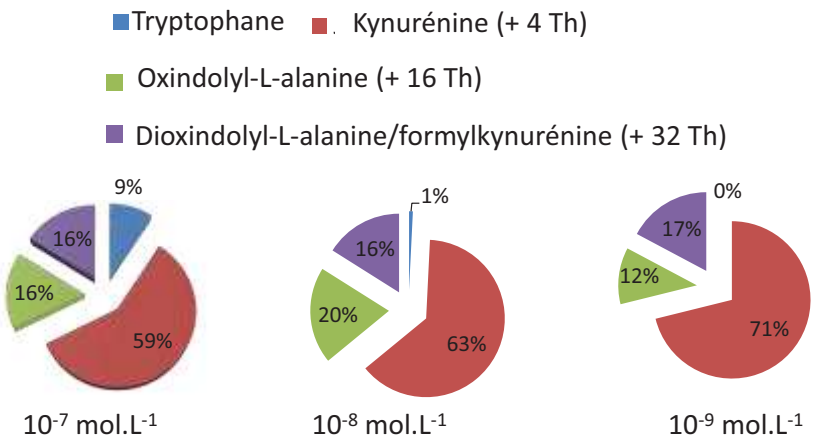


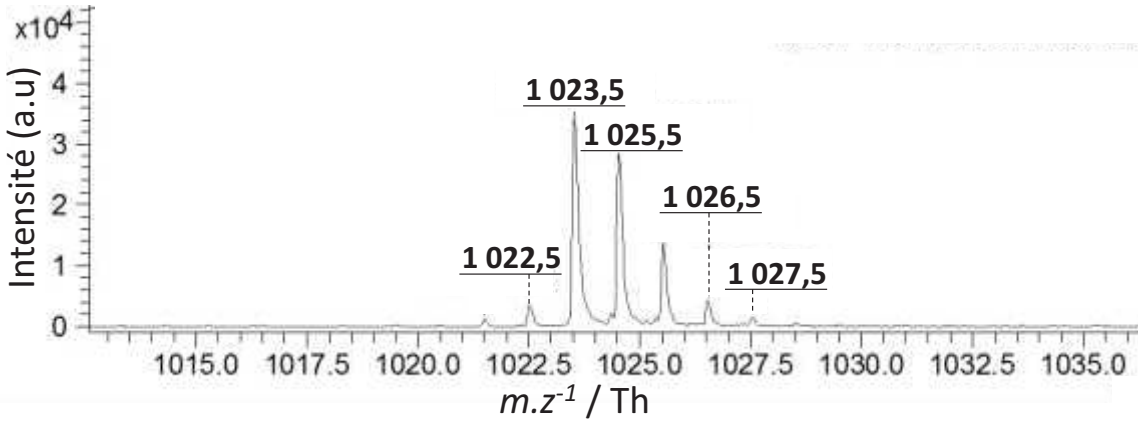
Figure 212 : Proportion des différentes formes oxydées du tryptophane dans l'échantillon stocké correspondant au peptide MR 9-D_0

L'information principale qui se dégage de cette étude est l'importance de la proportion en kynurénine dans l'échantillon à ces concentrations. Cependant cette forme avait démontré une perte d'affinité d'un facteur lors d'essais effectués par G. MIRALLES. Reste les deux autres formes qui semblent être en proportions équivalentes quelle que soit le niveau de concentration.

VII.B. Etude de la proportion d'hydrogène dans l'étalon deutéré

Une étude de la proportion d'hydrogène dans l'échantillon de peptide deutéré qui doit servir d'étalon pour la quantification a été entreprise dans le but d'illustrer la problématique de la conservation de molécules marquées par des isotopes stables, en l'occurrence le deutérium. Le peptide MR 9-D4 a été synthétisé avec un échantillon de marqueur HCCA deutéré et conservé pour pouvoir être couplé sur la chaîne peptidique en croissance.

Un échantillon a été analysé dans les conditions optimisées au cours du développement du projet AVP/V_{1A}. Les résultats sont présentés avec le Spectre 23 ci-dessous et montrent deux pics à - 1 et -2 Th par rapport au pic A_1 du peptide deutéré à 1 023,5 Th.



Spectre 23 : Spectre MALDI-MS du peptide MR 9-D_4 seul destiné à évaluer la proportion d'hydrogène dans cet échantillon deutéré

Il existe donc bien un échange H/D au niveau des protons aromatiques bien que la cinétique soit très lente qui met en évidence la problématique de stockage à longue durée des molécules marquées par des isotopes stables tels que le deutérium soumis à ce type d'échange. Afin d'évaluer cette proportion d'échange, le rapport de la somme pondérée des aires de ces deux pics par la somme des aires des pics visibles (A_1, A_2, A_3, A_4) a été calculé. Cela a abouti à une proportion d'hydrogène évaluée à environ 4 % du contenu total, en partant du principe que la population d'ions obtenus dans le spectre ci-dessus est représentative du contenu de l'échantillon solide. Cela signifierait donc que dans un échantillon de MR 9-D_4 à 10^{-9} mol.L^{-1} on a 0,4.10^{-9} mol.L^{-1} d'hydrogène et donc une surestimation de 4 % maximum et systématique de la quantité de MR 9-D_0. Bien que le biais existe, celui-ci étant systématique, il est connu et peut-être compensé mathématiquement sans incidence sur le résultat final.

VII.C. Détection du peptide MR 10-D_0

La seconde série de peptides synthétisée dans le cadre du projet CCKB-R, à savoir MR 10-D_0/D_4, a subi un examen de sa limite de détection dans les conditions optimisées au cours du projet AVP/V_{1A}. Les analyses ont été répétées et les résultats présentés par la Figure 213 ci-dessous. Cela a

permis, suivant le même principe appliqué à la détermination de la limite de détection du peptide MR 6-D_0, de fixer la limite de détection du peptide MR 10-D_0 à 5.10^{-9} mol.L^{-1} dans la matrice HCCA.

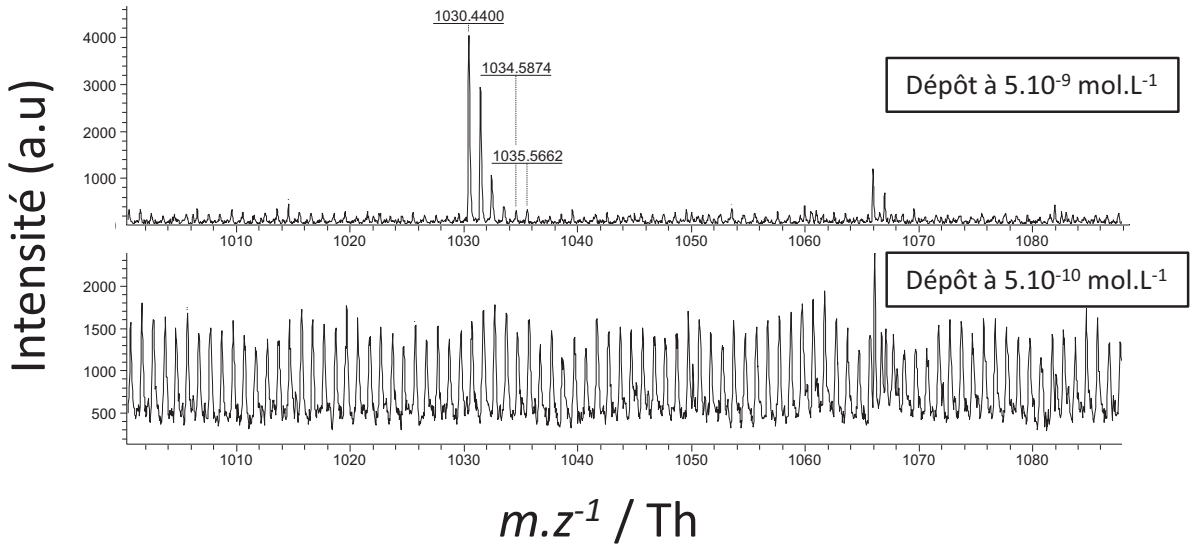


Figure 213 : Illustration de la limite de détection du peptide MR 10-D_0 dans la matrice HCCA déterminée à 5.10^{-9} mol.L^{-1}

Des analyses similaires ont été effectuées dans la matrice HCCE, dont le résultat est présenté par la Figure 214 ci-dessous, pour obtenir une limite de détection fixée à 5.10^{-11} mol.L^{-1}. Dans ce cas-ci également, il est possible de constater l'amélioration de la limite de détection grâce à l'utilisation de la matrice HCCE méthyle.

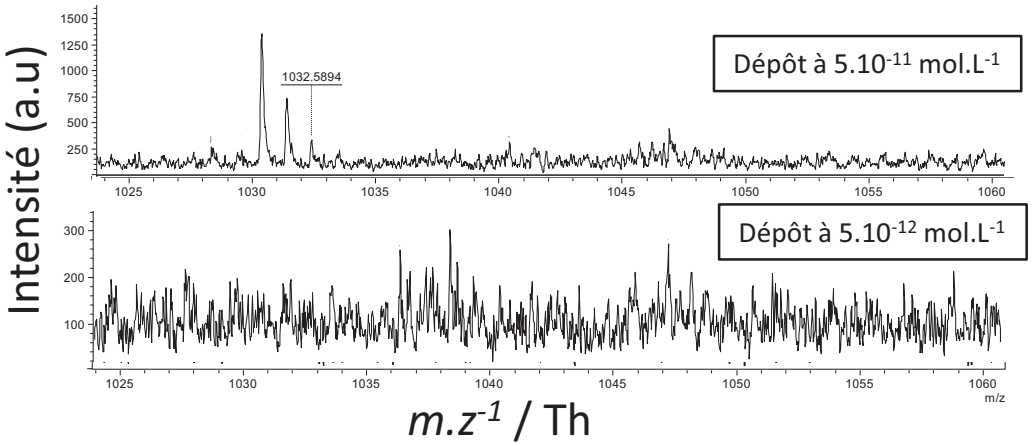


Figure 214 : Illustration de la limite de détection du peptide MR 10-D_0 dans la matrice HCCA déterminée à 5.10^{-11} mol.L^{-1}

VII.D. Validation statistique appliquée au peptide MR 10-D_0

L'étape de validation statistique a été entreprise également dans le cadre du modèle CCKB-R avec les peptides MR 10-D_0 et MR 10-D_4 pour sujet d'étude. Les protocoles mis en place ont été scrupuleusement transférés à partir de ce qui a été mis au point dans le cadre du projet AVP/V_{1A}.

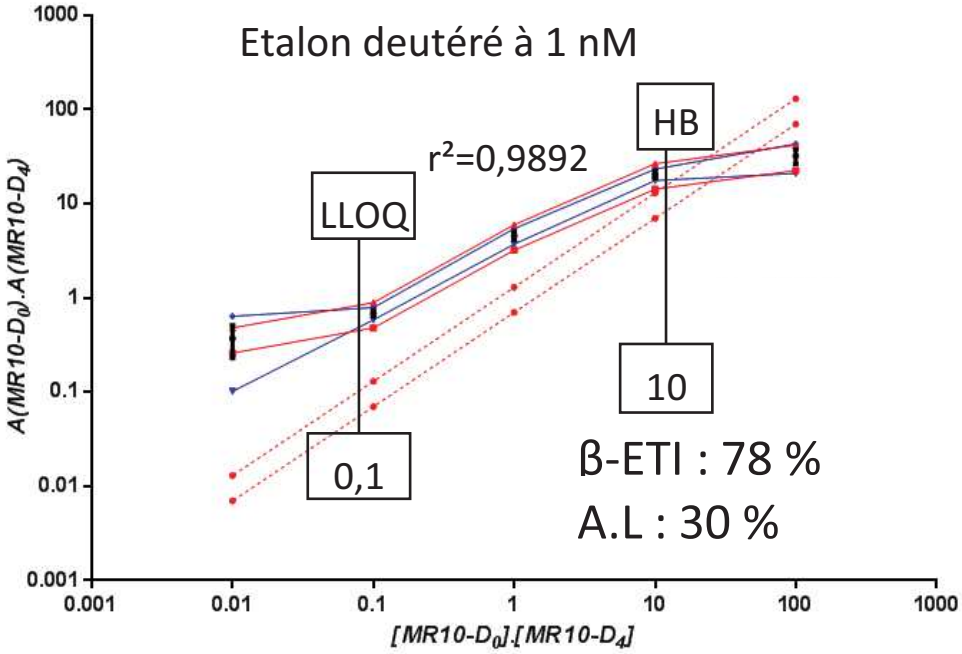


Figure 215 : Validation statistique de la méthode analytique avec les peptides MR 10-D_0 et MR 10-D_4 et une concentration en étalon deutéré de 1 nmol.L^{-1}

Les résultats obtenus sont illustrés par la Figure 215 ci-dessus. La première information concerne ici aussi la présence de plateaux lorsque le rapport analyte/étalon passe sous la barre des 10 % entre les abscisses 0,1 et 0,01 et que l'inverse dépasse les 10 % entre les abscisses 10 et 100. Deuxième information qui peut être retirée de ce graphique : la linéarité des ensembles de points entre les abscisses 0,1 et 10 ainsi que la précision des mesures effectuées. Enfin, la problématique graphique de détermination de LLOQ et de HB se retrouve ici et doit être tranchée conjointement avec l'examen de la linéarité.

	Etalon deutéré à 1 nmol.L^{-1} (Figure 215)
A.L	30 %
β-ETI	78 %
Gamme linéaire (rapports d'aires)	[0,1 ; 10]
Domaine de validation	[0,1 ; 10 nmol.L^{-1}]
r^2	0,999
LLOQ (rapport d'aire)	0,1
HB (rapport d'aire)	10

Tableau 75 : Données de la validation statistique de la Figure 215 pour un étalon à 1 nmol.L^{-1}

Le Tableau 75 ci-dessus nous renseigne sur les métadonnées extraites de cette étape de validation statistique. L'information principale à en tirer est l'obtention de valeurs de A.L et β-ETI très proches des valeurs standard, à savoir 30 % et 80 % respectivement, ce qui est très satisfaisant.

[MR 10-D_0].[MR 10-D_4]$^{-1}$	Biais	RSD_r	RSD_B	RSD_p
100	99 %	51 %	45 %	48 %
10	90 %	14 %	3 %	9 %
1	79 %	16 %	22 %	19 %
0,1	68 %	22 %	12 %	17 %
0,01	72 %	10 %	40 %	25 %

Tableau 76 : Dispersion et biais des mesures de la courbe d'étalonnage de la Figure 215 avec étalon deutéré à 1 nmol.L^{-1}

Le Tableau 76 ci-dessus, quant à lui, nous montre qu'à l'intérieur de la zone de linéarité ([0,1 ; 10]) les coefficients de variation sont tout à fait acceptables et satisfaisant. Cependant, on remarque que les biais calculés par rapport aux concentrations théoriques (lignes rouges pointillées, Figure 215 p.360) semblent systématiquement surestimés. Cette information est à mettre directement en parallèle avec l'étude sur la proportion d'hydrogène dans l'étalon deutéré du paragraphe VII.B p.358. En effet, il était question d'une surestimation des mesures de la molécule hydrogénée de 4 % environ. Il apparaît qu'au final cette surestimation semble beaucoup plus importante. Le point commun à ces deux observations est alors la surestimation du résultat.

VII.E. Protocole d'étalonnage appliqué au peptide MR 10-D_0

Suivant le même processus, un étalonnage plus fin a été entrepris entre 0,1 et 10 nmol.L^{-1} en peptide MR 10-D_0 avec un étalon MR 10-D_4 fixé à 1 nmol.L^{-1}. Le résultat est présenté avec la Figure 216 ci-dessous. Le premier point à noter est la valeur du coefficient de régression linéaire, plus modeste que ce qui avait été obtenu dans le cadre du projet AVP/V_{1A}, avec une pente du même ordre de grandeur et une ordonnée à l'origine plus faible.

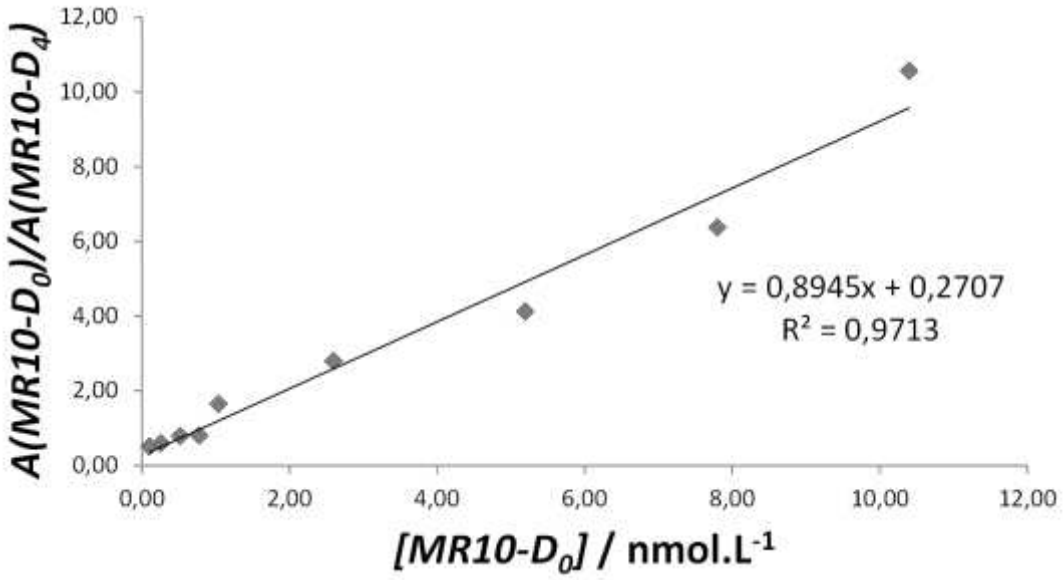


Figure 216 : Courbe d'étalonnage obtenue en représentant les moyennes de 6 mesures de rapports d'aire entre les peptides MR 10-D_0 et MR 10-D_4 en fonction de la concentration en peptide MR 10-D_0

Le second point concerne les métadonnées suivantes : moyenne des mesures de rapport d'aire, erreur sur la moyenne, coefficients de variation des mesures, valeurs théoriques de la régression linéaire, biais par rapport à la régression linéaire, et biais théorique (voir Tableau 77 ci-dessous). Le premier point à relever de ce tableau est l'ensemble des coefficients de variation des mesures qui sont tous très satisfaisant et pour la plupart sous la barre des 20 % voir sous la barre des 10 %. Ceci démontre la précision de l'étalonnage et la reproductibilité de celui-ci. Ajoutons à cela les erreurs sur la moyenne calculées qui, elles aussi, affichent des valeurs extrêmement faibles et qui reflètent une bonne précision de la valeur de la moyenne et sont de l'ordre de 10 % et moins pour les valeurs inférieures ou égales à 1 $nmol.L^{-1}$ ou moins de leur moyenne. En revanche, concernant les valeurs proches de 10 $nmol.L^{-1}$ l'erreur sur la moyenne est beaucoup plus importante et peut s'expliquer par une variation particulièrement importante sur les mesures de ces deux points en particulier étant donné que tous les autres résultats ont des valeurs tout à fait correctes.

A(MR 10-D_0) / A(MR 10-D_4) théorique	[MR 10-D_0] $nmol.L^{-1}$	A(MR 10-D_0) / A(MR 10-D_4) mesuré	SEM	C.V	Valeurs de régression	Biais de regression	Biais théorique
10,10	10,40	10,56	0,50	11 %	9,57	10 %	5 %
7,57	7,80	6,37	0,51	17 %	7,25	-12 %	-16 %
5,05	5,20	4,11	0,16	9 %	4,92	-16 %	-19 %
2,52	2,60	2,79	0,20	16 %	2,60	7 %	10 %
1,01	1,04	1,64	0,08	12 %	1,20	36 %	62 %
0,76	0,78	0,79	0,02	5 %	0,97	-19 %	4 %
0,50	0,52	0,78	0,04	13 %	0,74	6 %	54 %
0,25	0,26	0,59	0,04	18 %	0,50	16 %	132 %
0,10	0,10	0,50	0,05	23 %	0,36	38 %	396 %

Tableau 77 : Représentation des résultats d'un étalonnage dans le cadre du projet CCKB-R. La moyenne et son erreur associée, ainsi que les coefficients de variation et les biais des mesures par rapport à la droite de régression linéaire sont affichés de même que les valeurs théoriques provenant de cette régression linéaire et le biais théorique par rapport au rapport d'aire théoriquement attendu et correspondant au rapport des concentrations préparées donné par l'Equation 14 p.281

VIII. Application à CCKB-R Modèle CCKB/CCKB-R :

Dans le cadre de ces travaux de thèse, le gène codant pour le récepteur CCKB a été transfecté par D. FOURMY du Laboratoire de Réceptologie et Ciblage Thérapeutique en Cancérologie de l'université de Toulouse (RCTC) dans des cellules HEK293 de manière stable pour y être surpexprimé. Ceci sera le système cellulaire qui servira de modèle aux études pharmacologiques décrites aux paragraphes suivants. La représentation primaire du récepteur avec l'enchaînement des différents résidus d'acides aminés et les prédictions des domaines transmembranaires sont présentées dans la Figure 217 ci-dessous.

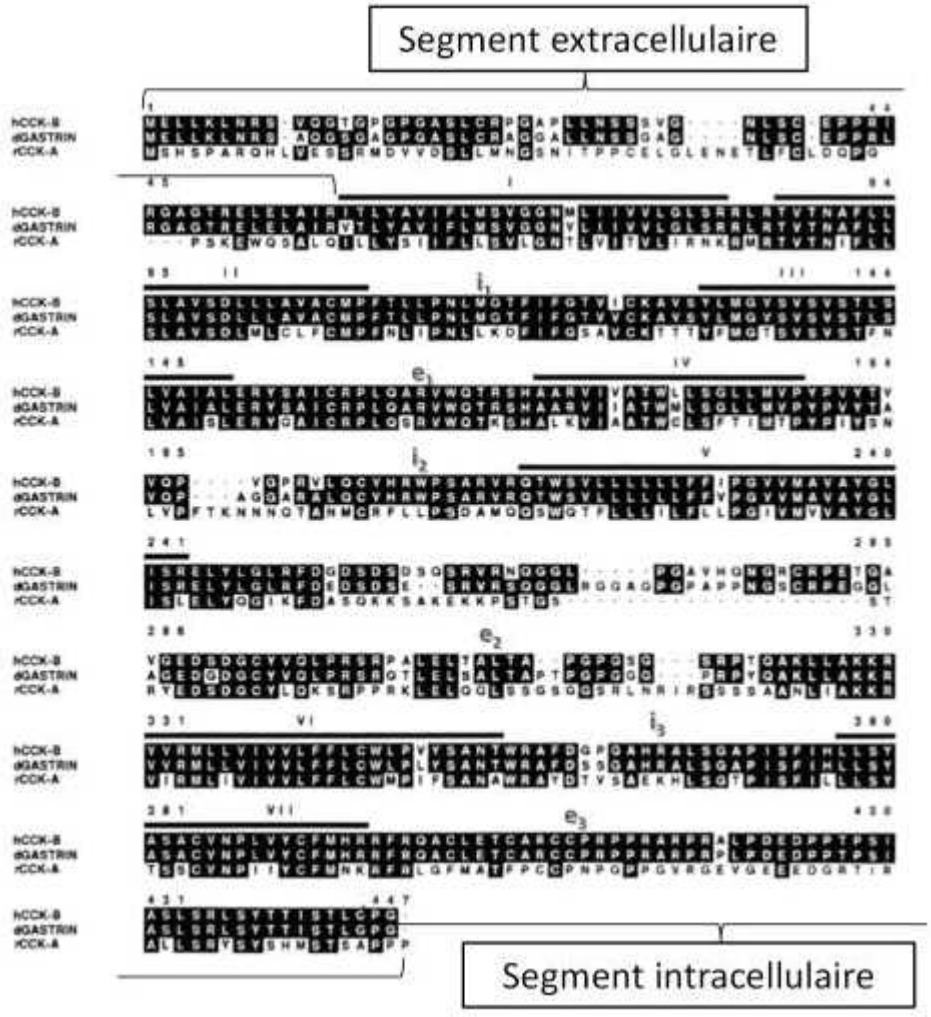


Figure 217 : Séquence primaire du récepteur CCKB humain (hCCK-B) aligné avec les séquences du récepteur à gastrine canin (dGASTRIN) et la séquence du récepteur CCK-A murin (rCCK-A)[606]. Les résidus en noirs sont communs à deux séquences au moins et les barres numérotées de I à VII correspondent aux domaines transmembranaires prédits par algorithme

[606] Y. M. Lee, M. Beinborn, E. W. McBride, M. Lu, L. F. Kolakowski, A. S. Kopin, *J. Biol. Chem.* **1993**, *268*, 8164–8169

VIII.A. Dosage des membranes

Le dosage des protéines membranaires de la lignée de cellules HEK293 a été effectué sur un aliquot de préparation membranaire conservé à cet effet. Le procédé, identique à ce qui a été effectué sur les cellules CHO-V_{1A}, consiste à tracer une droite d'étalonnage grâce à une gamme de BSA en solution. Dans un second temps, l'absorbance du tampon comportant de l'albumine de boeuf est mesurée afin d'être soustrait à la mesure effectuée sur l'aliquot de préparation membranaire.

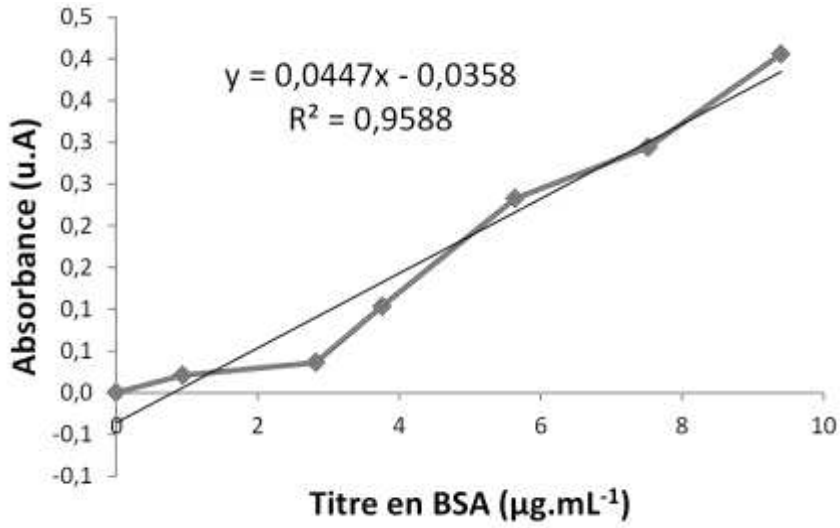


Figure 218 : Droite d'étalonnage pour la mesure de l'absorbance UV de solutions de préparation membranaire obtenues à partir de cellules HEK293 surexprimant le récepteur CCKB

Pour assurer une mesure moyenne et prévenir toute erreur de pipetage qui pourraient conduire à une sous-estimation ou une surestimation du titre membranaire, plusieurs mesures de la sont effectuées sur différents aliquots afin d'obtenir, grâce à la régression linéaire (voir Figure 218 ci-dessus) le titre de protéines pour chaque mesure effectuée (voir Tableau 78 ci-dessous). Dans le cas du lot de préparation membranaire, un titre en protéine moyen de 1,6 $mg.mL^{-1}$ a été obtenu et sera utilisé pour déterminer le nombre d'aliquots de préparation membranaire à utiliser pour chaque expérience sur le récepteur correspondant.

	Moyenne d'absorbance ; n = 3 (u.A)	Titre de protéines membranaires ($\mu g.mL^{-1}$)
Lot 1	0,1331	1 890
Lot 2	0,0872	1 376

Tableau 78 : Tableau donnant les mesures d'absorbance des préparations membranaires de cellule HEK293 surexprimant le récepteur CCKB et des titres associés

VIII.B. Expérience de saturation par MALDI-SID-MS

Après avoir validé la méthodologie de quantification de l'étape de dépôt jusqu'à la mesure de la constante de dissociation, celle-ci a été appliquée sur un second modèle de récepteur pour un atteindre un second niveau de validation.

Dans le cadre du projet basé sur le récepteur CCKB, un ligand peptidique modifié avec un résidu portant un fragment napthylalanine sur sa chaîne latérale qui se substitue au tryptophane doit amener à un choix en ce qui concerne les concentrations utilisées pour l'incubation. En effet, un tel remplacement peut probablement ne pas affecter l'affinité du ligand, comme cela a été le cas en modifiant le fragment en position N-terminale du peptide MR 5, plus probablement diminuer cette affinité ou moins certainement améliorer l'affinité. Le choix s'est orienté vers une perte potentielle d'affinité étant donné qu'il est difficilement concevable de pouvoir améliorer une affinité d'un composé pour son récepteur certainement déjà optimisée par des centaines de milliers d'années d'évolution.

C'est la raison pour laquelle la gamme de concentration a été étendue jusqu'à 50 nmol.L^{-1} en supposant une saturation de la liaison spécifique. Dans l'optique de conserver une quantification fiable, la concentration utilisée en étalon deutéré pour l'étalonnage fin sur 2 ordres de grandeur a été fixée à 10 nmol.L^{-1} assurant la mesure jusqu'à 1 nmol.L^{-1}.

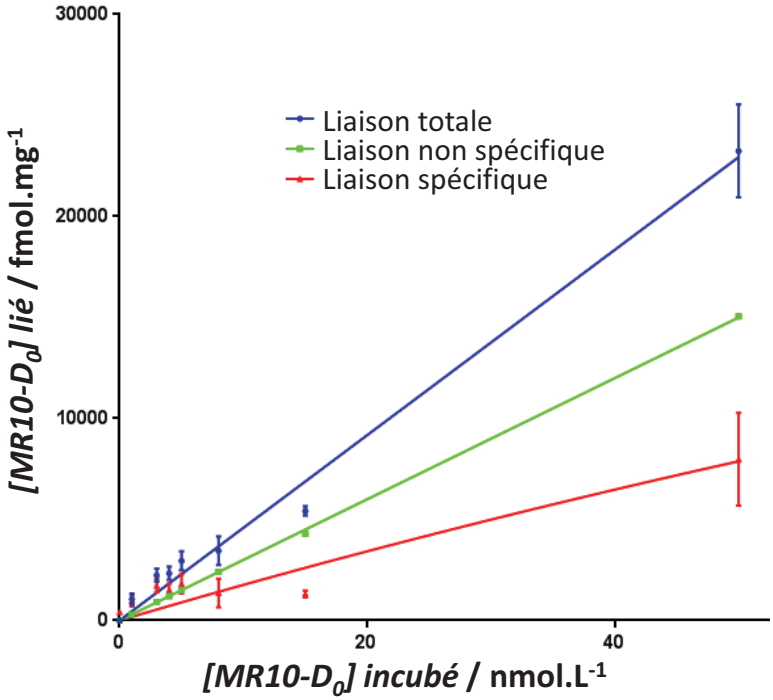


Figure 219 : Courbe de saturation du peptide MR 10-D_0 portant un marquage HCCA pour une quantification par MALDI-SID-MS

Le résultat de cette première mesure a été surprenant (voir Figure 219 ci-dessus) puisqu'il a amené à une liaison totale qui ne montre pas de signe de saturation y compris à 50 nmol.L^{-1} La constante de dissociation qui a alors été mesurée à l'aide du logiciel Graphpad Prism 6.0© est la suivante K_d(MR 10-D_0) = 329 nmol.L^{-1}. Une certitude, quant à cette valeur ainsi que l'allure de la courbe, est la perte d'affinité flagrante du ligand envers le récepteur CCKB d'au moins deux ordres de

grandeur, sachant que l'affinité du ligand portant un tryptophane avait été évaluée à 5,4 nmol.L-1 lors de la thèse du Dr. G MIRALLES.[607] La courbe présentée par la Figure 219 ci-dessus semble indiquer le début d'une saturation avec des valeurs croissantes de ligand lié sans qu'aucun plateau asymptotique n'est visible, ce qui implique que la gamme de concentrations d'incubation choisie n'est pas appropriée. Cela s'explique par le fait que la constante de dissociation visée était supposée proche de 5 nmol.L^{-1}, avec l'hypothèse d'une perte d'affinité pour une valeur proche de 30 à 40 nmol.L^{-1}. Les prévisions étaient visiblement sous-estimées et ce n'est qu'à posteriori, avec le tracé de cette courbe, qu'il a été possible de s'en rendre compte.

	Liaison totale			**Liaison non spécifique**				**Liaison spécifique**		
[MR 10-D_0] incubé en nmol.L^{-1}	**Moyenne (fmol. mg^{-1})**	SEM (fmol. mg^{-1})	CV (%)	**Régression linéaire (fmol.mg^{-1})**	Moyenne (fmol. mg^{-1})	SEM (fmol. mg^{-1})	CV (%)	**Moyenne (fmol. mg^{-1})**	SEM (fmol. mg^{-1})	CV (%)
50	**23 242**	2 296	24	**15 057**	15474	819	13	**7 976**	2 296	70
15	**5 419**	227	10	**4 288**	3570	330	23	**1 307**	174	30
8	**3 447**	702	50	**2 409**	2398	349	33	**1 354**	702	127
5	**2 955**	467	39	**1 506**	1566	212	33	**1 802**	467	63
4	**2 334**	323	34	**1 205**	1052	92	21	**1 495**	323	53
3	**2 239**	316	35	**903**	0	0	-	**1 715**	316	45
1	**1 051**	274	58	**301**	0	0	-	**979**	284	71
0,0	**0**	0	-	**0**	0	0	-	**416**	0	0

Tableau 79 : Tableau résumé des points de mesure concernant la constante de dissociation du peptide MR 10-D_0 représenté par la Figure 219 p.365

Les résultats numériques du tracé de la courbe sont présentés dans le Tableau 79 ci-dessus et montrent pour la plupart des points des erreurs sur la moyenne acceptables malgré des coefficients de variation très important.

Une hypothèse fondamentale pourrait expliquer cette variabilité ; celle-ci ferait intervenir les interactions π-π qui peuvent favoriser un repliement du peptide lors de la phase de séchage du dépôt sur plaque MALDI qui aurait pour conséquence de faire varier le rendement d'ionisation de ce peptide en particulier. La seule certitude à ce stade est la faible quantité de ligand lié, récupéré et mesuré par rapport à ce qui était attendu et matérialisé par un choix d'étalon à 10^{-8} mol.L^{-1} qui a donné des massifs isotopiques de l'analyte d'intensité relative plus faible qu'attendue (voir Figure 220 ci-dessous).

[607] Guillaume MIRALLES, « Conception et synthèse de nouveaux outils chimiques pour l'étude des phosphoprotéines et la caractérisation de la liaison d'un ligand à son récepteur par spectrométrie de masse MALDI-TOF », Thèse de doctorat en ingénierie moléculaire, sous la direction de Gilles Subra, Montpellier, Université de Montpellier 1, 2012

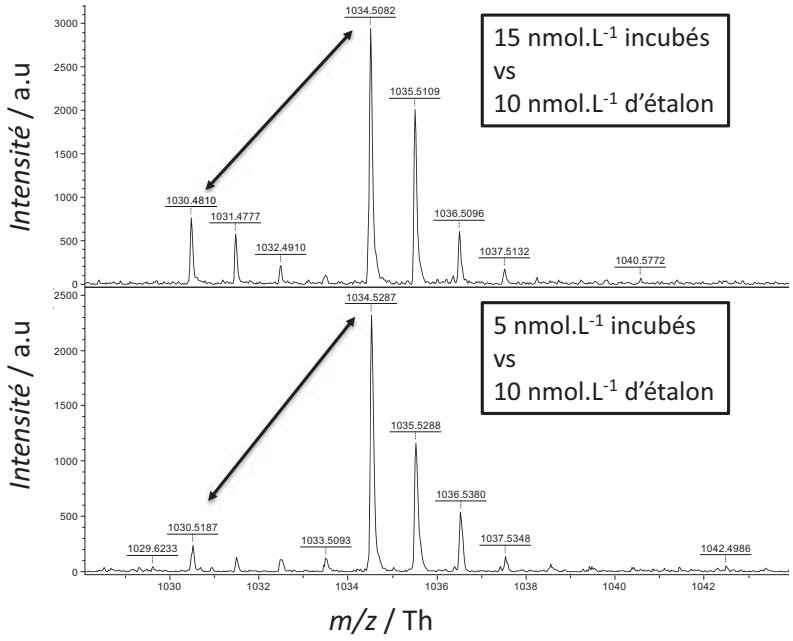


Figure 220 : Incohérence entre le massif isotopique de l'analyte à m/z = 1 030,5 Th et celui de l'étalon à 1 034,5 Th à une concentration de 10 nmol.L^{-1}

Une seconde analyse a été entreprise avec un étalon deutéré à 1 nmol.L^{-1} après ces constatations sur l'intensité relative des massifs isotopiques entre l'étalon deutéré et l'analyte hydrogéné. Cela a permis de tracer les courbes de liaison spécifique représentées dans la Figure 221 ci-dessous. La série A correspond au tracé avec un étalon de 10 nmol.L^{-1} et la série B avec un étalon à 1 nmol.L^{-1}.

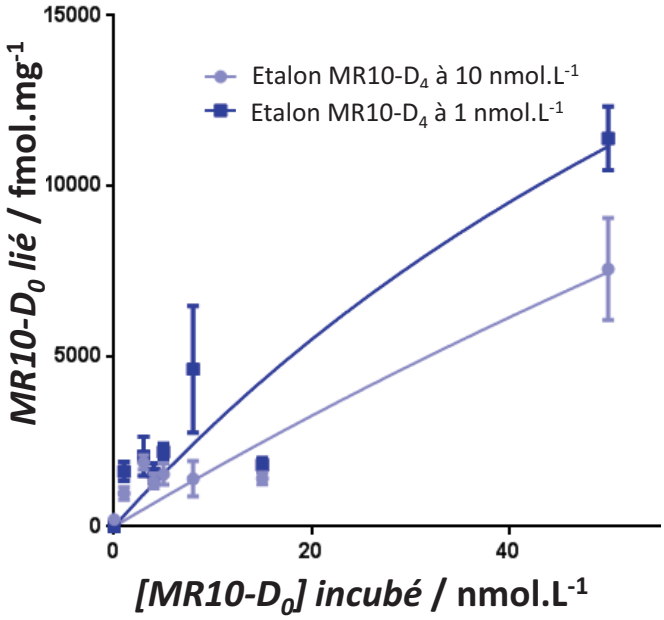


Figure 221 : Courbes de liaison spécifique du peptide MR 10-D_0 envers le récepteur CCKB-R en utilisant deux concentrations d'étalon différentes représentant deux tracés de la liaison spécifique obtenus par deux méthodes de calculs différentes après quantification par MALDI-SID-MS. La courbe bleu clair correspondant à la quantification par l'étalon à 10 nmol.L^{-1} tandis que la courbe bleu marine correspond à celle effectuée avec un étalon à 1 nmol.L^{-1}

Le résultat comparatif montre une liaison spécifique qui semble saturer de façon plus marquée pour donner une valeur de constante de dissociation K_d(MR 10-D_0) = 110 nmol.L-1. Cette valeur est comprise dans l'intervalle acceptable de différence de mesure biologique, mais reste tout de même bien supérieure à la constante de dissociation du peptide correspondant avec un tryptophane substituant le résidu naphtylalanine.

	Liaison spécifique (Etalon MR 10 – D_4 à 10 nmol.L^{-1})			**Liaison spécifique (Etalon MR 10 – D_4 à 1 nmol.L^{-1})**		
[MR 10-D_0] incubé en (nmol.L^{-1})	Moyenne (fmol.mg^{-1})	SEM (fmol.mg^{-1})	CV (%)	Moyenne (fmol.mg^{-1})	SEM (fmol.mg^{-1})	CV (%)
50	6 070	1 566	58	11 735	1 403	29
15	1 307	174	30	1 880	298	39
8	1 354	702	127	4 729	2 822	146
5	1 802	467	63	2 249	358	36
4	1 495	323	53	1 604	437	67
3	1 715	316	45	1 244	104	19
1	979	284	53	1 653	427	58
0	0	0	0	0	0	-

Tableau 80 : Tableau résumé des points de mesure concernant la constante de dissociation du peptide MR 6-D_0 représenté par la Figure 221 p.367

En conclusion, le peptide MR 10-D_0 montre avec certitude une perte d'affinité envers le récepteur CCKB suite à la substitution du résidu tryptophane originel. Cependant, une étude approfondie portant sur une optimisation de la gamme de concentrations placées en incubation permettrait un tracé plus fin et précis de la courbe de saturation de ce peptide.

Le paragraphe suivant sera, quant à lui, dédié à la comparaison des différents traitements de données opérés de manière similaire à ce qui a été proposé dans le cadre du projet AVP/V_{1A}.

VIII.C. Comparaison entre une quantification « directe » par dilution isotopique et une quantification avec droite d'étalonnage

Au cours de ce paragraphe nous allons, de façon similaire à ce qui a été discuté pour le projet AVP/V_{1A}, comparer les deux traitements de données proposés avec la méthodologie de quantification par MALDI-SID-MS.

Le principe repose sur les mêmes bases, à savoir évaluer la valeur de constante de dissociation du peptide d'intérêt, en l'occurrence MR 10-D_0, suivant deux traitements différents que sont la quantification directe à partir de l'équation donnant la concentration de ce dernier en fonction de celle de l'étalon et du rapport de leur aire respective, d'une part et la quantification passant par un étalonnage fin.

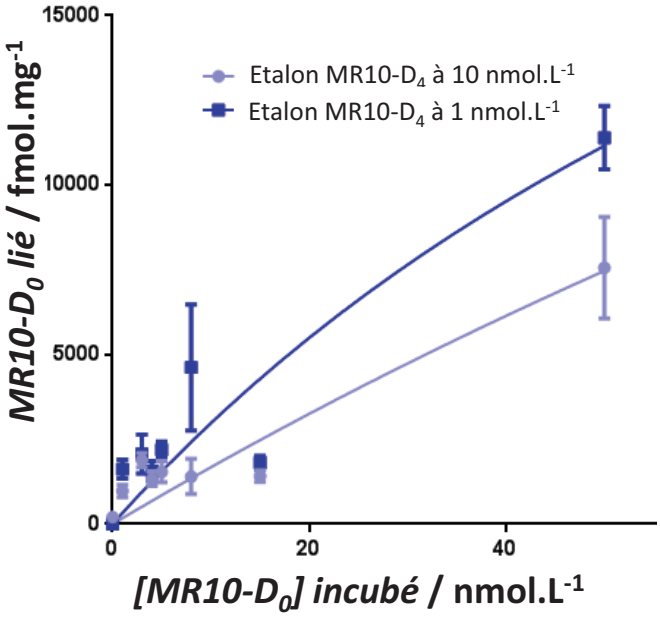


Figure 222 : Courbes de saturation du peptide MR 10-D_0 représentant deux tracés de la liaison spécifique obtenus par deux méthodes de calculs différentes après quantification par MALDI-SID-MS en utilisant une concentration d'étalon de 10 nmol.L^{-1}

Ces deux traitements ont été dans un premier temps appliqué à la mesure de liaison spécifique obtenue avec un étalon de 10 nmol.L^{-1} (voir Figure 221 p.367). Comme il est possible de le constater sur la Figure 222 ci-dessus, les deux courbes obtenues sont très proches et semblent afficher très peu de différence entre elles. Cela se retrouve dans les valeurs de constantes de dissociations obtenues qui sont les suivantes : K_d(directe) = 127 ± 49 nmol.L^{-1} et K_d(étalonnage) = 204 ± 125 nmol.L^{-1}. Ces deux valeurs sont toutes deux suffisamment proches pour que, d'un point de vue pharmacologique, elles puissent être confondues en tenant compte de l'erreur sur la moyenne. Celle-ci provient du traitement des données qui a été effectué et reflète donc directement l'erreur imputable aux différentes méthodes qui vont se servir d'une droite de régression linéaire passant le point d'abscisse et d'ordonnée 0 concernant la liaison non spécifique, rendue légitime par la Figure 190 p.323, ainsi qu'une droite d'étalonnage passant par ce même point d'abscisse et d'ordonnée 0.

	Liaison spécifique (Directe)			Liaison spécifique (étalonnage)		
[MR 10-D_0] incubé en (nmol.L^{-1})	Moyenne (nmol.L^{-1})	SEM (nmol.L^{-1})	CV (%)	Moyenne (nmol.L^{-1})	SEM (nmol.L^{-1})	CV (%)
50	7 153	2 114	72	7 976	2 296	70
15	1 703	209	30	1 307	174	30
8	1 200	738	138	1 354	702	127
5	1 278	430	82	1 802	467	63
4	1 180	298	62	1 495	323	53
3	2 062	291	35	1 715	316	45
1	968	252	58	979	284	71
0	0	0	-	0	0	-

Tableau 81 : Tableau de comparaison entre les points de mesure concernant la constante de dissociation du peptide MR 10-D_0 représenté par la Figure 222 p.369 selon la méthode de calcul

Les résultats numériques relatifs à cette étude comparative sont présentés dans le Tableau 81 ci-dessus qui présente les moyennes, leur erreur et le coefficient de variation des mesures. L'information à extraire de ce tableau est le fait que quel que soit le traitement mathématique utilisé pour l'extraction des métadonnées, celui-ci n'a pas d'impact significatif sur la précision des valeurs dans le sens où les coefficients de variations et les erreurs restent dans le même ordre de grandeur.

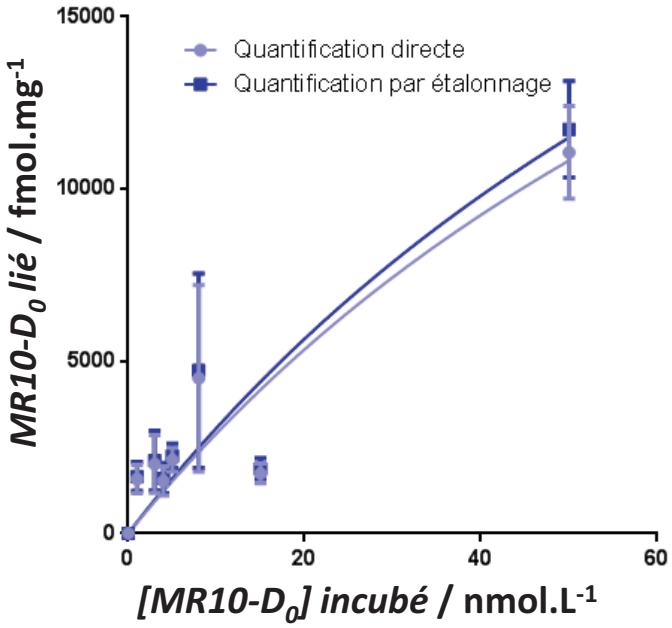


Figure 223 : Courbes de saturation du peptide MR 10-D_0 représentant deux tracés de la liaison spécifique obtenus par deux méthodes de calculs différentes après quantification par MALDI-SID-MS en utilisant une concentration d'étalon de 1 nmol.L^{-1}

Dans un second temps, ces deux traitements mathématiques ont été appliqués à la mesure de la liaison spécifique obtenue avec un étalon à 1 nmol.L^{-1} (voir Figure 221 p.367). La constatation est identique, à savoir que les deux courbes montrent très peu de différence entre elles avec les

valeurs de constantes de dissociation suivantes : K_d(directe) = 25 ± 1 nmol.L^{-1} et K_d(étalonnage) = 73 ± 38 nmol.L^{-1}. Dans ce cas-ci les deux constantes ne peuvent pas être confondues sur la base de leur erreur associée, cependant elles restent, d'un point de vu pharmacologique, équivalentes car du même ordre de grandeur.

	Liaison spécifique (Directe)			Liaison spécifique (étalonnage)		
[MR 10-D_0] incubé en (nmol.L^{-1})	Moyenne (nmol.L^{-1})	SEM (nmol.L^{-1})	CV (%)	Moyenne (nmol.L^{-1})	SEM (nmol.L^{-1})	CV (%)
50	11 059	1 347	30	11 735	1 403	29
15	1 742	287	40	1 880	298	39
8	4 508	2 710	147	4 729	2 822	146
5	2 139	344	36	2 249	358	36
4	1 524	420	67	1 604	437	67
3	1 182	100	19	1 244	104	19
1	1 583	410	58	1 653	427	58
0	0	0	-	0	0	-

Tableau 82 : Tableau de comparaison entre les points de mesure concernant la constante de dissociation du peptide MR 10-D_0 représenté par la Figure 223 p.370 selon la méthode de calcul

Le Tableau 82 ci-dessus rassemble les données numériques de cette seconde comparaison entre traitements des données et aboutit à des conclusions identiques que sont l'absence de différence significative obtenue en termes d'ordre de grandeur de la précision et de l'erreur sur la moyenne.

Les résultats des constantes de dissociation et des titres maximum en récepteurs calculés selon les deux méthodes de traitement sont résumés dans le Tableau 83 ci-dessous pour une comparaison rapide entre les valeurs numériques.

	Etalon à 10^{-8} mol.L^{-1}				Etalon à 10^{-9} mol.L^{-1}			
Méthode de quantification	**Directe**		**Etalonnage**		**Directe**		**Etalonnage**	
	Moyenne	**SEM**	**Moyenne**	**SEM**	**Moyenne**	**SEM**	**Moyenne**	**SEM**
K_d (nmol.L^{-1})	**127**	**49**	**204**	**125**	**25**	**1**	**73**	**38**
B_{max} (fmol.mg^{-1})	25 526	6 450	40 360	19 380	16 688	165	27 720	9 383

Tableau 83 : Résumé des constantes de dissociation obtenues par saturation et B_{max} mesurés par MALDI-SID-MS selon les deux méthodes de calculs proposées. Les valeurs de B_{max} ont été obtenues par extrapolation logicielle (Graphpad Prism 6.0®)

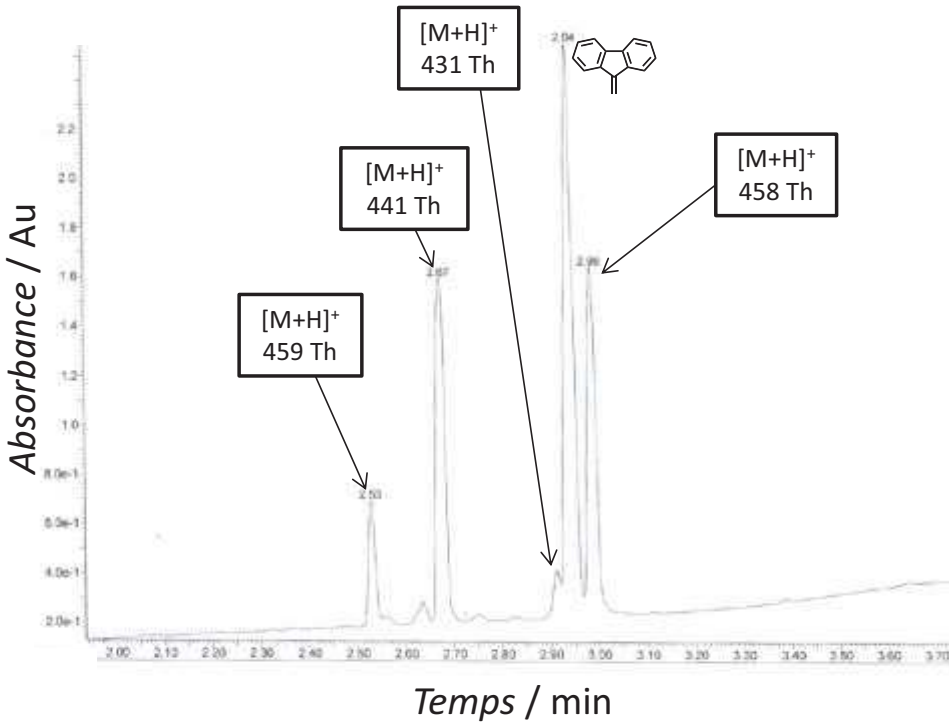
En conclusion, quel que soit le type de traitement des données, celui-ci permet de calculer les constantes pharmacologiques avec d'un côté un gain de temps et de précision et de l'autre, un gain en fiabilité par une procédure standard d'étalonnage.

IX. Etudes sur la fragmentation d'acides aminés modifiés pour CCKB-R

Dans ce paragraphe, nous allons nous focaliser sur l'étude par spectrométrie de masse en tandem des acides aminés modifiés qui ont fait l'objet de tentatives d'isolement par des techniques de purification usuelles en chimie organique. Les structures d'ions fragments proposées sont uniquement issues d'hypothèses et n'ont pas pu faire l'objet d'une étude par calculs théoriques.

IX.A. Analyses en mode MS¹

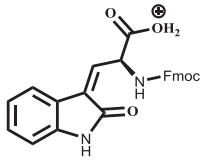
Une fraction de la fraction purifiée de Fmoc-Kyn-OH a été analysée par ESI-MS sur le Synapt G2-S, d'une part et fragmentée sur un piège à ions d'autre part. L'analyse MS a révélée (voir Chromatogramme 5 ci-dessous) que la fraction comportait plusieurs produits qui ont pu être identifiés. Cette fraction de Fmoc-Kyn était le fruit d'une combinaison de fractions issues de chromatographie préparative supposées identiques grâce à un contrôle HPLC-UV. Le résultat des expériences de fragmentation est présenté au paragraphe suivant.



Chromatogramme 5 : Analyse HPLC-UV de la fraction supposée pure de Fmoc-Kyn-OH et identification des masses présentes sous chaque pic

En ce qui concerne la masse 441, on la retrouve à deux temps de rétention différents. Intuitivement il est possible de voir dans cette masse une déshydratation de la masse 459 Th (Fmoc-DiOia-OH) qui aboutit à une molécule davantage apolaire et donc retenue plus longtemps sur la colonne chromatographique, c'est le cas du pic à 2,99 minutes d'élution. La question qui se pose alors revient à comprendre la présence de la masse à 441 Th à 2,57 minutes d'élution. C'est l'analyse des fragments par spectrométrie de masse en tandem qui a permis d'élucider la présence de cette

masse comme étant le produit de déshydratation formé pendant l'analyse de la masse ; preuve en est la présence de l'adduit sodium de l'ion de la molécule Fmoc-DiOia-OH à 481 Th (voir Figure 227 p.375).



Chemical Formula: $C_{26}H_{21}N_2O_5^+$
Exact Mass: 441,1445

Figure 224 : Structure et formule chimiques proposées pour la masse à 441 Th et un temps de rétention de 2,99 minutes

IX.B. Analyses en mode MS^2

Dans ce paragraphe sont présentés les différents spectres de fragmentation obtenus sur piège à ion pour l'analyse de cette fraction supposée de Fmoc-Kyn-OH. Grâce à cet aspect de la spectrométrie de masse, il a été possible d'effectuer une analyse structurale des composés chimiques présents dans cette fraction. Le premier d'entre eux correspond au dibenzofulvène issu de l'hydrolyse du groupement protecteur Fmoc. Les 3 autres ont été identifiés grâce au dépouillement de leur spectre de fragmentation respectif. Le premier à avoir été interprété est le spectre correspondant à l'ion à 458 Th. Sa structure a été déterminée comme correspondant au Fmoc-DiOia-OH ouvert sur l'amide cyclique par de l'ammoniac. Bien que tous les ions correspondent (voir Figure 225 ci-dessous), la question de la provenance de cet ammoniac reste en suspens et l'hypothèse d'une contamination du réacteur également probable.

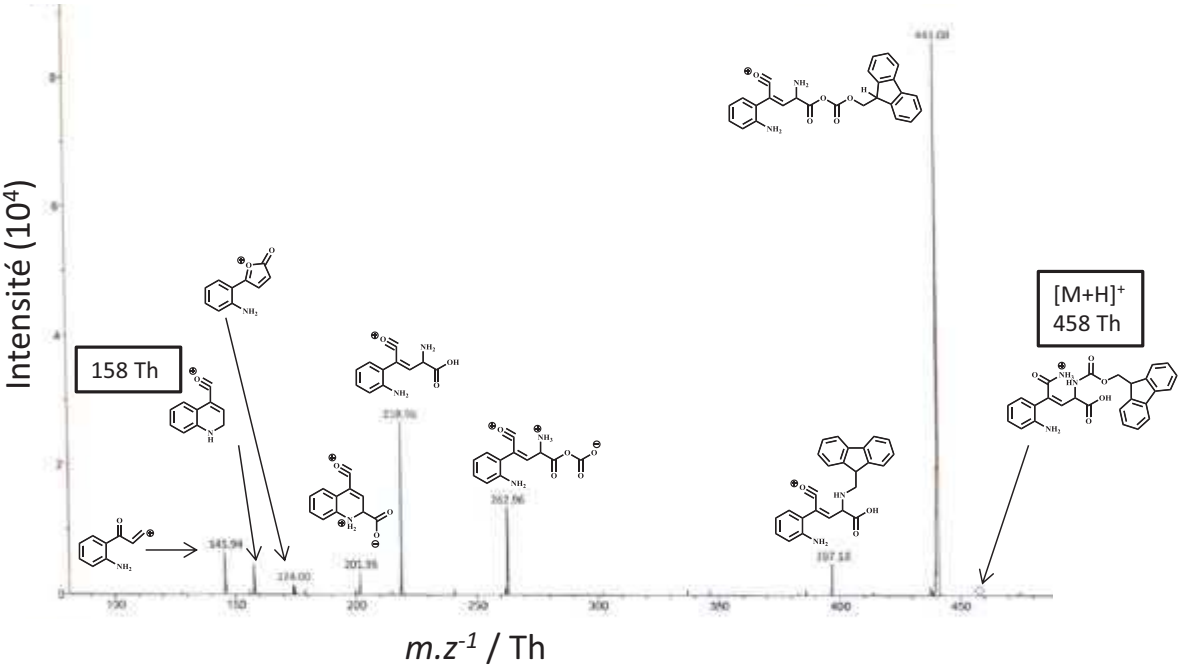


Figure 225 : Spectre de fragmentation de l'ion à 458 Th et propositions de structures de ce dernier ainsi que des fragments obtenus. Les mécanismes de pertes de neutres sont proposés à la Figure 229 p.377

Le spectre MS/MS du fragment à 459 Th a également été dépouillé, et cela a permis de déterminer des structures pour les ions fragments correspondant. Certaines masses pouvant correspondre à différentes structures, une seule a été proposée systématiquement. L'ensemble des structures est proposée dans la Figure 230 p.378.

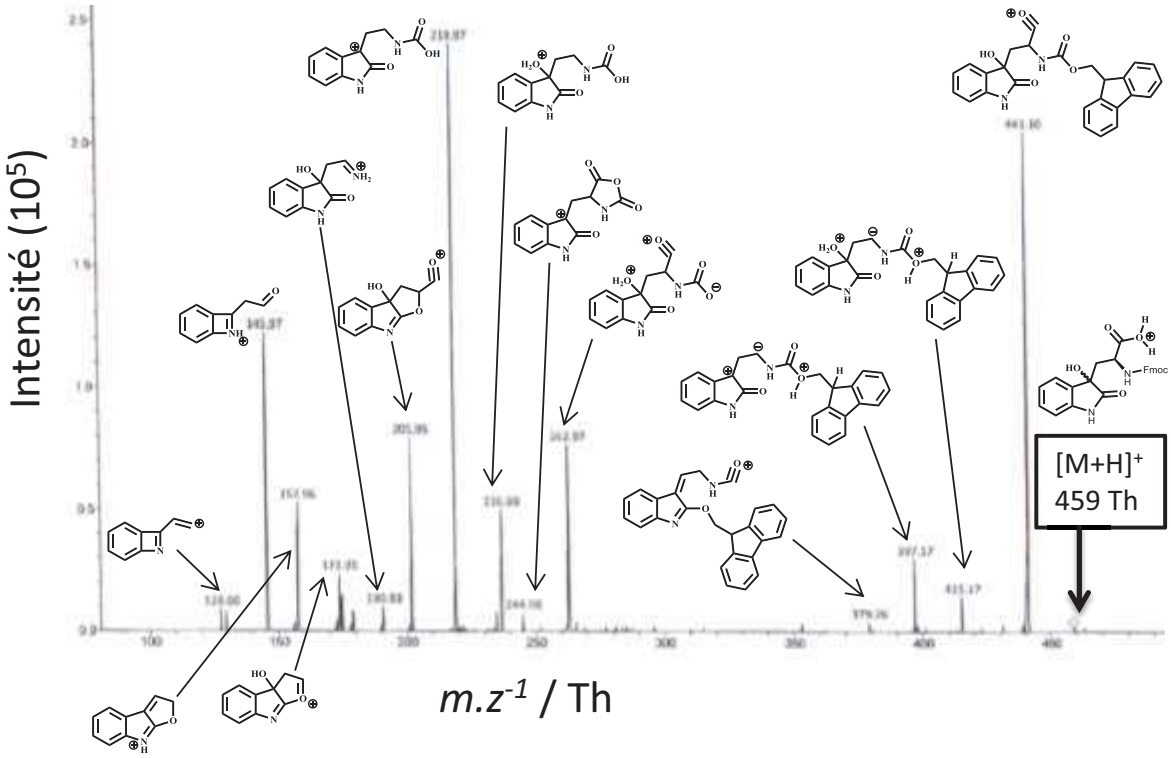


Figure 226 : Spectre de fragmentation de l'ion à 459 Th et propositions de structures de ce dernier ainsi que des fragments obtenus. Les mécanismes de pertes de neutres sont proposés à la Figure 230 p.378

Sur l'un des deux stéréoisomères, la déshydratation qui est clairement visible sur l'analyse UV semble se dérouler pendant l'analyse en solution. Il est possible, compte-tenu de la différence des intensités relatives entre le spectre de la Figure 227 p.375 et celui de la Figure 226 ci-dessus, qu'un des stéréoisomères ait une tendance beaucoup plus prononcée à subir une déshydratation en solution.

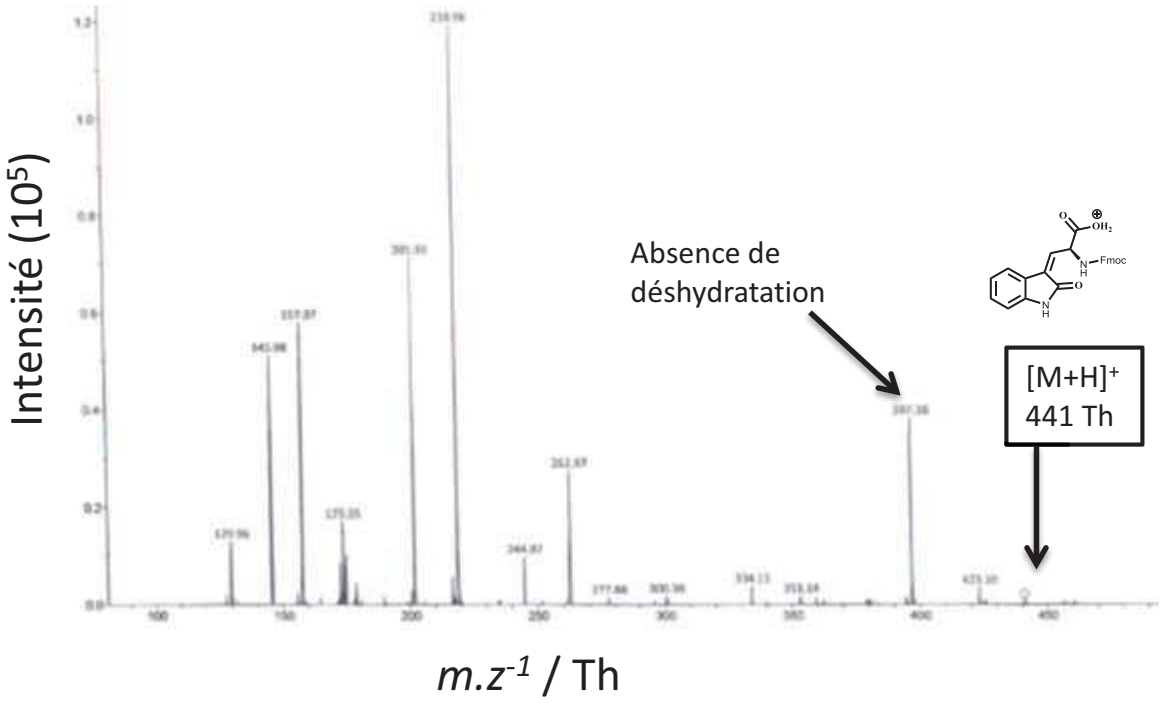


Figure 227 : Spectre de fragmentation de la masse à 441 Th à 2,67 minutes d'élution (voir Chromatogramme 5 p.372) qui cache l'ion moléculaire du Fmoc-DiOia-OH

IX.C. Résumé et proposition de généalogie des structures proposées

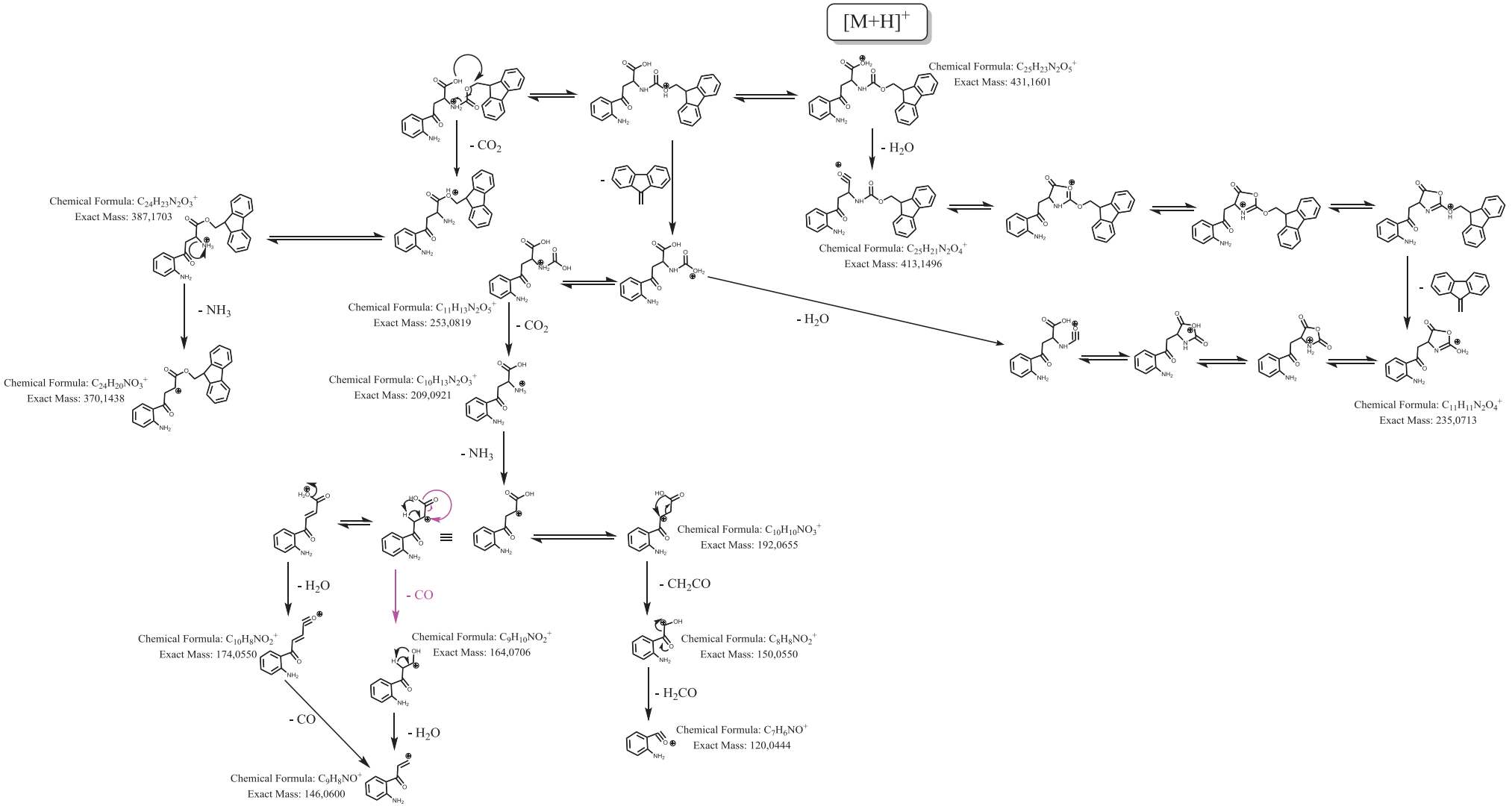


Figure 228 : Proposition de généalogie des fragments observés en MS^2 pour la molécule de rapport m/z = 431 Th pour l'adduit protoné $[M+H]^+$ de l'acide aminé modifié Fmoc-Kyn-OH

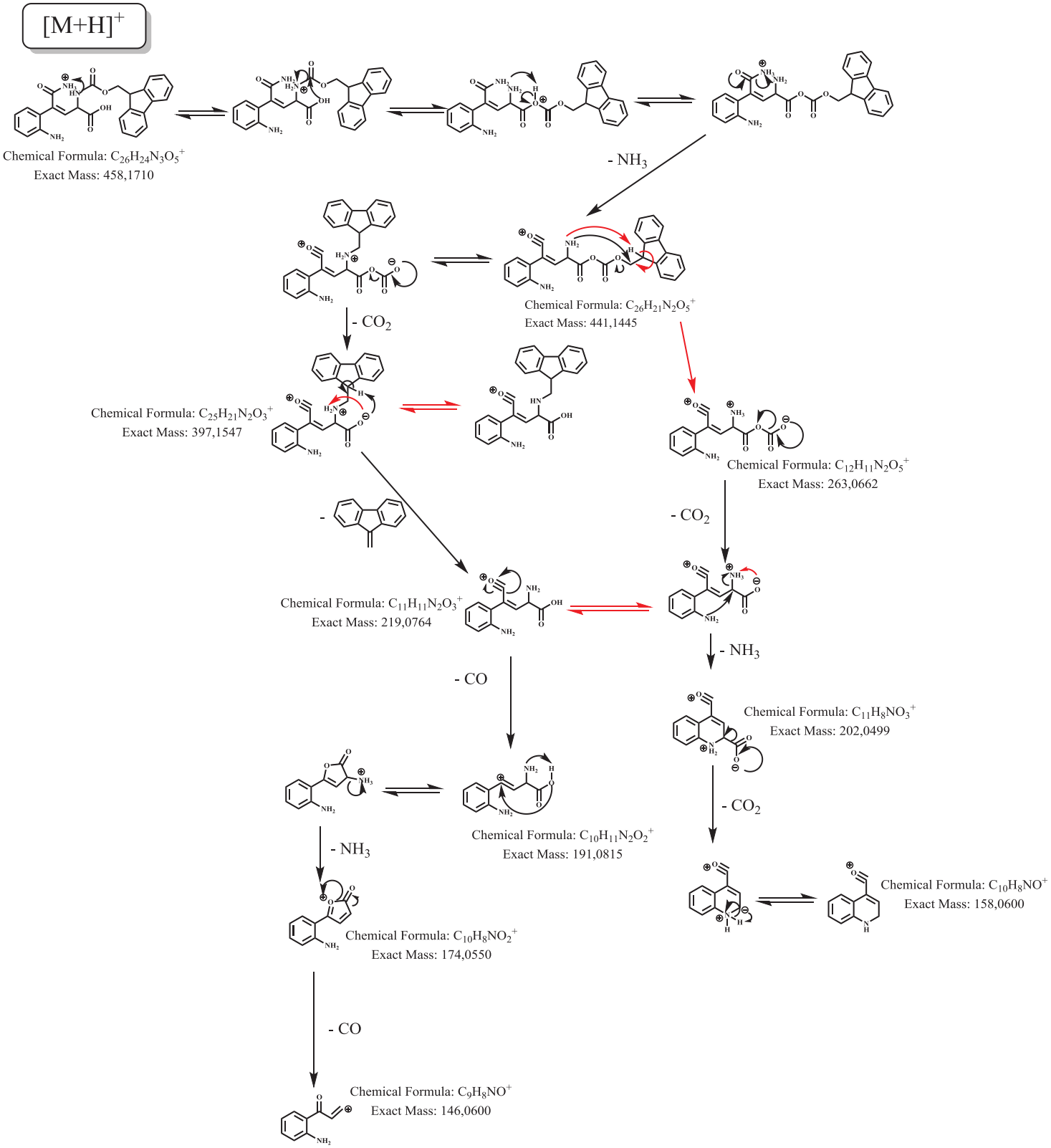


Figure 229 : Proposition de généalogie des fragments observés en MS^2 pour la molécule de rapport m/z = 458 Th pour l'adduit protoné $[M+H]^+$ de l'échantillon de Fmoc-Kyn-OH

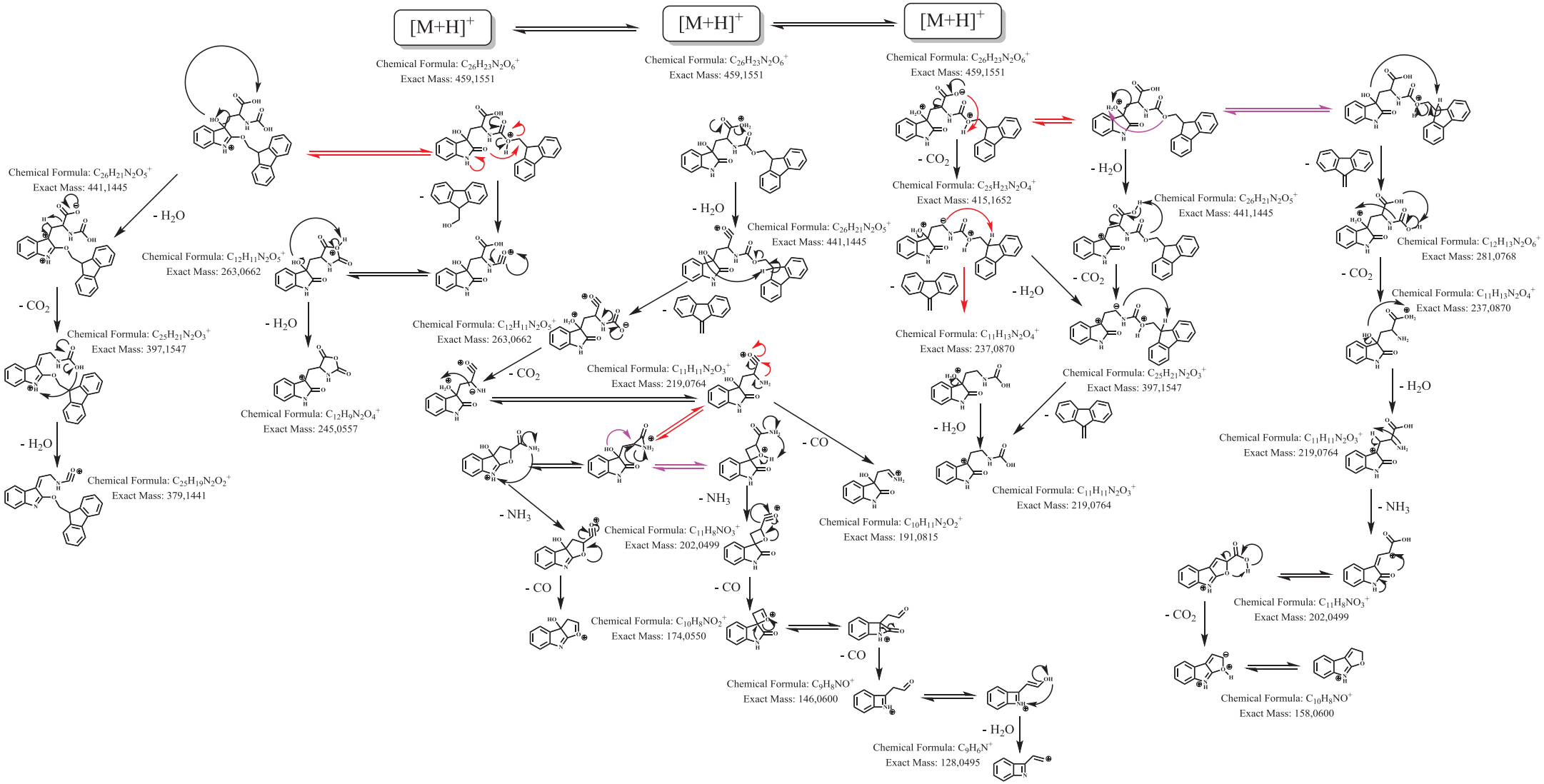


Figure 230 : Proposition de généalogie des fragments observés en MS^2 pour la molécule de rapport m/z = 459 Th pour l'adduit protoné $[M+H]^+$ de l'échantillon de Fmoc-Kyn-OH

Conclusion

Pour conclure sur les expériences menées dans le cadre du projet portant sur le système chimique CCKB/CCKB-R, l'ensemble des synthèses a mené à l'obtention, d'une part de peptides requis pour les expériences en pharmacologie, d'autre part à la synthèse incomplète d'acides aminés modifiés. Cependant ces derniers, du fait des difficultés de synthèse et de purification rencontrées, ont fait l'objet d'études poussées en spectrométrie de masse en tandem dans l'unique but de déterminer leur structure et apporter un éclairage supplémentaire sur les problématiques de synthèse organique, démontrant ainsi la parfaite osmose entre deux approches de la chimie trop souvent mises dos-à-dos. En outre, les expériences de pharmacologie ont permis de démontrer la perte d'affinité de l'ordre de deux ordres de grandeur engendrée par la substitution du résidu tryptophane par un résidu de type naphtylalanine dans la séquence peptidique initialement modifiée. Enfin, les constantes pharmacologiques caractéristiques d'une expérience de saturation à l'équilibre ont été calculées avec différentes méthodes de traitement des données sans différence significative. Ces méthodes permettent de calculer les constantes pharmacologiques avec d'un côté un gain de temps et de précision et de l'autre, un gain en fiabilité par une procédure standard d'étalonnage.

Le projet de quantification en MALDI-SID-MS par le biais d'un marquage covalent de peptide a été poursuivi par le développement de marqueurs à charge préformée, dont la problématique avait été abordée dans un cadre différent par le Dr. Laëtitia MOULS,[608] qui seront poursuivis en tant que perspective de développements futurs vis-à-vis de la quantification en Partie C – ***Conclusions et perspectives***.

[608] Laëtitia Mouls, « Spectrométrie de masse en tandem de peptides et de peptides modifiés : contribution à l'identification structurale par une approche "De Novo" », Thèse de doctorat en Chimie organique, minérale et industrielle, sous la direction de Jean-Louis Aubagnac, Montpellier, Université Montpellier 2, 2005.

Partie C – Conclusions et perspectives

I. Le MALDI-SID-MS, une nouvelle approche de quantification appliquée aux peptides

Ces travaux de thèse sont l'aboutissement direct d'un développement initié au sein de l'IBMM. Ils ont montré qu'il était possible de mettre à profit le MALDI-SID-MS pour quantifier des biomolécules et d'appliquer ces mesures à l'étude d'interactions moléculaires. L'ensemble des synthèses tant sur le plan des marqueurs que celui des peptides a mené à l'obtention des différentes séquences nécessaires à l'étude approfondie des récepteurs V_{1A} et CCKB-R et de l'affinité des différents ligands retenus. Cependant certaines synthèses ont rencontré quelques difficulté et ont alors été le sujet d'études avancées en spectrométrie de masse en tandem afin d'apporter une approche structurale sur ces problématiques de synthèse organique, démontrant ainsi la parfaite complémentarité entre ces deux approches de la chimie.

A l'issue de ces synthèses un important et conséquent travail d'optimisation de toute la chaîne expérimentale a permis, grâce à l'étude des conditions de dépôt, de matrice et d'analyse sans oublier l'étude du dépôt par imagerie, un tel développement analytique. Cela s'est conclu avec une étude statistique dans le but d'apporter un outil de validation et de comparaison des mesures, suivie par la mise au point d'un protocole d'étalonnage. La stratégie de marquage spécifiquement conçue pour le MALDI-MS s'est, en revanche, révélée inapplicable à l'ESI-MS. Finalement, les expériences de pharmacologie ont permis d'une part de mesurer avec précision les constantes pharmacologiques (K_d, B_{max}, IC_{50} et K_i) de différentes molécules, d'autre part de caractériser le récepteur avec différents composés d'affinité variable et ce, quelle que soit la méthode de traitement mathématique utilisée.

II. Le développement de marqueurs à charge préformée

Le projet de synthèse de nouveaux marqueurs portant à la fois un exhausteur d'ionisation et un exhausteur de fragmentation s'inscrit dans la continuité de ce projet de thèse, à savoir obtenir un marquage permettant une détection spécifique et très sensible des peptides. La molécule HCCA en tant que marqueur covalent a été la première molécule envisagée et d'autres marqueurs seront conçus avec pour objectif d'arriver à une sensibilité accrue en MALDI-MS. Et ceci tout en conservant la spécificité de l'ionisation conférée par l'utilisation de la combinaison HCCA/HCCE. La partie exhausteur d'ionisation aura pour objectif l'ionisation spécifique et sensible des molécules marquées en mode MS, tandis que la partie exhausteur de fragmentation aura pour objectif d'être coupée préférentiellement en mode MS/MS pour obtenir un fragment unique à quantifier. Il est également important de garder à l'esprit la neutralité du marqueur face aux récepteurs biologiques qui seront mis en jeu dans les expériences sur préparation membranaire.

Ces nouveaux ligands une fois synthétisés devront subir des phases de validation identiques, à savoir : le couplage à un peptide d'intérêt, la détermination des conditions optimales de détection

et de quantification, la détermination d'une LoD et d'une LoQ ainsi qu'une étape de validation statistique. Ceci avant de pouvoir être utilisé dans des diverses expériences (biologie, pharmacologie …). Une fois cela atteint, il sera alors possible sur le modèle du récepteur V_{1A}, d'une part d'évaluer l'impact des différents marqueurs sur l'affinité du peptide, d'autre part de comparer l'efficacité des différents marqueurs obtenus et déterminer le plus performant au regard des différents points de la méthodologie d'analyse..

II.A. Objectifs recherchés par le développement de nouveaux marqueurs et stratégie envisagée

La plate-forme analytique visée par le développement de nouveaux marqueurs peptidique est l'ionisation par ESI. L'objectif est de parvenir à abaisser le seuil de détection de peptides marqués chimiquement par de telles constructions moléculaires pour le rendre suffisamment bas afin d'être mis au service de la quantification à des niveaux de concentration infimes. Celles-ci ont été conçues en alliant un exhausteur d'ionisation (le marqueur en lui-même) pour la détection en MS à un exhausteur de fragmentation qui présente une liaison labile avec le peptide pour entraîner une fragmentation souhaitée exclusive à son emplacement pour la détection en MS/MS. Le but recherché est d'éviter une dilution du signal en MS/MS pour la détection et, *in fine*, la quantification.

La stratégie utilisée est en quelque sorte, une transposition d'un développement analytique dans lequel chaque paramètre varie tout étant égal par ailleurs. En l'occurrence il s'agit (voir Figure 231 ci-dessous) de synthétiser des marqueurs avec un ion préformé (partie exhausteur d'ionisation) en faisant varier le lien (partie exhausteur de fragmentation) qui relie ce dernier au peptide sur lequel le marqueur est greffé de façon covalente. Les voies de synthèse envisagées ainsi que les différents fragments des marqueurs seront pour cette raison très diverses.

Ces marqueurs ont été conçus pour l'ESI, technique d'ionisation pour laquelle des ions dichargés et trichargés sont très souvent observés. La conception de ces molécules est donc orientée vers une amélioration de la sensibilité en détection des peptides marqués par celles-ci et vers une facilité de fragmentation grâce à lien labile dont l'objectif est une coupure qui se veut énergétiquement la plus favorable possible pour obtenir un très fort signal provenant du marqueur préchargé.

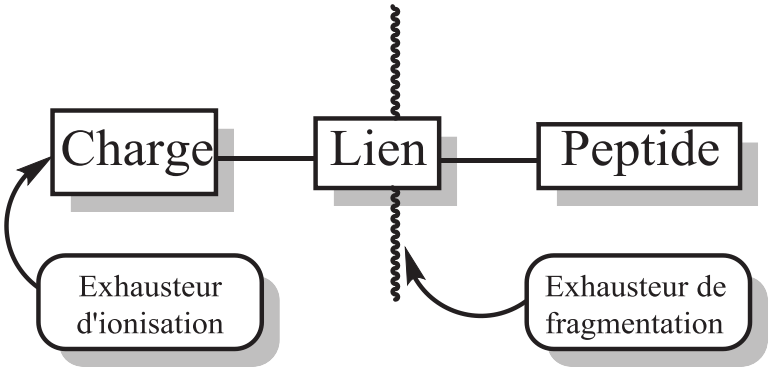
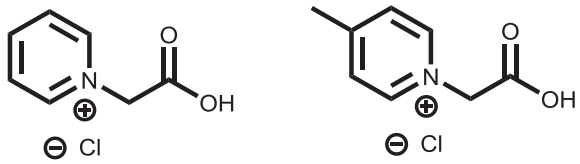


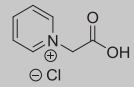
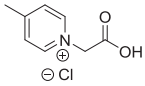
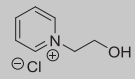
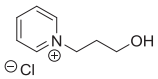
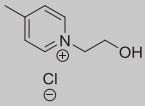
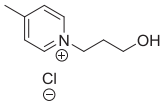
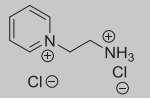
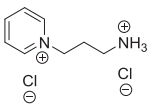
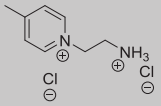
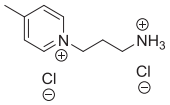
Figure 231 : Illustration de la stratégie de synthèse de nouveaux marqueurs pour ESI et MALDI composé d'une charge préformée dans la partie « sonde » du marqueur et un lien labile entre cette sonde et le peptide dont le rôle est de favoriser sa propre coupure

II.B. Les marqueurs à charge préformée : premières synthèses des molécules avec lien amide, les pyridiniums acides

Plusieurs molécules ont déjà été synthétisées pour ce projet parmi lesquelles les deux marqueurs présentés ci-dessous (MR 14 et MR 15) qui ont pu être testées par la suite. L'objectif initial était de tenter d'obtenir un fragment de type tropylium. Les premières analyses présentées au paragraphe II.C p.386 montrent que ce ne sera pas le cas, mais que des conclusions utiles pour les développements futurs peuvent en être extraites. L'ensemble des molécules obtenues ainsi que les liens labiles envisagés sont présentés dans le Tableau 84 p.386.



MR 14 à gauche, premier marqueur à charge préformée obtenu et MR 15 à droite, seconde génération de marqueur

Position dans le marqueur	Liens labiles envisagés	Nom IUPAC	Structure	Rendement	Pureté RMN
Peptide – Lien – Charge	Amide	Chlorure de 1-(carboxyméthyl)pyridin-1-ium		46 %	> 95 %
		Chlorure de 1-(carboxyméthyl)-4-méthylpyridin-1-ium		78 %	91 %
Peptide – Lien – Charge	Succinyl ; Sulfonyl ; carbonate ; uréthane ; Phosphoester	Chlorure de 1-(2-hydroxyéthyl)pyridin-1-ium		67 %	> 95 %
		Chlorure de 1-(3-hydroxypropyl)pyridin-1-ium		95 %	> 95 %
		Chlorure de 1-(2-hydroxyéthyl)-4-méthylpyridin-1-ium		37 %[609]	> 95 %
		Chlorure de 1-(2-hydroxypropyl)-4-méthylpyridin-1-ium		73 %	> 95 %
	Succinyl ; Sulfonyl ; urée ; Phosphoester	Chlorure de 1-(2-ammonioéthyl)pyridin-1-ium		72 %	90 %
		Chlorure de 1-(2-ammoniopropyl)pyridin-1-ium		86 %	> 95 %
		Chlorure de 1-(2-ammonioéthyl)-4-méthylpyridin-1-ium		79 %	87 %
		Chlorure de 1-(2-ammoniopropyl)-4-méthylpyridin-1-ium		90 %	> 95 %

[609] Pertes lors de la manipulation de l'échantillon

Tableau 84 : Résumé des premières molécules synthétisées dans le cadre de futurs développements de marqueurs à charge préformée

II.C. Les pyridiniums dérivés de matrices MALDI, une évolution de l'HCCA en tant que marqueur peptidique ?

Ces marqueurs ont été conçus pour présenter une partie exhausteur d'ionisation avec une charge préformée et une partie exhausteur de fragmentation similaire à ce qui a été présenté au paragraphe II.B p.384. L'avantage de ces marqueurs (voir Figure 232 ci-dessous) est leur inspiration directe des matrices MALDI (acide nicotinique et 3-hydroxypicolinique) et de la liaison covalente entre la matrice HCCA et une séquence peptidique. Cela permettrait au peptide d'absorber l'énergie laser incidente pour s'élever à différents niveaux d'excitation (S_1, S_n…). D'après le modèle CPCMD du Dr. Knochenmuss, la fusion et le saut énergétique permettront d'exciter les peptides directement qui, par relaxation pour certains, engendreront une élévation de la température de l'échantillon désorbé/ablaté qui peut intervenir pour faciliter la sublimation des peptides. Ce réchauffement engendrerait une augmentation des collisions efficaces entre le peptide et le milieu dense en protons, nécessaires à l'ajout d'une seconde charge dans ce dernier qui pourrait, par répulsion coulombienne, favoriser la fragmentation. Cette augmentation de l'agitation moléculaire pourrait également se mettre au service d'un transfert d'énergie efficace lors des collisions intermoléculaires pour faciliter la fragmentation au niveau du lien labile.

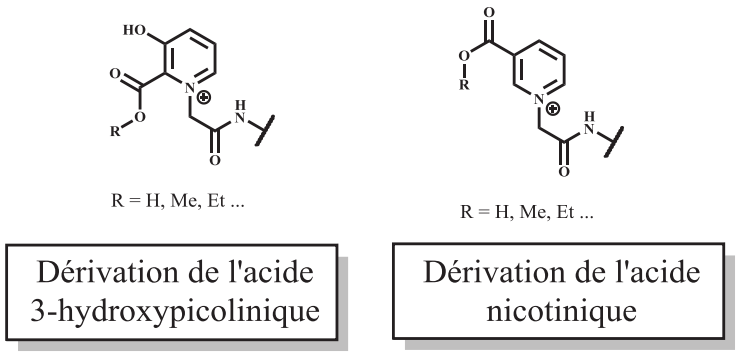


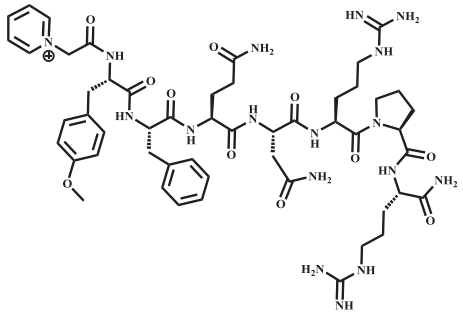
Figure 232 : Conception de nouveaux marqueurs à charge préformée basée sur des matrices MALDI

Une donnée importante pour les candidats marqueurs est l'absorbance UV. En effet, le recours au marquage covalent de peptides par l'HCCA sous-entend que « l'antenne » UV qui va absorber le rayonnement du laser (e.g : Nd:YAG à 355nm) doit avoir un maximum d'absorption autour de la longueur d'onde du LASER, en l'occurrence 355 nm sous réserve que la présence d'une charge n'affecte pas ou très peu l'absorbance de la molécule. En tenant compte du modèle CPCMD de Knochenmuss avec la fusion énergétique, le saut énergétique et l'effet tunnel, l'objectif, pour le MALDI, est d'obtenir un maximum de chocs efficaces entre les ions peptidiques préformés et les molécules de matrice excitées pour obtenir une fragmentation. En tenant compte du modèle des clusters de Karas, le fait d'avoir une première charge préformée et d'en obtenir une seconde grâce à

un excès de charge global dans le dépôt permettrait d'obtenir une fragmentation probablement davantage facilitée grâce à cette répulsion coulombienne qui opérerait entre les deux charges.

III. Le premier peptide synthétisé et les tests préliminaires de fragmentation

Le premier peptide portant un marqueur à charge préformée a été bâti sur le modèle de la séquence commune aux molécules MR 5 et MR 6-D_0 (voir MR 16 ci-dessous).



MR 16 : Peptide construit sur la séquence modèle de MR 6-D_0 en substituant l'HCCA par le marqueur à charge préformée MR 14 p.384

Les analyses préliminaires en LC-MS ont montré l'obtention d'ions dichargés et trichargés. Par la suite le comportement espéré, à savoir la formation d'un ion de type tropylium à partir de la structure de type pyridinium, n'a pas été observé. En revanche, un ion correspondant à un fragment cétène (voir Figure 233 ci-dessous) a été visualisé. Celui-ci pourrait interférer avec la masse de l'immonium de la phénylalanine à 120,0813 Th également présente dans la séquence ; problématique qui a été écartée grâce à la spectrométrie de masse à haute résolution. Or le recours à la HRMS n'est pas viable vis-à-vis d'un développement méthodologique. C'est la raison pour laquelle le développement a été poursuivi en cherchant à incrémenter la masse de ce fragment par l'utilisation, en synthèse, d'une pyridine substituée. Les possibilités devient ainsi très diverses selon les substitutions envisageables.

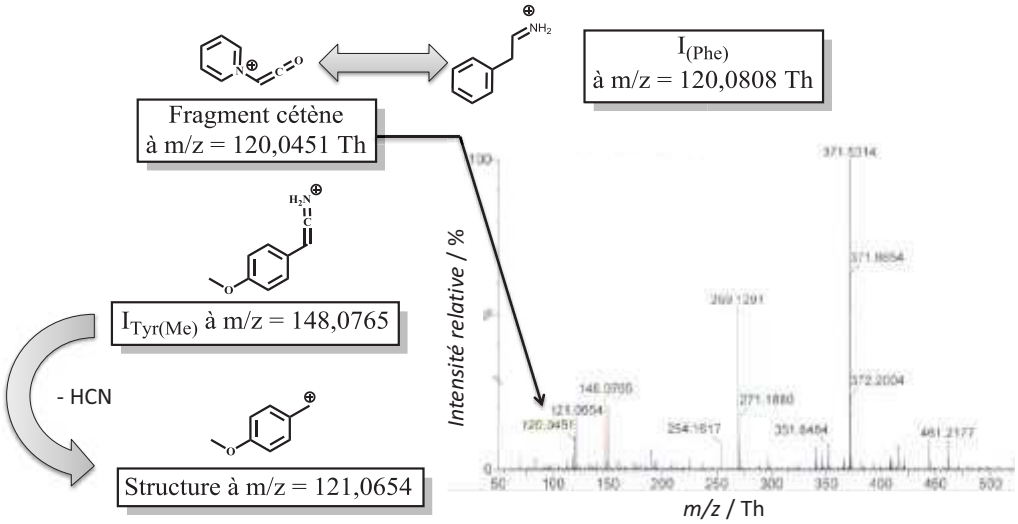


Figure 233 : Spectre de fragmentation du peptide modèle MR 7 portant le marqueur MR 14 en position N-terminale et proposition de structures pour les fragments aux basses masses à partir des formules brutes déterminées par spectrométrie de masse à haute résolution

En conclusion, les marqueurs à charge préformée sont prometteurs grâce à leur capacité à améliorer l'ionisation des peptides marqués à des niveaux compatibles pour des études appliquées (biologie, pharmacologie …). De plus, le lien labile qui relie la charge au peptide a montré une voie de fragmentation prometteuse pour des applications ultérieures en quantification. Une problématique à laquelle il faudra porter une attention particulière est le risque de détecter plusieurs voies de fragmentation qui risquent d'entraîner une dilution du signal. Ainsi, les futurs développements auront pour objectif de concevoir des marqueurs suivant une unique voie de fragmentation, capables d'être couplés quelle que soit la séquence peptidique ciblée pour être suivie par MALDI-MS/MS et ESI-MS/MS. L'étape suivante sera le développement méthodologique autour de la quantification et de l'étalonnage.

Partie D – Partie expérimentale

I. Appareillages et méthodes analytiques

I.A. Systèmes de synthèse peptidique

I.A.1. Robot de synthèse liberty

La synthèse peptidique sur support solide en stratégie Fmoc/^{t}Bu a été réalisée par activation micro-ondes grâce à un automate de synthèse Liberty™ (CEM Corporation, Matthews, NC) couplé à un module Discover™ (CEM Corporation, Matthews, NC). L'ensemble du système est piloté par le logiciel PepDriver™.

Pour effectuer une synthèse peptidique, il faut au préalable fixer des tubes Falcon contenant la(les) résine(s) dans les positions 1 à 8. Les bouteilles contenant les Fmoc-AA-OH sont disposées sur les positions correspondantes et remplies avec un volume de solution préalablement calculé par le logiciel en fonction de la quantité de résine introduite. Les solutions d'agents activant (HBTU), de base (DIEA) sans oublier les solvants (DCM et DMF) sont également préparées en fonction de la quantité de résine introduite et du nombre de couplages prévus.

Paramétrage de la(les) séquence(s) prévues dans le logiciel et des paramètres de synthèse :

- 5 min, 70 °C pour tous les acides aminés classiques.
- 5 min, 50 °C pour les acides aminés H et C pour éviter la racémisation.
- 10 min, 70 °C pour Q, N, P, V et T car ces acides aminés posent généralement problème lors des réactions de couplage à cause de leur groupement protecteur encombrant (trityle) ou de leur amine secondaire ou encore de leur C_{α} encombré.
- Déprotection : 3 min, 70 °C.

Les peptides sont retirés de l'appareil toujours ancrés sur les billes de résine avec leur amine terminale déprotégée tout en conservant les protections des chaînes latérales. L'étape finale à effectuer manuellement est le clivage de la résine et la déprotection des chaînes latérales en une étape.

Déprotection terminale et clivage :

- **Etape 1** : filtrer et laver au DCM les résines récoltées à partir du CEM Liberty™.
- **Etape 2** : cliver la résine et les protections des chaînes latérales avec un mélange TFA/TIS/H2O (95/2,5/2,5) pendant 2-3 h (10 mL de solution pour 10 mg de résine sèche récoltée).
- **Etape 3** : concentrer le TFA puis précipiter les peptides dans l'éther diéthylique avant de les centrifuger puis d'éliminer l'éther surnageant.

- **Etape 4** : analyser un échantillon du peptide pour avoir une idée de la réussite de la synthèse. Débuter l'étape de purification par chromatographie préparative à l'issue des résultats du contrôle par LC-UV-MS.

Illustration 1 : Photographie légendée du synthétiseur de peptides CEM Liberty

I.A.2. Plate-forme fast SPPS

- Type : Agitateur pour micro-plaque VWR.
- Vitesse : 100 – 900 rpm.
- Capacité maximum : ≈ 2,3 Kg.
- Minuterie : 1 s – 9 999 minutes.
- Référence : 444-0270.

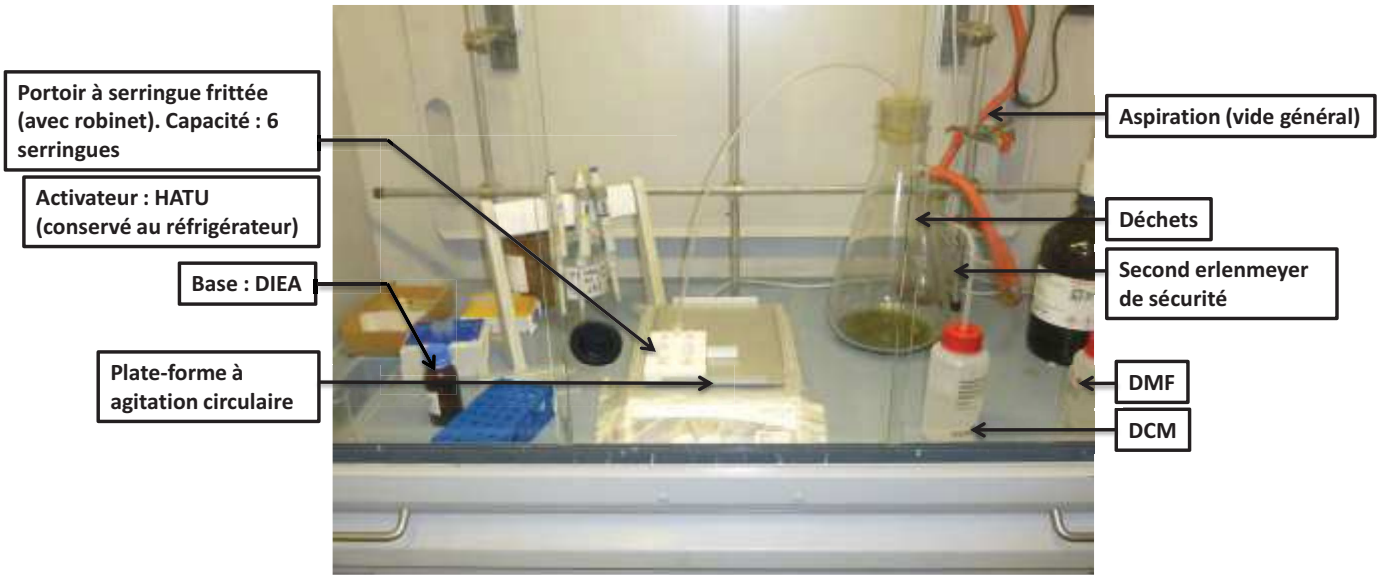


Illustration 2 : Photographie légendée de la plate-forme de synthèse en fast SPPS

I.B. Systèmes de chromatographie analytique

I.B.1. HPLC analytique Agilent

Les composés obtenus ont été analysés sur un système chromatographique Agilent technologies 1220 Infinity LC (G4290C ; Serial No : DECAF00528). L'instrument est composé d'un système de pompes binaire, d'un système de gestion des échantillons, d'un système d'injection avec boucle de 20 µL et d'un détecteur UV.

- Paramétrage de l'HPLC analytique :

  Phase mobile :

  - Eluant A : eau/0,1 % TFA ; Eluant B : acétonitrile/0,1 % TFA.
  - Gradient : linéaire de 0 à 100 % d'acétonitrile effectué en 3 minutes.
  - Débit : 3 mL/min.

  Phase stationnaire :

  - Colonne : Phenomenex Onyx monolithic HD-C18.
  - Références colonne : CH0-8612 ; Serial No : 017290-31.
  - Dimensions : 50×4,6 mm.
  - Surface spécifique : 300 m^2/g.
  - Taille des pores : 130 Å.

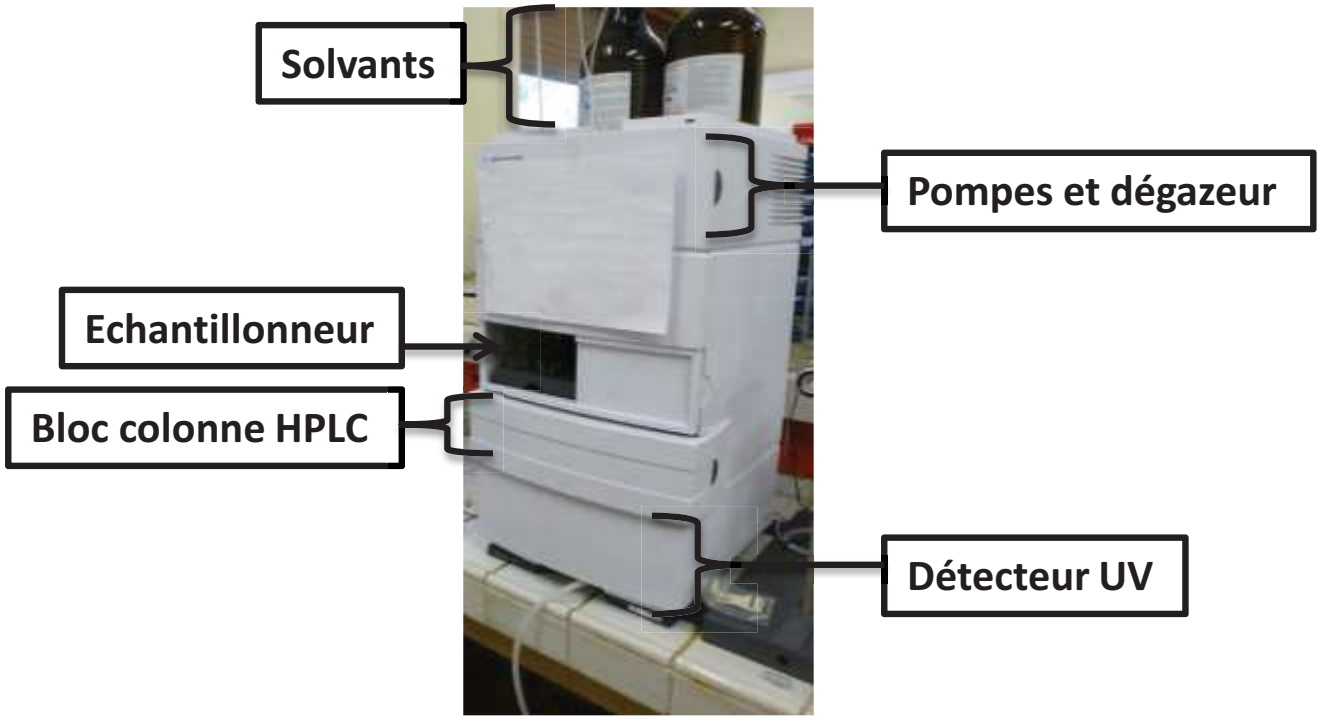


Illustration 3 : Photographie légendée de l'HPLC analytique Agilent

I.B.2. ESI-Q (ZQ 2000 Waters)

Un contrôle des molécules synthétisées a été effectué par le spectromètre de masse ZQ 2000 (Waters). Il est composé d'une source ESI de géométrie Z-spray MKII et d'un simple quadripôle qui

permet la détection de masses sur la gamme 50 – 2 000 u.m.a. Ce dernier est couplé au système de chromatographie Waters (HPLC Waters alliance 2695), à un module de séparation (JO75M7262A) et à un détecteur UV (Waters 2489). L'acquisition des analyses ainsi que le traitement des données sont réalisées par le logiciel MassLynx, version 4.1.

- Paramétrage de l'HPLC analytique :

  Phase mobile :

  - Eluant A : eau/0,1 % HCO_2H ; Eluant B : acétonitrile/0,1 % HCO_2H.
  - Gradient : linéaire de 0 à 100 % d'acétonitrile effectué en 3 minutes.
  - Débit : 3 mL/min.

  Phase stationnaire :

  - Colonne : Phenomenex Onyx C18.
  - Dimensions : 50×4,6 mm.
  - Surface spécifique : 300 m^2/g.
  - Taille des pores : 130 Å.

- Paramétrage du spectromètre de masse :

Source	Electrospray	Détecteur	Photomultiplicateur
Analyseur	Quadripôle	Calibration	NaI
Mode d'acquisition	Positif	Tension de capillaire	3 kV
Mode de balayage	MS scan	Tension de cône	20 V
Gamme de masse	100 – 1 000	Température de source	120 °C
Débit du gaz nébulisateur (N_2)	50 L/h	Température de désolvatation	450 °C
Débit du gaz desséchant (N_2)	450 L/h		

Illustration 4 : Photographie légendée de l'analyseur à triple quadripôle pour l'analyse LC-MS de routine

I.B.3. Synapt G2-S (Waters)

Un contrôle des peptides a été effectué par HRMS sur le Synapt G2-S (Waters). Cet appareil est équipé d'une source ESI Z-spray. Il est couplé sur un système UPLC Acquity H-class. L'acquisition des analyses ainsi que le traitement des données sont réalisées par le logiciel MassLynx, version 4.1.

- Paramétrage de l'HPLC analytique :

  Phase mobile :

  - Eluant A : eau/0,1 % HCO_2H ; Eluant B : acétonitrile/0,1 % HCO_2H.
  - Gradient : linéaire de 0 à 100 % d'acétonitrile effectué en 12 minutes.
  - Débit : 0,5 mL/min.

  Phase stationnaire :

  - Colonne : Kinetex C18.
  - Dimensions : 100×2,1 mm.
  - Dimensions des particules : 2,6 µm.
  - Taille des pores : 100 Å.

- Paramétrage du spectromètre de masse :

Source	Electrospray	Détecteur	Ultrafast electron multiplier / Hybrid ADC[610] detector electronics
Analyseur	Quadripôle	Tension de capillaire	3 kV
Mode d'acquisition	Positif	Tension de cône	30 V
Mode de balayage	MS scan	Température de source	140 °C
Gamme de masse	100 – 1 500	Température de désolvatation	450 °C
Débit du gaz nébulisateur (N_2)	1 000 L/h		
Débit du gaz desséchant (N_2)	0 L/h		

[610] ADC : analog-to-digital conversion

Illustration 5 : Photographie légendée du Synapt G2-S

I.C. Systèmes de chromatographie préparative

Plusieurs systèmes de purification par chromatographie préparative ont été utilisés et sont décrit ci-après.

I.C.1. HPLC préparative Waters (HPLC 4000) :

Les peptides sont solubilisés dans un mélange eau/acétonitrile (50/50 v/v) contenant 0,1 % de TFA et purifié sur l'instrument Waters HPLC 4000 comprenant un contrôleur chromatographique (Prep LC Controller), un détecteur UV (Waters 486 tunable absorbance detector) fonctionnant entre 200 et 400 nm et un système de pompes binaire. La récolte des fractions est effectuée par rapport à l'absorbance UV mesurée à 340 nm (maximum d'absorption pour les composés comportant un motif HCCA).

Les fractions sont contrôlées par HPLC-UV (système Beckmann). Ce système HPLC est muni d'un module de pompes 126 (Serial No : 26-1251), d'un module de détection à barrette de diode 168 (Serial No : 29.2012) et d'une boucle Rhéodyne de 20 µL pour l'injection, le tout piloté par le logiciel 32 Karats.

- Paramétrage de l'HPLC préparative :

  Phase mobile :

  - Eluant A : eau/0,1 % TFA ; Eluant B : acétonitrile/0,1 % TFA.
  - Gradient : variable selon le composé à purifier.
  - Débit : 50 mL/min.

  Phase stationnaire :

  - Colonne : DeltaPack® C18, phase inverse.
  - Références colonne : PrepPack® cartridge ; WAT037688 ; 7240111031TT01.
  - Dimensions : 100×40 mm.
  - Dimensions des particules sphériques : 15 µm.

- Taille des pores : 100 Å.

- Paramétrage de l'HPLC (Beckmann) :

  Phase mobile :

  - Eluant A : eau/0,1 % TFA ; Eluant B : acétonitrile/0,1 % TFA.
  - Gradient : 3min.
  - Débit : 5 mL/min.

  Phase stationnaire :

  - Colonne : Phenomenex onyx monolith HD-C18.
  - Références colonne : CHO-86122 ; Serial No : 014290-02.
  - Dimensions : 50×4,6 mm.
  - Taille des pores : 130 Å.

Illustration 6 : Photographie légendée de l'HPLC préparative manuelle

I.C.2. HPLC préparative automatique – ESI-Q (Waters micromass) :

Les peptides sont solubilisés dans un mélange eau/acétonitrile (50/50 v/v) contenant 0,1 % de TFA et purifiés sur l'instrument Waters ZQ 2000 LA A023L comprenant un système de pompes primaire de solvants Waters 2525 (JO2APP196M), un système de pompes programmable Waters 515 (E04515787M), un système de contrôle des pompes PCMII (P04PCII098M), un système de gestion d'échantillons 2767 (JO03XY6366M), un organiseur de colonne et de fluide (CFO ; K02APC102M) et un détecteur UV Waters 2996 (F04296248M). Les fractions sont contrôlées par un spectromètre de masse Waters ZQ 2000 (LA A023L). Le contrôle des peptides est effectué sur les ions monochargés et dichargés avec un seuil d'intensité minimale noté MIT (Minimal Intensity Threshold) réglé à $1{,}1.10^{5}$.

L'acquisition des analyses ainsi que le traitement des données sont réalisées par le logiciel MassLynx, version 4.1

- Paramétrage de l'HPLC préparative :

  Phase mobile :

  - Eluant A : eau/0,05 % TFA ; Eluant B : acétonitrile/0,05 % TFA.
  - Gradient : variable selon le composé à purifier.
  - Débit : 20 mL/min.

  Phase stationnaire :

  - Colonne : Phenomenex Luna 5µ C18(2).
  - Références colonne : Product No : 00D-4252-P0-AX ; Serial No : 608070-4.
  - Dimensions : 100×21,20 mm
  - Dimensions des particules sphériques : 5 µm.
  - Tailles des pores : 100 Å.

- Paramétrage du spectromètre de masse :

Source	Electrospray	Détecteur	Photomultiplicateur
Analyseur	Quadripôle	Calibration	NaI
Mode d'acquisition	Positif	Tension de capillaire	3 kV
Mode de balayage	MS scan	Tension de cône	20 V
Gamme de masse	100 – 1 000	Température de source	120 °C
Débit du gaz nébulisateur (N_2)	50 L/h	Température de désolvatation	450 °C
Débit du gaz desséchant (N_2)	450 L/h		

Illustration 7 : Photographie légendée de l'HPLC préparative automatique Waters

I.C.3. HPLC préparative (Gilson PLC 2020) :

Les peptides sont solubilisés dans un mélange eau/acétonitrile (50/50 v/v) contenant 0,1 % de TFA et purifiés sur l'instrument Gilson PLC 2020 comprenant un détecteur UV utilisé à 214 et 254 nm, un système de colonnes interchangeables, une boucle d'injection de 5 mL, un système de collecte automatique de fractions et un système de pompes binaire. La collecte automatique des fractions est effectuée par rapport à l'absorbance UV et calibrée en fonction du volume des tubes utilisés.

- Paramétrage de l'HPLC préparative :

  Phase mobile :

  - Eluant A : eau/0,1 % TFA ; Eluant B : acétonitrile/0,1 % TFA.
  - Gradient : variable selon le composé à purifier.
  - Débit : 25 mL/min (phase stationnaire 1) ou 50 mL/min (phase stationnaire 2).

  Phase stationnaire 1 :

  - Colonne : Phenomenex Luna C18(2).
  - Références colonne : 00C-4252-P0-AX ; Serial No : 633090-1 ; B/No : 5291-107.
  - Dimensions : 75×21,2 mm.
  - Dimensions des particules sphériques : 5 µm.
  - Tailles des pores : 100 Å.

- Phase stationnaire 2 :

  - Colonne : Phenomenex Luna C18(2).
  - Références colonne : 00D-4253-U0-AX ; Serial No : 647203-2.
  - Dimensions : 100×30 mm.
  - Dimensions des particules sphériques : 10 µm.
  - Tailles des pores : 100 Å.

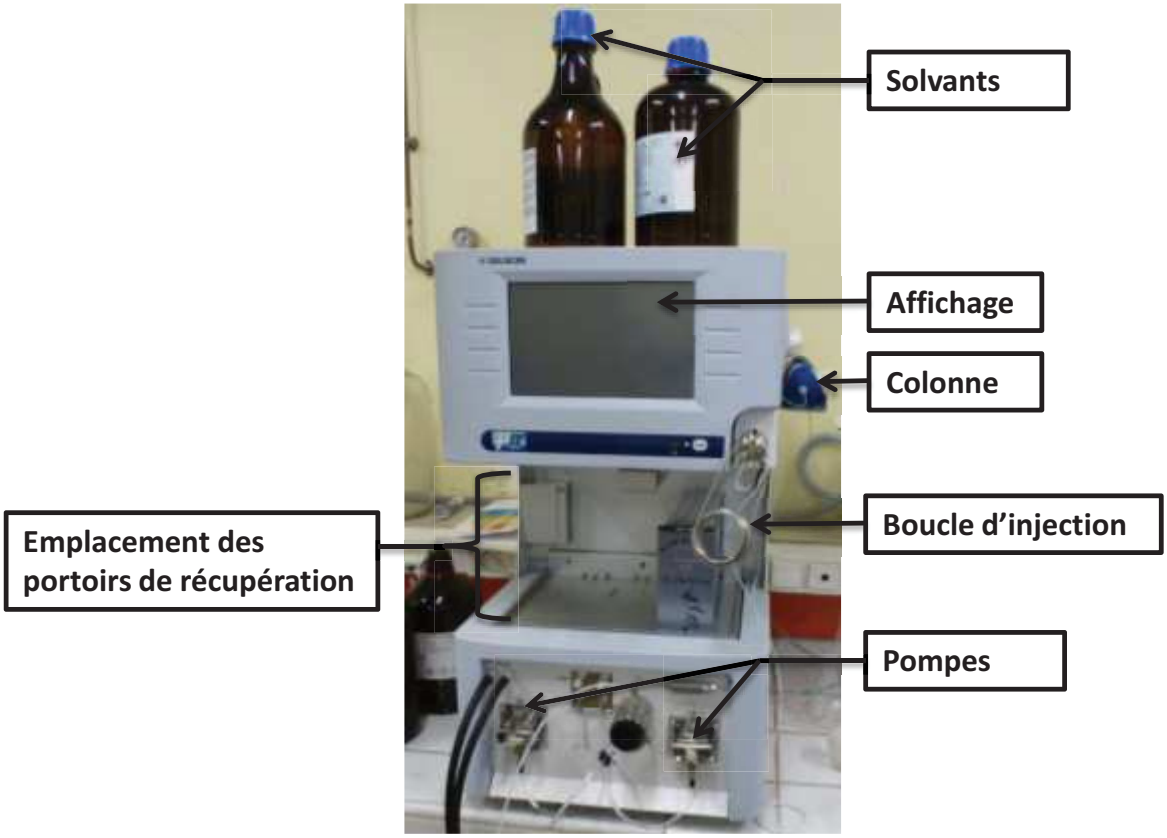


Illustration 8 : Photographie légendée de l'HPLC préparative automatique Gilson

I.D. Systèmes RMN

- Spectromètre RMN Bruker Avance 300 MHz :

Cet appareil a été utilisé pour effectuer les analyses par RMN sur les molécules synthétisées. Il est équipé d'une sonde QNP pour la détection ^{1}H /^{13}C /^{19}F /^{31}P. Il peut effectuer les expériences suivantes :

- 1D : ^{1}H - ^{13}C CPD / DEPT135 - ^{19}F couplé/découplé ^{1}H - ^{31}P couplé/découplé ^{1}H ;
- 2D : COSY – HMQC.

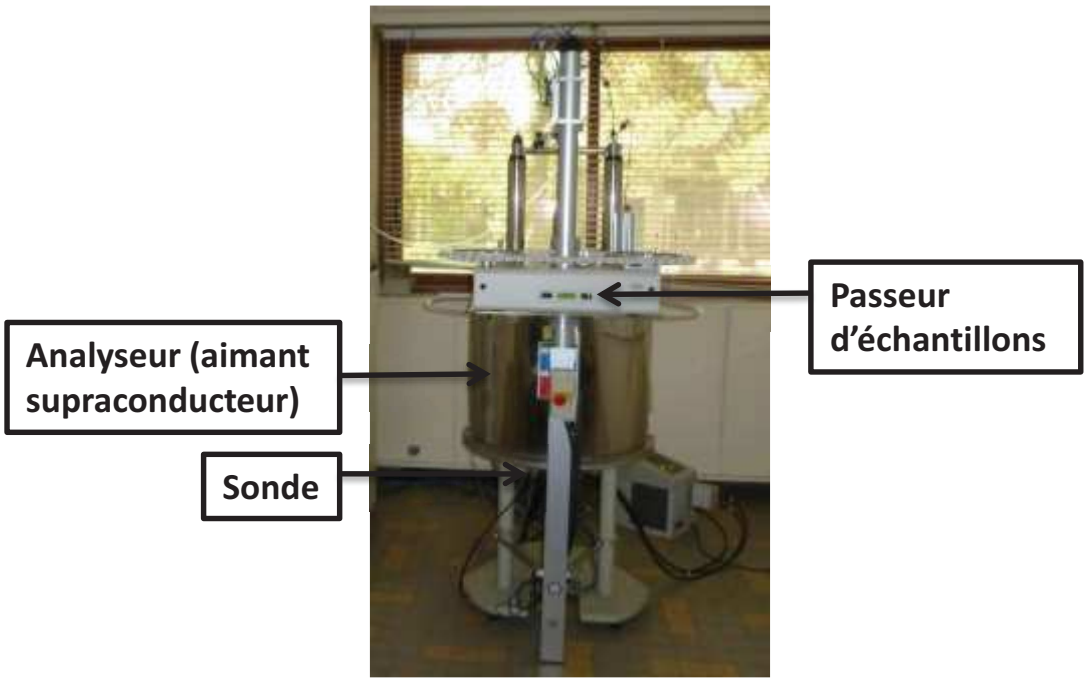


Illustration 9 : Photographie légendée de l'analyseur RMN 300 MHz

I.E. Spectrométrie de masse

I.F. Plaque AnchorChip 400-384

I.G. Visuels de dépôts MALDI

Lors des premières expériences de quantification, un tampon d'incubation pour le papier filtre en fibre de verre (Whatmann) contenant de la polyéthylèneimine a été utilisé de façon similaire au protocole utilisé en radioactivité. Malgré le fait que le produit soit présent à l'état de traces après plusieurs lavages cela nuit à la physicochimie du dépôt et donc à l'analyse de celui-ci. Cette déconvenue se traduit par des dépôts anormalement larges et non concentrés dans les puits au centre de chaque point de dépôt (voir Figure 234 ci-dessous, cliché en haut à gauche) par opposition à un dépôt correct. Ceci est dû à l'influence du polymère qui jouerait alors le rôle d'un tensioactif.

L'analyse en MALDI mode positif est alors impossible du fait de l'ionisation préférentielle et unique du polymère aminé contrairement à un dépôt n'étant pas issu d'une solution contenant des traces de polytéthylèneimine.

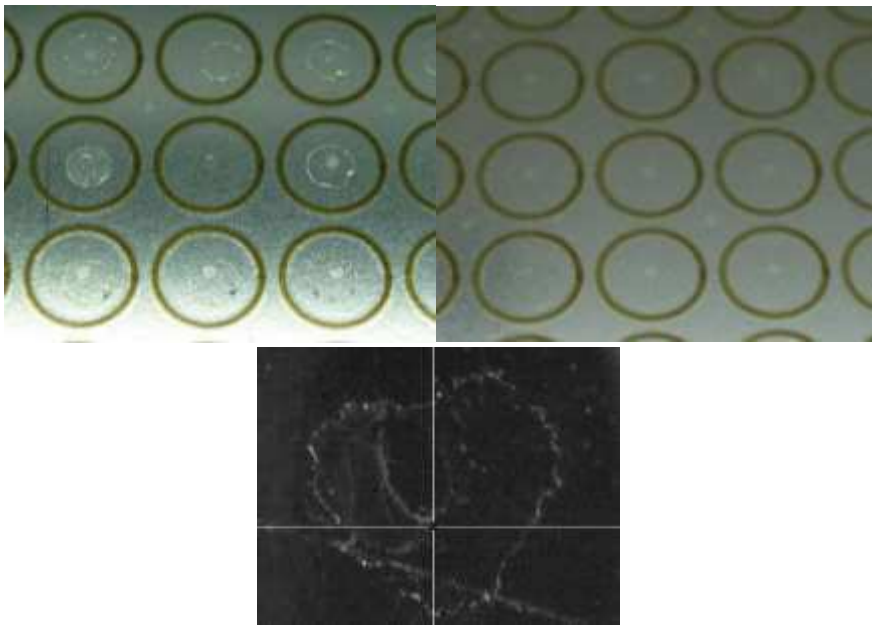


Figure 234 : Dépôts avec traces de polyéthylèneimine (à gauche), sans polyéthylèneimine (à droite) et en condition d'étalonnage (en bas)

I.G.1. MALDI-LIFT-TOF-TOF

Les analyses effectuées en MS et MS/MS ont été intégralement réalisées sur le spectromètre de masse MALDI-LIFT-ToF/ToF (Ultraflex III, Bruker Daltonics©). Il est équipé d'un laser pulsé Nd :YAG (λ = 355 nm) et de la technologie LIFT permettant les analyses en mode MS/MS.

- Paramètres de la méthode utilisée en mode MS :

Polarité	Positive	Fréquence laser	66,7 Hz
Délai d'extraction	30 ns	Nombre de coups/spectre	100 – 1 000
Source	IS1 (25,01 KeV) ; IS2 (21,98 KeV)	Gamme d'analyse	320 - 4 000 Th
Lentille	9,59 KeV	Puissance laser	Variable
Réflectron	RV1 (26,31 KeV) ; RV2 (13,81 KeV)	Focus laser	29 %
Déflection	Variable		

- Paramètres de la méthode utilisée en mode MS/MS :

Source	IS1 (8 KeV) ; IS2 (7,25 KeV)	Puissance laser 1 → Puissance laser 2	Variable
Lentille	3,2 KeV	Nombre de coups/spectre	500 – 1 000
Réflectron	RV1 (29,5 KeV	Gamme d'analyse	320 – 4 000 Th
Cellule LIFT	LIFT 1 (19 KeV) ; LIFT 2 (3,7 KeV)		

I.G.2. QqQ Thermo Scientific

Le suivi des transitions MRM a été effectué sur l'appareillage TSQ Quantum Ultra (Thermo Scientific). Il est équipé d'une source H-ESI (pour « heated ElectroSpray Ionisation ») et d'un triple quadripôle permettant de détecter sur la gamme 10 – 1 500 u.m.a et de réaliser des MS/MS. L'acquisition des spectres de masse et le traitement des données obtenues sont effectués sur le logiciel Xcalibur version 2.0.7 en mode d'ionisation positive. Un système UPLC Acquity (Waters) est couplé en amont du spectromètre de masse équipé d'une colonne Acquity BEH C18.

- Paramétrage de l'HPLC :

  <u>Phase mobile :</u>

  - Eluant A : eau/0,1 % HCO_2H ; Eluant B : acétonitrile/0,1 % HCO_2H.
  - Gradient : 0 à 100 % d'acétonitrile effectué en 3 minutes.
  - Débit : 0,5 mL/min.

  <u>Phase stationnaire :</u>

  - Colonne : Acquity BEH C18.
  - Dimensions : 50×2,1 mm
  - Dimensions des particules sphériques : 1,8 µm.
  - Température de colonne : 25 °C.
  - Tailles des pores : 130 Å.

Cet appareil a été utilisé en mode d'infusion directe. Le principe : injecter en HPLC le produit d'intérêt puis obtenir son temps de rétention afin de déterminer le pourcentage d'acétonitrile de sortie du produit.

Ensuite une infusion en combiné est effectuée :

- Débit HPLC en isocratique avec le pourcentage d'acétonitrile déterminé.
- Injection du produit via un « T » dans le spectromètre avec une seringue poussoir. Cela permet de simuler l'arrivée continue du produit dans le spectromètre en sortie d'une HPLC

afin d'optimiser les paramètres pour le suivi ultérieur des transitions avec élution chromatographique.

Des analyses ont ensuite été effectuées sur le composé MR 6-D_0 avec les informations suivantes :

- Paramètres optimisés sur l'ion parent dichargé (à 56 % d'acétonitrile) : $[M+2H]^{2+}$ = 583 Th.
- Paramètres optimisés pour le suivi des transitions 583 Th → 524 Th et 583 Th→ 321 Th.
    - <u>Paramètres optimisés du spectromètre pour le suivi des transitions :</u>

	Value	Readback	Unit
Potentiel du spray	4500	4517	V
Température du nébuliseur	396	397	K
Pression du gaz nébuliseur	20	20	Psi
Pression du gaz de balayage des ions	2	2	Psi
Pression du gaz auxiliaire	5	5	Psi
Température du capillaire	273	273	K
Offset de la lentille du tube	Variable	42 – 240	V
Offset du skimmer	-14	-14	V
Pression de collision	1,4	1,4	Psi
Energie de collision	19 V (583 Th → 321 Th)	-28 +14	V
	14 V (583 Th → 524 Th)		

Illustration 10 : Photographie légendée du triple quandripôle ThermoFischer Scientific

I.H. Systèmes expérimentaux en pharmacologie

I.H.1. Brandel

- Type : Harvester.
- Alimentation : 220 V ; 2 A ; 50 Hz.
- Cat No : M-48.
- Modèle : M-48.
- S/N° : 97112-1.

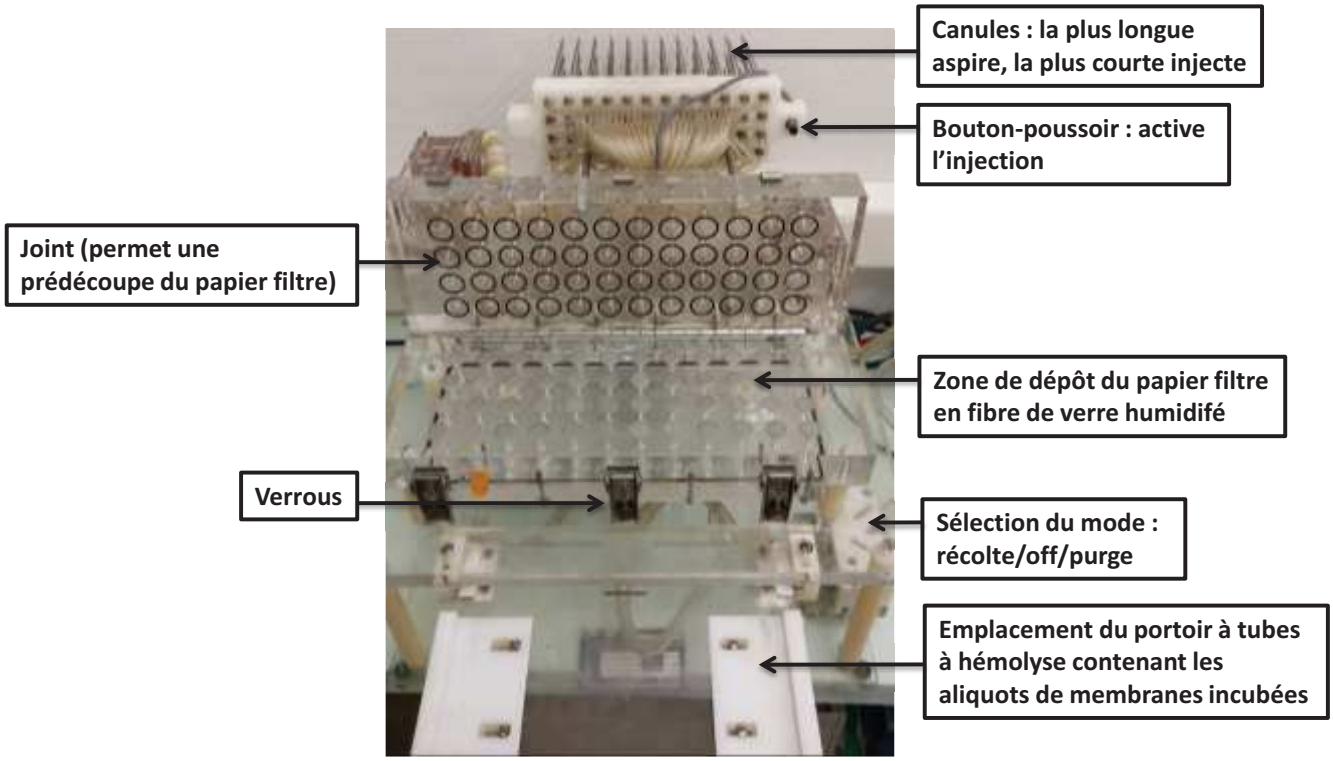


Illustration 11 ; Photographie légendée de la plate-forme à filtration Brandel

I.H.2. Centrifugeuse

- Fabriquant : Sigma.
- Type (modèle) : 2K15.
- S/N° : 66263.
- Achat : 1999.
- Vitesse max (rpm) : 15 300.
- Capacité max (mL) : 400 (24 micro-tubes eppendorfs).
- Densité max ($Kg.dm^{-3}$) : 1,2.
- Energie cinétique (J) : 9 294.
- Puissance (W) : 940.
- Alimentation : 230 V ; 50 Hz ; 6,3 A.

Illustration 12 : Photographie de la centrifugeuse

I.H.3. Thermomixeur

- Nom : Thermomix comfort.
- Fabriquant : Eppendorf AG.
- N° : 5355 38357.
- Alimentation : 100-240 V ; 50 – 60 Hz.
- Puissance 90 W.

Illustration 13 : Photographie légendée du thermomixeur

I.H.4. Pièce de culture cellulaire

Cette pièce a servi à la culture des cellules CHO-V_{1A} et HEK293 surexprimant respectivement les récepteurs V_{1A} et CCK_B-R. Les préparations de membranes obtenues à partir de ces lignées cellulaires ont été réalisées dans cet environnement stérile pour garantir leur qualité.

I.I. Systèmes divers

I.I.1. Balances de précision

Les balances sont équipées d'un système de contrôle électronique poussé pour ajuster la mesure de très faibles masses (inférieures au mg).

Balance	Précision
A	0,2 mg
B	0,0001 mg

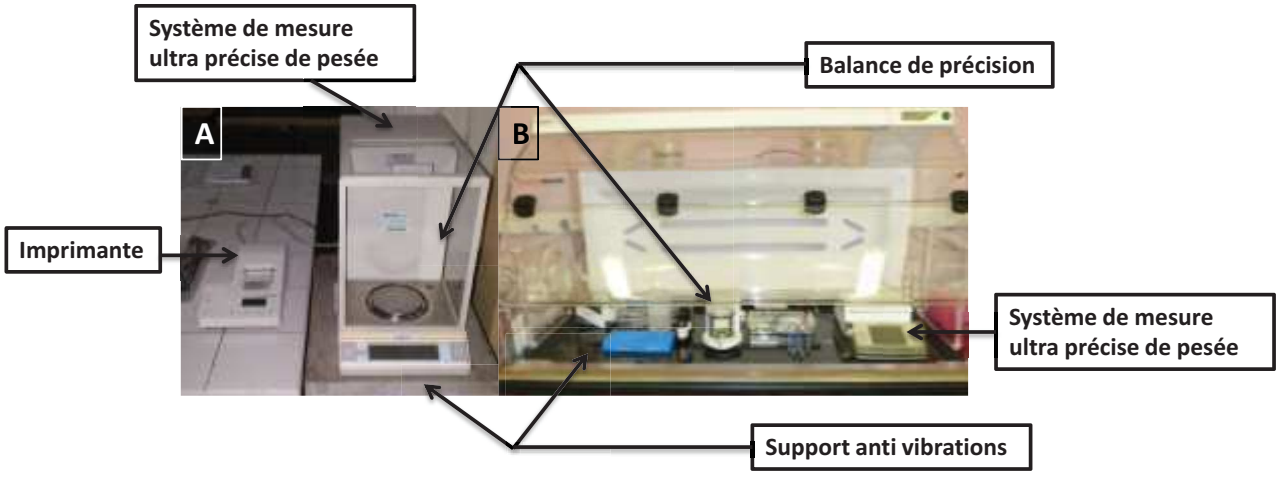


Illustration 14 : Photographie légendée des deux balances de précision utilisées pour les pesées de peptides

I.I.2. pH-mètre

Le pH-mètre est régulièrement étalonné avec des solutions tampon fraîches avant chaque série de mesure pour assurer leur précision.

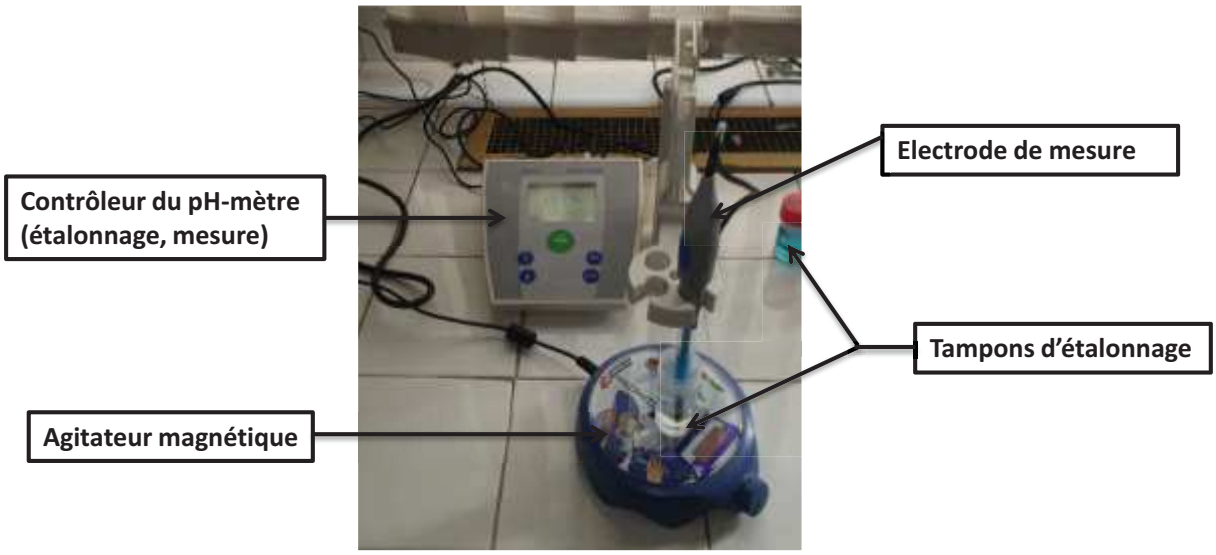


Illustration 15 : Photographie légendée d'un pH-mètre utilisé pour l'analyse précise de pH de solution de peptides

I.I.3. Electrophorèse capillaire

Constructeur	Sciex
Marque	Beckman Coulter
Solution de lavage	NaOH 1 M
Solution de rinçage	H_2O
Pression de lavage/rinçage	20 psi

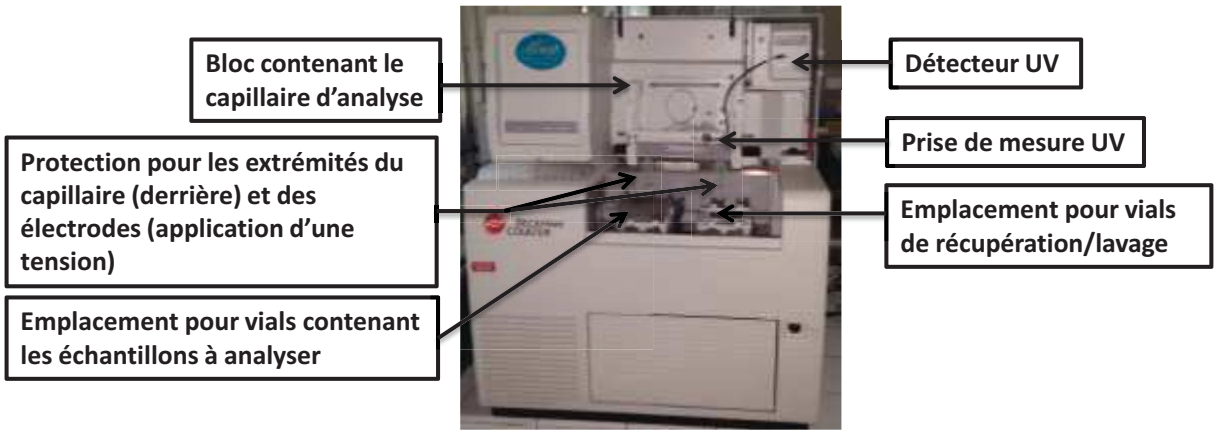


Illustration 16 : Photographie légendée de l'appareil servant à l'analyse par électrophorèse capillaire

I.I.4. Analyseur élémentaire

Les analyses élémentaires ont été effectuées sur un appareil de la marque Elementar présentant les caractéristiques suivantes :

Appareil	Variomicro cube CHNSO	Basic controler board	B08.17
Serial No	15143030	TCD board version	T04.03
Software	VarioMICRO version 3.1.6	TCD (Serial No)	96140084503:3

L'appareil a été utilisé avec les paramètres suivants :

Power supply	220 V (AC)	Heater 1	1 150 °C
Gas supply He	1,3 bar	Heater 2	850 °C
Gas supply O_2	2 bar	Flow rate (He)	200 mL/min
Operating pressure	1,3 bar (manometer)	Flow rate (O_2)	32 mL/min

Illustration 17 : Photographie de l'analyseur élémentaire « Elementar »

I.I.5. Spectrophotomètre UV-Visible

Ce spectromètre a servi à effectuer les mesures d'absorbance pour l'étalonnage de la méthode de Bradford de dosage des protéines et la mesures des titres des préparations membranaires.

- Paramétrage du spectrophotomètre :

Marque	Varian
Type	Cary 100Scan UV-Visible spectrophotometer
Faisceau	Double faisceau de mesure
Serial No	R928 PMT
Détecteur	modèle Carry 100
Longueur d'onde de travail	595 nm

Illustration 18 : Photographie légendée du spectrophotomètre UV-visible

I.I.6. Nébuliseur Suncollect

Le nébuliseur de la marque Suncollect a été utilisé pour nébuliser une solution de matrice sur la plaque MALDI afin de procéder à des analyses suivant cette méthode de dépôt.

Marque	Suncollect
Type	MALDI spotter
Logiciel	Sun Collect 1.7.43
Part N°	458-210-100
Serial N°	SC1312.006.106
Alimentation	24V DC – 1,2 A – 20 W
Mode de déplacement	En serpent
Nombre de couches déposées	8
Débits utilisés	10 µL/min (couche 1) ; 20 µL/min (couche 2) ; 30 µL/min (couche 3) ; 40 µL/min (couches 4+)

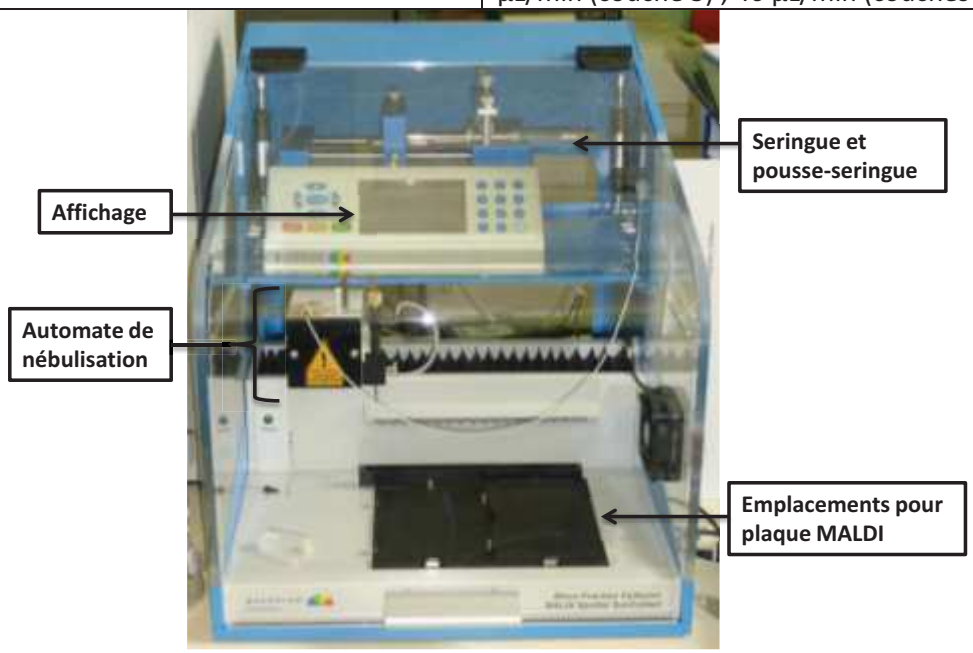


Illustration 19 : Photographie légendée du nébuliseur Suncollect

II. Synthèses et caractérisations

II.A. Protocoles de dépôt MALDI optimisés

II.A.1. Goutte séchée inversée

Un volume de 0,5 µL d'analyte est déposé dans un premier temps sur la plaque MALDI avant de sécher. Puis, une fois le dépôt sec, un volume de 0,5 µL de solution de matrice est déposé par-dessus le premier dépôt et séché à son tour.

II.A.2. Goutte séchée pré mélangée

Dans le cas d'un dépôt en mode détection, un volume de 20 µL de solution de matrice est mélangé à 20 µL de solution d'analyte. Le mélange est homogénéisé par 7 à 20

aspirations/refoulements à l'aide d'une micropipette. Puis 1 µL de solution est déposé sur la plaque MALDI et séchée.

Dans le cas d'un dépôt en mode quantification, 20 µL de solution de matrice, 20 µL de solution d'analyte et 20 µL de solution d'étalon sont mélangés. La solution est homogénéisée par 7 à 20 aspirations/refoulements. Puis 1 µL de solution est déposée sur la plaque MALDI.

II.A.3. Goutte séchée pré mélangée à 50 % de solution de matrice (GSP-M1/2)

Un volume de 40 µL de solution de matrice est mélangé à 20 µL de solution d'analyte et 20 µL de solution d'étalon. Le mélange est homogénéisé par 7 à 20 aspirations/refoulements à l'aide d'une micropipette. Puis 1 µL de solution est déposé sur la plaque MALDI et séchée.

II.B. Préparation de matrice

II.B.1. Solution d'HCCA saturée

Un échantillon de 10 mg matrice HCCA est pesé dans un micro-tube. Le solide est dissous avec 1 mL d'une solution fraîche de H2O/MeCN/TFA (70/30/0,1). Le mélange est agité par aspirations/refoulements à l'aide d'une micropipette 7 à 20 fois. Puis le micro-tube est centrifugé pour former un dépôt de matrice solide non dissoute et ne pas risquer d'en aspirer lors des prélèvements. Il est souhaitable d'optimiser la masse de matrice à peser en fonction du volume de matrice requis et d'adapter le volume de solution de dissolution de celle-ci en fonction.

II.B.2. Solution d'HCCE 10 %

Un échantillon de 2 mg matrice HCCE est pesé dans un micro-tube. Le solide est dissous avec 100 µL d'une solution fraîche de MeCN/TFA à 1 % de TFA pour obtenir la solution saturée. Le mélange est agité par aspirations/refoulements à l'aide d'une micropipette 7 à 20 fois. Puis le micro-tube est centrifugé pour former un dépôt de matrice solide non dissoute et ne pas risquer d'en aspirer lors des prélèvements pour la dilution. Celle-ci s'opère en prélevant 60 µL de solution saturer à incorporer à 540 µL de solution de MeCN/TFA à 1 % de TFA pour obtenir la dilution à 10 % de la concentration de saturation. Puis la solution est homogénéisée par 7 à 20 aspirations/refoulements.

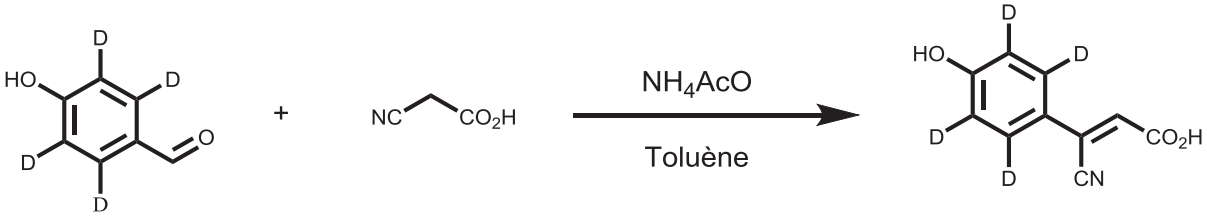
II.B.3. Solution d'HCCE 1 %

Le protocole de préparation de matrice HCCE à 10 % est suivi dans un premier temps. Lorsque la solution à 10 % de la concentration de saturation est obtenue, n × 100 µL sont prélevés et incorporés à n × 900 µL de solution répartis dans « n » micro-tubes de MeCN/TFA à 1 % de TFA.

II.C. Modes opératoires détaillés

II.C.1. Synthèse des marqueurs pour SID

II.C.1.a. Synthèse de l'acide (E)-2-cyano-3-(4-hydroxyphényl-2,3,5,6-D4)acrylique



Le 4-hydroxybenzaldéhyde-2,3,5,6-D_4 (65 mg ; 0,52 mmol ; 1 eq) est dissout dans 10 mL de toluène. L'acide cyanoacétique (56 mg ; 0,67 mmol ; 1,3 eq) et l'acétate d'ammonium (40 mg ; 0,52 mmol ; 1 eq) sont ajoutés au mélange. La réaction est agitée pendant 4 h à 120 °C en tube scellé. La complétion de la réaction est vérifiée par HPLC-UV. Puis, le mélange est filtré sur fritté et lavé avec un peu de solution de $KHSO_4$ 1N froide puis avec de l'eau mQ froide. Le produit obtenu est ensuite séché sous vide.

^{1}H NMR (400 MHz, *DMSO-d_6*) δ ppm 7.9 (s, 1 H)

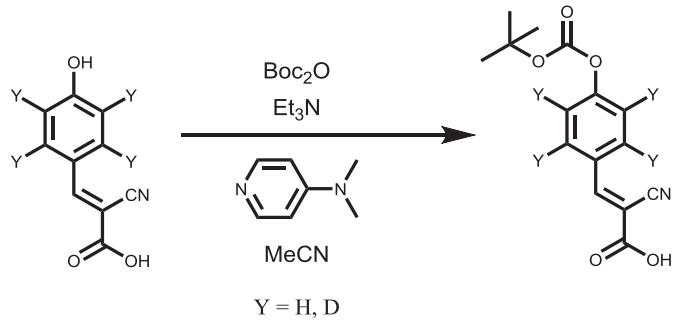
^{13}C NMR (101 MHz, *DMSO-d_6*) δ ppm 106.3 (1 C_{IV}), 115.7 (2 C_{III}), 119.2 (1 C_{IV}), 123.5 (1 C_{IV}), 131.7 (2 C_{III}), 149.0 (1 C_{III}), 160.9 (1 C_{IV}), 164.1 (1 C_{IV})

HPLC-UV (t_r) : 1,81 min

LC-MS : $[M-H]^-$ à 192 Th

Rendement : > 99 %

II.C.1.b. Synthèse de l'acide 3-(4-((tert-butoxycarbonyl)oxy)phényl)-2-cyanoacrylique, Y = H



L'HCCA-D_0 (3,27 g ; 17,28 mmol ; 1 eq) et la TEA (3,5 g ; 34,56 mmol ; 2 eq) sont dissous dans 5 mL de MeCN mis sous agitation. De la DMAP (422,21 mg ; 3,46 mmol ; 0,2 eq) et du $^{t}Boc_2O$ (4,53 g ; 20,74 mmol ; 1,20 eq) sont ensuite ajoutés au mélange. Ce dernier devient incolore peu de temps après l'ajout. La réaction est suivie par HPLC. Après 2 h, le solvant est évaporé sous pression réduite. Le mélange réactionnel est dilué dans 300 mL de DCM et subi une extraction avec 50 mL de $KHSO_4$ 1M en contrôlant le pH qui doit être acide. La phase organique est séparée et la phase aqueuse subi

3 extractions avec 15 mL de DCM. Les fractions organiques sont rassemblées et séchées sur $MgSO_4$. Après filtration, le solvant est évaporé sous pression réduite jusqu'à obtenir un solide jaune pâle qui est lavé avec de l'éther de pétrole puis séché.

^{1}H NMR (300 MHz, *CHLOROFORM-d*) δ ppm 1.6 (s, 9 H), 7.4 (d, *J*=8.9 Hz, 2 H), 8.1 (d, *J*=8.9 Hz, 2 H), 8.3 (s, 1 H), 11.3 (br. s, 1 H)

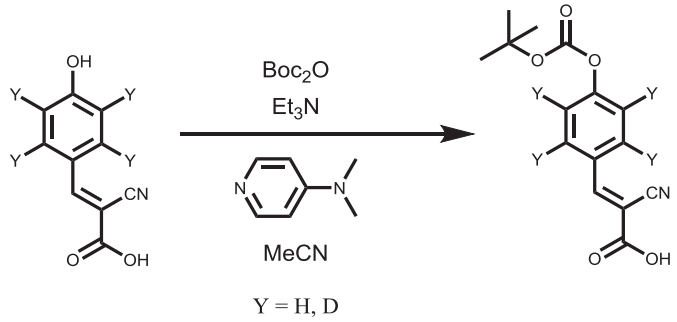
^{13}C NMR (101 MHz, *CHLOROFORM-d*) δ ppm 27.6 (s, 3 C_I), 84.6 (s, 1 C_{IV}), 102.0 (s, 1 C_{IV}), 114.9 (s, 1 C_{IV}), 122.2 (s, 2 C_{III}), 128.5 (s, 1 C_{IV}), 132.9 (s, 2 C_{III}), 150.7 (s, 1 C_{IV}), 154.9 (s, 1 C_{III}), 155.2 (s, 1 C_{IV}), 167.2 (s, 1 C_{IV})

HPLC-UV (t_r) : 2,72 min

LC-MS : $[M+H]^+$ à 290 Th

Rendement : 92 %

II.C.1.c. Synthèse de l'acide (E)-3-(4-((tert-butoxycarbonyl)oxy)phényl-2,3,5,6-D_4)-2-cyanoacrylique, Y = D



Y = H, D

L'HCCA-D_4 (94 mg ; 0,51 mmol ; 1 eq) et la TEA (0,14 mL ; 103 mg ; 1,01 mmol ; 2 eq) sont dissous dans 5 mL de MeCN mis sous agitation. De la DMAP (12,4 mg ; 0,1 mmol ; 0,2 eq) et du $^{t}Boc_2O$ (133 mg ; 0,61 mmol ; 1,2 eq) sont ensuite ajoutés au mélange. Ce dernier devient incolore peu de temps après l'ajout. La réaction est suivie par HPLC. Après 2 h, le solvant est évaporé sous pression réduite. Le mélange réactionnel est dilué dans 5 mL de DCM et subi une extraction avec 5 mL de $KHSO_4$ 1M en contrôlant le pH qui doit être acide. La phase organique est séparée et la phase aqueuse subi 3 extractions avec 15 mL de DCM. Les fractions organiques sont rassemblées et séchées sur $MgSO_4$. Après filtration, le solvant est évaporé sous pression réduite jusqu'à obtenir un solide blanc pâle.

^{1}H NMR (400 MHz, *CHLOROFORM-d*) δ ppm 1.6 (s, 9 H), 8.3 (s, 1 H)

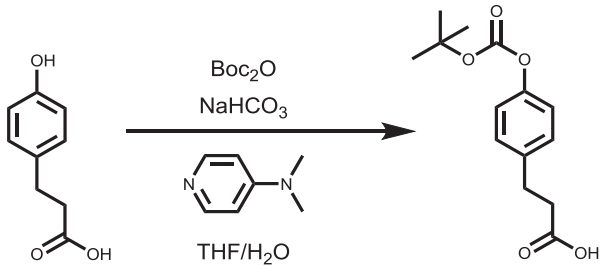
^{13}C NMR (101 MHz, *CHLOROFORM-d*) δ ppm 27.6 (3 C_I), 84.5 (1 C_{IV}), 102.9 (1 C_{IV}), 115.4 (1 C_{IV}, 121.7 (2 C_{III}), 128.6 (1 C_{IV}), 132.2 (2 C_I), 150.8 (1 C_{IV}), 154.1 (1 C_{III}), 158.5 (1 C_{IV}), 165.4 (1 C_{IV})

HPLC-UV (t_r) : 2,47 min

LC-MS : $[M-H]^-$ à 292 Th

Rendement : 95 %

II.C.1.d. Synthèse de l'acide 3-(tBoc-4-hydroxyphényl)propionique



L'acide 3-(4-hydroxyphényl)propionique (332 mg ; 2 mmol ; 1 eq) et $NaHCO_3$ 1N (5 mL ; 420 mg ; 5 mmol ; 2,5 eq) sont dissous dans 5 mL de THF et agités à température ambiante. De la DMAP (244 mg ; 2 mmol ; 1 eq) du $^tBoc_2O$ (567 mg ; 2,6 mmol ; 1,3 eq) sont ajoutés au mélange réactionnel. La réaction est suivie par HPLC. Après 2 h, si la conversion n'est pas complète, davantage de $^tBoc_2O$ (567 mg ; 2,6 mmol ; 1,3 eq) est rajouté. Après 4 h, le mélange réactionnel est dilué dans 10 mL de DCM et subi une extraction avec 7 mL de $KHSO_4$ 1M en contrôlant le pH qui doit être acide. La phase organique est séparée et la phase aqueuse subi 3 extractions avec 15 mL de DCM. Les fractions organiques sont rassemblées et séchées sur $MgSO_4$. Après filtration, le solvant est évaporé sous pression réduite jusqu'à obtenir un solide blanc.

^{1}H NMR (300 MHz, *CHLOROFORM-d*) δ ppm 1.6 (s, 9 H), 2.7 (ta, 2 H), 3.0 (ta, 2 H), 7.1 (da, 2 H), 7.2 (da, 2 H)

^{13}C NMR (75 MHz, *CHLOROFORM-d*) δ ppm 27.7 (s, 3 C_I), 29.9 (s, 1 C_{II}), 35.5 (s, 1 C_{II}), 83.5 (s, 1 C_{IV}), 121.3 (s, 2 C_{III}), 129.2 (s, 2 C_{III}), 137.6 (s, 1 C_{IV}), 149.5 (s, 1 C_{IV}), 152.0 (s, 1 C_{IV}), 178.7 (s, 1 C_{IV})

HPLC-UV (t_r) : 1,11 min

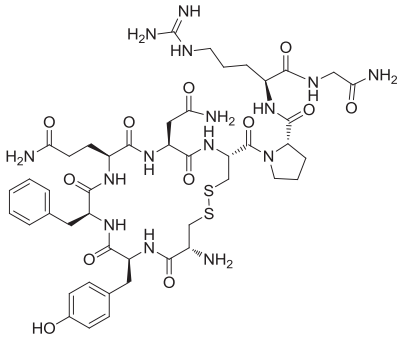
LC-MS : $[M-H]^-$ à 265 Th

Rendement : 90 %

II.C.2. Synthèses des peptides

II.C.2.a. Protocole général de synthèse automatisée sous micro-ondes

II.C.2.b. Synthèse de l'AVP



Couplage des résidus :

Les Fmoc-AA (0,38 mmol ; 0,19 mol.L^{-1}) dissous dans 2 mL de DMF ont été utilisés pour une synthèse étape par étape en suivant les principes de SPPS et en utilisant une solution de HATU (0,38 mmol ; 0,19 mol.L^{-1}) dans 2 mL de DMF, et une solution de DIEA (0,75 mmol ; 0,75 mol.L^{-1}) dans 1 mL de DMF pendant 300 s sous N_2 à 40 W et 70 °C

Déprotection du Fmoc :

Le retrait du groupement protecteur Fmoc est opéré avec un mélange DMF/pipéridine 80/20 à hauteur de 2 fois 10 mL pendant 30 minutes à température ambiante. Ces conditions sont également utilisées pour retirer le groupement protecteur Fmoc de l'ancre de la résine Fmoc-rink-amide polystyrène (100-200 mesh, 0.45 mmol.g^{-1}).

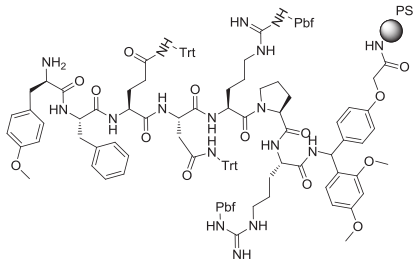
Clivage de l'ancre sur résine et déprotection des chaînes latérales d'acide amine :

Après tous les cycles de protection/déprotection, la résine contenant le peptide est hydrolysée avec une solution de TFA/TIS/H_2O (95/2,5/2,5 ; v/v/v) pendant 90 minutes à température ambiante et sous agitation vigoureuse. La résine est ensuite filtré, lavée avec du dichlorométhane et le filtrat est concentré sous vide. Le peptide brut est précipité par ajout d'éther puis centrifugé et purifié. Après purification le produit est lyophilisé.

Formation de pont S-S (pour la synthèse de l'AVP) :

Le peptide est dilué à 5.10^{-3} mol.L^{-1} dans un tampon NaH_2PO_4/Na_2HPO_4 (pH ≈ 7,5-8). La réaction est agitée à température ambiante pendant 3 h sous atmosphère. La réaction est contrôlée par HPLC et LC-MS. Puis le mélange est lyophilisé puis purifié.

II.C.2.c. Couplage des fragments en position N-terminale pour les peptides MR 6-D_0, MR 6-D_4 et MR 5



Couplage de l'acide (E)-3-(^{t}Boc-4-(hydroxy)phényl)-2-cyanoacrylique :

La résine (0,125 mmol ; 1 eq) est solubilisée dans un minimum de DMF et ajoutée dans le réacteur (serringue avec fritté). Une solution du fragment à coupler (voir Tableau 85 ci-dessous), DIC (0,09 mL ; 71 mg ; 0,56 mmol ; 2 eq) et d'HOBt (76 mg ; 0,56 mmol ; 2 eq) dissous dans 2 mL de DMF est ajoutée. Le mélange est ensuite agité pendant 4 h à température ambiante. Par la suite, la résine est lavée 3 fois avec du DMF, 3 fois avec du MeOH et 3 fois du DCM. Un test de Kaiser est ensuite effectué pour vérifier la complétion de la réaction.

	Fragment à coupler						
	Nom	Quantité	HPLC-UV (t_r)[611]	% MeCN (purification)[612]	LC-MS	HRMS	Rendement
MR 4 – AVP	-	-	0,9 min	20 %	542,7 Th $[M+2H]^{2+}$; 1 084,4 Th $[M+H]^{+}$	1084,4457 Th (mesuré) ; 1084,4463 Th (calculé)	22 % (60 mg)
MR 5 - Homo-HO-LVA	Acide 3-(^{t}Boc-4-hydroxyphényl)propionique	50 mg ; 0,19 mmol ; 1,5 eq	2,2 min	28 %	571,3 Th $[M+2H]^{2+}$ 1 141,6 Th $[M+H]^{+}$	1141,5903 Th (mesuré) 1141,5907 Th (calculé)	29 % (28 mg)
MR 6-D_0	^{t}Boc-HCCA-D_0	72 mg ; 0,25 mmol ; 2 eq	2,5 min	33 %	582,8 Th $[M+2H]^{2+}$ 1 164,6 Th $[M+H]^{+}$	1164,5709 Th (mesuré) 1164,5698 Th (calculé)	34 % (55 mg)
MR 6-D_4	^{t}Boc-HCCA-D_4	48 mg ; 0,16 mmol ; 1,3 eq	2,9 min	33 %	584,8 Th $[M+2H]^{2+}$ 1 168,6 Th $[M+H]^{+}$	1168,5948 Th (mesuré) 1168,5949 Th (calculé)	27 % (43 mg)

Tableau 85 : Résumé des caractérisations des peptides MR 4 – AVP, MR 5 - Homo-HO-LVA, MR 6-D_0 et MR 6-D_4

II.C.2.d. Protocole général de synthèse manuelle

II.C.2.e. Synthèse des peptides MR 10-D_0, MR 10-D_4

Couplage des résidus :

Les Fmoc-AA (0,38 mmol ; 0,19 mol.L^{-1}) dissous dans 2 mL de DMF ont été utilisés pour une synthèse étape par étape en suivant les principes de SPPS et en utilisant une solution de HBTU (0,38 mmol ; 0,19 mol.L^{-1}) dans 2 mL de DMF, et une solution de DIEA (0,75 mmol ; 0,75 mol.L^{-1}) dans 1 mL de DMF pendant 90 minutes à température ambiante.

[611] Gradient optimisé : 20-70 % d'acétonitrile + 0,1 % de TFA en 10 minutes

[612] Les peptides sont purifiés sur DeltaPack® C18 ; 15 µm ; 100 Å ; 40×100 mm avec un mélange d'éluants H_2O + 0.1 % TFA / MeCN + 0,1 % TFA

Déprotection du Fmoc :

Le retrait du groupement protecteur Fmoc est opéré avec un mélange DMF/pipéridine 80/20 à hauteur de 2 fois 10 mL pendant 30 minutes à température ambiante. Ces conditions sont également utilisées pour retirer le groupement protecteur Fmoc de l'ancre de la résine Fmoc-rink-amide polystyrène (100-200 mesh, 0.45 mmol.g^{-1}).

Le peptide brut encore ancré à la résine est conserve en vue du couplage avec le fragment ^{t}Boc-HCCA-D_0 ou ^{t}Boc-HCCA-D_4.

Clivage de l'ancre sur résine et déprotection des chaînes latérales d'acide aminé :

Après tous les cycles de protection/déprotection, la résine contenant le peptide est hydrolysée avec une solution de TFA/TIS/H_2O (95/2,5/2,5 ; v/v/v) pendant 90 minutes à température ambiante et sous agitation vigoureuse. La résine est ensuite filtré, lavée avec du dichlorométhane et le filtrat est concentré sous vide. Le peptide brut est précipité par ajout d'éther puis centrifugé et purifié. Après purification le produit est lyophilisé.

	Fragment à coupler						
	Nom	Quantité	HPLC-UV (t_r)[613]	% MeCN (purification)[614]	LC-MS	HRMS	Rendement
MR 9-D_0	^{t}Boc-HCCA-D_0	72 mg ; 0,25 mmol ; 2 eq	-	41 %	1 019,5 $[M+H]^+$	n.d	4 % (10 mg)
MR 9-D_4	^{t}Boc-HCCA-D_4	48 mg ; 0,16 mmol ; 1,3 eq	-	41 %	1 023,5 $[M+H]^+$	n.d	2 % (3 mg)
MR 10-D_0	^{t}Boc-HCCA-D_0	72 mg ; 0,25 mmol ; 2 eq	4,4 min	43 %	1 030,5 $[M+H]^+$	n.d	53 % (69 mg)
MR 10-D_4	^{t}Boc-HCCA-D_4	48 mg ; 0,16 mmol ; 1,3 eq	4,2 min	43 %	1 034,7 $[M+H]^+$	n.d	23 % (31 mg)

Tableau 86 : Résumé des caractérisations des peptides MR 9-D_0, MR 9-D_4, MR 10-D_0 et MR 10-D_4

[613] Gradient optimisé : 20-70 % d'acétonitrile + 0,1 % de TFA en 10 minutes

[614] Les peptides sont purifiés sur DeltaPack® C18 ; 15 µm ; 100 Å ; 40×100 mm avec un mélange d'éluants H_2O + 0.1 % TFA / MeCN + 0,1 % TFA

II.C.2.f. Radiomarquage à l'iode 125

De sincères remerciements sont adressés au Dr Jacky Marie pour le marquage réalisé à l'iode 125. Le peptide MR 5 est radioidoé en position 1 du noyau aromatique en position N-terminale par l'utilisation d'un oxydant, la Chloramine T en présence de 1 mCi [^{125}I]-Na tel que décrit par Elands et al.[615] La séparation immédiate des produits de réaction est obtenue par injection sur une colonne HPLC C18 (SymmetryShield RP18 column, 3.5 µm, 4.6 x 75 mm, Waters©). Les produits de réaction sont séparés avec un gradient linéaire de 0 à 60 % d'acétonitrile à 0,1 % de TFA. La radioactivité spécifique du peptide monoiodé est mesurée à 2.10^6 cpm dans 10 µL de la fraction 18 (voir Figure 235 ci-dessous).

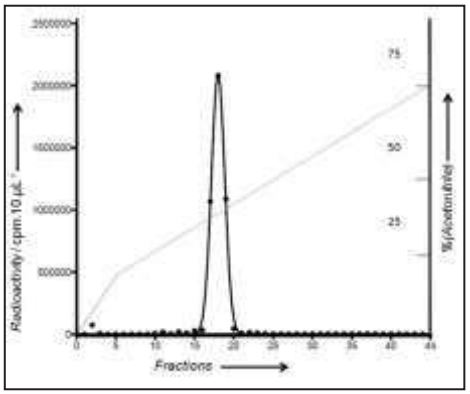


Figure 235: Profil HPLC de la purification de [^{125}I]MR 5

[615] Elands J, Barberis C, Jard S, Tribollet E, Dreifuss J-J, Bankowski K, Manning M, Sawyer WH: ^{125}I-labelled d(CH$_2$)^5[Tyr(Me)², Thr^4,Tyr-NH$_2$^{9}]OVT: A selective oxytocin receptor ligand, *Eur J Pharmacol,* **1988**; *147*, 197-207

II.C.3. Synthèses de marqueurs en position N-terminale

II.C.3.a. Protocole général de synthèse des marqueurs portant la charge préformée et un lien

De l'acide chloroacétique (1,88 g ; 20 mmol ; 1 eq) est dissout dans 10 mL d'acétate d'éthyle dans un tube scellé. Puis l'amine (voir Tableau 87 ci-dessous) est ajoutée au mélange en léger excès. Le tube est ensuite scellé et le mélange agité pendant 3 h à 110 °C. Puis le solvant est coévaporé avec du méthanol sous vide. Le produit est ensuite dissout à nouveau dans un minimum de méthanol et précipité avec de l'acétone. Le solide est ensuite lavé avec de l'acétone et de l'éther diéthylique. Puis le produit est séché sous vide.

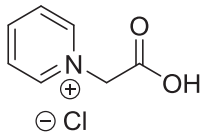
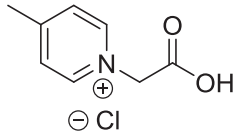
Molécule		Amine				
Structure	Nom	Nom	Quantité	HPLC-UV (t_r)[616]	LC-MS	Rendement
	Chlorure de 1-(carboxyméthyl)pyridin-1-ium	Pyridine	1,58 g ; 1,61 mL ; 20 mmol ; 1 eq	Pas de rétention sur la colonne	138 Th $[M]^+$	46 %
	Chlorure de 1-(carboxyméthyl)-4-méthylpyridin-1-ium	4-picoline	1,86 g ; 1,95 mL ; 20 mmol ; 1 eq	Pas de rétention sur la colonne	152 Th $[M]^+$	78 %

Tableau 87 : Résumé des conditions de synthèse particulière et des données analytiques concernant les marqueurs portant une charge préformée et un lien

II.C.3.b. RMN des marqueurs portant une charge préformée et un lien

Chlorure de 1-(carboxyméthyl)pyridin-1-ium :

^{1}H NMR (300 MHz, *DMSO*-d_6) δ ppm 5.66 (s, 2 H), 8.22 (t, *J*=7.1 Hz, 2 H), 8.69 (t, *J*=7.8 Hz, 1 H), 9.13 (d, *J*=5.6 Hz, 2 H)

^{13}C NMR (75 MHz, *DMSO*-d_6) δ ppm 60.66 (1 C), 127.71 (3 C), 146.22 (1 C), 146.40 (1 C), 167.58 (1 C)

[616] Gradient non optimisé

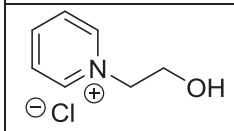
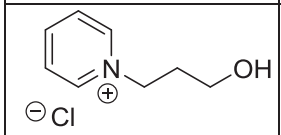
Chlorure de 1-(carboxyméthyl)-4-méthylpyridin-1-ium :

^{1}H NMR (300 MHz, *DMSO*-d_6) δ ppm 2.61 - 2.65 (m, 6 H), 5.57 (s, 7 H), 7.79 (d, *J*=5.91 Hz, 1 H), 8.03 (d, *J*=6.51 Hz, 2 H), 8.92 - 8.99 (m, 7 H)

^{13}C NMR (75 MHz, *DMSO*-d_6) δ ppm 21.61 (s, 10 C), 59.88 (s, 7 C), 128.00 (s, 18 C), 145.12 (s, 14 C), 159.91 (s, 6 C), 167.75 (s, 8 C)

II.C.3.c. Protocole général de synthèse des marqueurs portant la charge préformée et un lien

Le chloroalcool/chloroammonium (voir Tableau 88 ci-dessous) est dissout dans 10 mL de toluène dans un tube scellé. Puis l'amine (voir Tableau 88 ci-dessous) est ajoutée au mélange en léger excès. Le tube est ensuite scellé et le mélange agité pendant 24 h à 120 °C. Puis le solvent est coévaporé avec du méthanol sous vide. Le produit est ensuite dissout à nouveau dans un minimum de méthanol et précipité avec de l'acétone. Le solide est ensuite lavé avec de l'acétone et de l'éther diéthylique. Puis le produit est séché sous vide.

Molécule		Chloroalcool/Chloroammonium		Amine				
Structure	Nom	Nom	Quantité	Nom	Quantité	HPLC-UV (t_r)[617]	LC-MS	Rendement
	Chlorure de 1-(2-hydroxyéthyl)pyridin-1-ium	2-chloroethanol	1,61 g ; 1,34 mL ; 20 mmol ; 1 eq	Pyridine	1,58 g ; 1,61 mL ; 20 mmol ; 1 eq	Pas de rétention sur la colonne	124 Th $[M]^+$	67 %
	Chlorure de 1-(3-hydroxypropyl)pyridin-1-ium	3-chloropropanol	1,89 g ; 1,67 mL ; 20 mmol ; 1 eq			Pas de rétention sur la colonne	138 Th $[M]^+$	95 %

[617] Gradient non optimisé

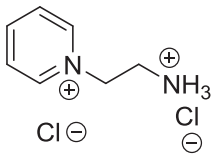
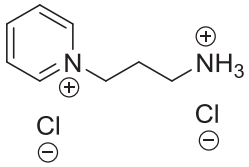
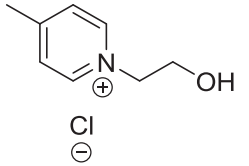
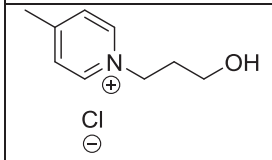
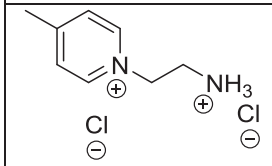
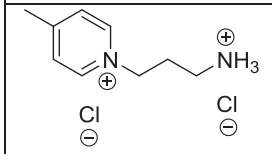
	Chlorure de 1-(2-ammonioéthyl)pyridin-1-ium	Chlorure de 2-chloroéthan-1-aminium	2.32 g ; 20 mmol ; 1 eq	Pyridine	1,58 g ; 1,61 mL ; 20 mmol ; 1 eq	Pas de rétention sur la colonne	123 Th $[M]^+$	72 %
	Chlorure de 1-(3-ammoniopropyl)pyridin-1-ium	chlorure de 3-chloropropan-1-aminium	2,60 g ; 20 mmol ; 1 eq			Pas de rétention sur la colonne	137 Th $[M]^+$	86 %
	Chlorure de 1-(2-hydroxyéthyl)-4-méthylpyridin-1-ium	2-chloroethanol	1,61 g ; 1,34 mL ; 20 mmol ; 1 eq	4-picoline	1,86 g ; 1,95 mL ; 20 mmol ; 1 eq	Pas de rétention sur la colonne	138 Th $[M]^+$	37 %
	Chlorure de 1-(3-hydroxypropyl)-4-méthylpyridin-1-ium	3-chloropropanol	1,89 g ; 1,67 mL ; 20 mmol ; 1 eq			Pas de rétention sur la colonne	152 Th $[M]^+$	73 %
	Chlorure de 1-(2-ammonioéthyl)-4-méthylpyridin-1-ium	Chlorure de 2-chloroéthan-1-aminium	2.32 g ; 20 mmol ; 1 eq			Pas de rétention sur la colonne	137 Th $[M]^+$	79 %
	Chlorure de 1-(3-ammoniopropyl)-4-méthylpyridin-1-ium	chlorure de 3-chloropropan-1-aminium	2,60 g ; 20 mmol ; 1 eq			Pas de rétention sur la colonne	151 Th $[M]^+$	90 %

Tableau 88 : Résumé des conditions de synthèse particulière et des données analytiques concernant les marqueurs portant une charge préformée

II.C.3.d. RMN des marqueurs portant uniquement une charge préformée

Chlorure de 1-(2-hydroxyéthyl)pyridin-1-ium

^{1}H NMR (300 MHz, *DMSO*-d_6) δ ppm 3.80 - 3.88 (p, 2 H), 4.68 - 4.75 (t_{ap}, 2 H), 8.16 (t, *J*=7.1 Hz, 2 H), 8.57 - 8.66 (t_{ap}, 1 H), 9.10 (d, *J*=5.3 Hz, 2 H)

^{13}C NMR (75 MHz, *DMSO*-d_6) δ ppm 60.01 (1 C), 62.94 (1 C), 127.63 (3 C), 145.22 (1 C), 145.48 (1 C)

Chlorure de 1-(3-hydroxypropyl)pyridin-1-ium

^{1}H NMR (300 MHz, *DMSO*-d_6) δ ppm 2.03 - 2.13 (t_{ap}, 2 H), 3.40 - 3.46 (t_{ap}, 2 H), 4.65 - 4.79 (m, 2 H), 8.15 (t, *J*=7.1 Hz, 2 H), 8.60 (t, *J*=7.8, 1 H), 9.15 - 9.23 (d_{ap}, 2 H)

^{13}C NMR (75 MHz, *DMSO*-d_6) δ ppm 33.42 (1 C), 56.97 (1 C), 58.52 (1 C), 127.90 (3 C), 145.07 (1 C), 145.39 (1 C)

Chlorure de 1-(2-ammonioéthyl)pyridin-1-ium

^{1}H NMR (300 MHz, *DMSO*-d_6) δ ppm 3.87 (t, *J*=5.9 Hz, 1 H), 5.02 (t, *J*=5.6 Hz, 2 H), 8.20 (t, *J*=7.1 Hz, 2 H), 8.58 - 8.67 (t_{ap}, 5 H), 8.82 (br. s., 3 H), 9.24 (d, *J*=5.6 Hz, 2 H)

^{13}C NMR (75 MHz, *DMSO*-d_6) δ ppm 41.14 (1 C), 57.55 (1 C), 128.25 (3 C), 145.50 (1 C), 146.06 (1 C)

Chlorure de 1-(3-ammoniopropyl)pyridin-1-ium

^{1}H NMR (300 MHz, *DMSO*-d_6) δ ppm 2.30 (p, *J*=7.1 Hz, 5 H), 2.84 (m, *J*=5.9 Hz, 5 H), 4.82 (t, *J*=7.2 Hz, 4 H), 8.19 (t, *J*=6.9 Hz, 5 H), 8.45 (br. s., 5 H), 8.63 (t_{ap}, 2 H), 9.25 (d, *J*=5.6 Hz, 2 H)

^{13}C NMR (75 MHz, *DMSO*-d_6) δ ppm 28.75 (1 C), 35.39 (1 C), 57.73 (1 C), 128.31 (3 C), 144.94 (1 C), 145.81 (1 C)

Chlorure de 1-(2-hydroxyéthyl)-4-méthylpyridin-1-ium

^{1}H NMR (300 MHz, *DMSO*-d_6) δ ppm 2.60 (s, 3 H), 3.76 - 3.86 (t_{ap}, 2 H), 4.60 - 4.69 (t_{ap}, 2 H), 7.99 (d, *J*=6.2 Hz, 2 H), 8.94 (d, *J*=6.5 Hz, 2 H)

^{13}C NMR (75 MHz, *DMSO*-d_6) δ ppm 21.36 (1 C), 60.01 (1 C), 62.07 (1 C), 127.91 (3 C), 144.22 (1 C), 158.71 (1 C)

Chlorure de 1-(3-hydroxypropyl)-4-méthylpyridin-1-ium

^{1}H NMR (300 MHz, *DMSO*-d_6) δ ppm 1.98 - 2.10 (p_{ap}, 2 H), 2.60 (s, 3 H), 3.37 - 3.45 (t_{ap}, 2 H), 4.65 (t, *J*=6.9 Hz, 2 H), 7.98 (d, *J*=6.2 Hz, 2 H), 9.03 (d, *J*=6.8 Hz, 2 H)

^{13}C NMR (75 MHz, *DMSO*-d_6) δ ppm 21.33 (1 C), 33.33 (1 C), 56.95 (1 C), 57.64 (1 C), 128.20 (3 C), 144.04 (1 C), 158.64 (1 C)

Chlorure de 1-(2-ammonioéthyl)-4-méthylpyridin-1-ium

^{1}H NMR (300 MHz, *DMSO*-d_6) δ ppm 2.61 (s, 3 H), 4.94 (t, *J*=5.6 Hz, 9 H), 8.03 (d, *J*=6.5 Hz, 9 H), 8.81 (br. s., 12 H), 9.07 (d, *J*=6.8 Hz, 9 H)

^{13}C NMR (75 MHz, *DMSO*-d_6) δ ppm 21.42 (1 C), 38.89 (1 C), 56.70 (1 C), 128.45 (3 C), 144.43 (1 C), 159.31 (1 C)

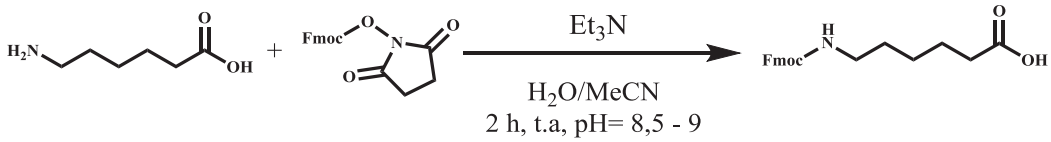
Chlorure de 1-(3-ammoniopropyl)-4-méthylpyridin-1-ium

^{1}H NMR (300 MHz, *DMSO*-d_6) δ ppm 2.22 - 2.34 (p_{ap}, 2 H), 2.61 (s, 3 H), 2.81 (m, 2 H), 4.76 (t, *J*=6.9 Hz, 2 H), 8.03 (d, *J*=6.2 Hz, 2 H), 8.54 (br. s., 3 H), 9.11 (d, *J*=6.2 Hz, 2 H)

^{13}C NMR (75 MHz, *DMSO*-d_6) δ ppm 21.42 (1 C), 28.59 (1 C), 35.22 (1 C), 56.76 (1 C), 128.50 (3 C), 143.84 (1 C), 159.04 (1 C)

II.C.4. Synthèses des acides aminés modifiés

II.C.4.a. Synthèse de Fmoc-Ahx-OH



De l'acide 6-aminohexanoïque (131,2 mg ; 1 mmol ; 1 eq) et de la triéthylamine (101,2 mg ; 1 mmol ; 1 eq) sont dissous dans de 2,5 mL d'eau mQ. Le Fmoc-OSu (321,3 mg ; 1 mmol ; 1 eq) est dissout dans 5 mL d'acétonitrile. Pendant l'agitation du mélange réactionnel, la solution est ajoutée et le pH ajusté à 8-9. La réaction est agitée à température ambiante et après 3 h de réaction, le mélange est acidifié avec de l'acide chlorhydrique 1N. Un précipité blanc se forme et est filtré sur fritté puis lavé avec de l'eau mQ froide. Le produit est ensuite séché sous vide.

^{1}H NMR (300 MHz, *DMSO-d_6*) δ ppm 1.25 (d, 2 H), 1.35 - 1.42 (m, 2 H), 1.44 - 1.52 (m, 2 H), 2.14 - 2.23 (m, 2 H), 2.96 (d, 2 H), 4.21 (d, 1 H), 4.26 - 4.32 (m, 2 H), 7.26 (t, 1 H), 7.29 - 7.36 (m, 2 H), 7.37 - 7.45 (m, 2 H), 7.68 (d, 2 H), 7.89 (d, 2 H), 11.90 - 12.07 (m, 1 H).

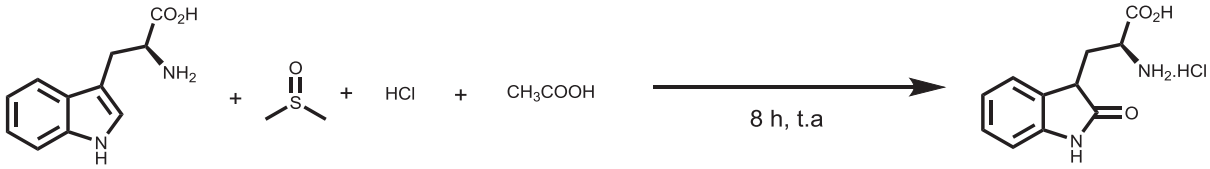
^{13}C NMR (75 MHz, *DMSO-d_6*) δ ppm 24.26, 25.83, 29.14, 33.68, 46.84, 65.20, 120.16, 125.20, 127.10, 127.65, 140.80, 143.99, 156.16, 174.54

HPLC-UV (t_r) : 2,5 min

LC-MS : 354 Th $[M+H]^+$

Rendement : 90 %

II.C.4.b. Synthèse d'Oia (mélange racémique):



Du L-tryptophane (5g ; 24,5 mmol ; 1 eq) est dissout dans 25 mL d'acide acétique glacial. Après avoir lancé l'agitation, du DMSO (4,78 g ; 61 mmol ; 2,5 eq) est ajouté au mélange réactionnel suivi par de l'acide chlorhydrique à 37 %(9,7 g ; 98 mmol ; 4 eq). Le mélange est agité pendant 8 h à température ambiante. Puis le mélange réactionnel subi une extraction à l'éther diéthylique et la phase aqueuse contenant le produit est laissée au repos le temps d'une nuit. Le lendemain, un précipité s'est formé, est filtré sur fritté puis lavé avec de l'éther diéthylique et du dichlorométhane. Le produit est ensuite séché sous vide.

^{1}H NMR (300 MHz, *DMSO-d_6*) δ ppm 2.1 (m, 2 H, H_A), 2.3 (m, 2 H, H_B), 3.7 (t_{ap}, 1 H, H_A), 3.8 (t_{ap}, 1 H, H_B), 4.1 - 4.3 (m, 1 H, H_A), 4.3 - 4.4 (m, 1 H, H_B), 6.8 (d, 2 H, H_A et H_A), 6.9 - 7.0 (t_{ap}, 2 H, H_B et H_B), 7.1 - 7.2 (m, 2 H, H_B et H_B), 7.3 (dd, 2 H, H_A et H_A), 8.7 (m, 6 H, $H_{A,B}$), 10.6 (d_{ap}, *J*=2.4 Hz, 2 H, $H_{A,B}$)

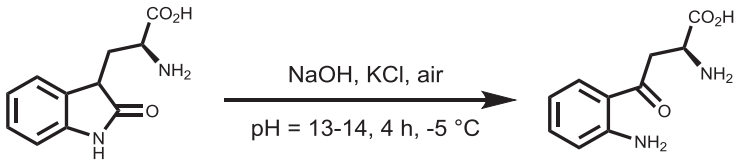
^{13}C NMR (75 MHz, *DMSO-d_6*) δ ppm 31.0 (s, 1 C), 31.5 (s, 1 C), 41.0 (s, 1 C), 42.1 (s, 1 C), 49.9 (s, 1 C), 50.0 (s, 1 C), 109.7 (s, 1 C), 121.6 (s, 1 C), 121.7 (s, 1 C), 124.1 (s, 1 C), 124.2 (s, 1 C), 128.1 (s, 1 C), 128.2 (s, 1 C), 128.7 (s, 1 C), 128.8 (s, 1 C), 142.4 (s, 1 C), 142.5 (s, 1 C), 170.4 (s, 1 C), 170.5 (s, 1 C), 178.5 (s, 1 C), 178.6 (1 C)

HPLC-UV (t_r) : 1,48 min

LC-MS : 221 Th $[M+H]^+$

Rendement : 78 %

II.C.4.c. Synthèse de H-Kyn-OH



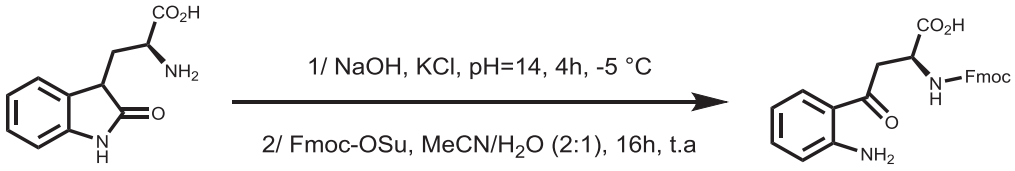
De la soude (NaOH ; 400 mg ; 10 mmol ; 10 eq) est dissoute dans 4 mL d'eau mQ dans laquelle du chlorure de potassium est ajouté (KCl ; 82 mg ; 1,1 mmol ; 1,1 eq). Puis l'oxindolyl-L-alanine (257 mg ; 1 mmol ; 1 eq) est dissoute dans le mélange. Le mélange réactionnel est agité entre -5 et 0 °C avec un bain glace/eau/sel pendant 4 h

HPLC-UV (t_r) : 1,18 min

LC-MS : 209 Th $[M+H]^+$

Rendement : n.d

II.C.4.d. Synthèse de Fmoc-Kyn-OH



De la soude (NaOH ; 400 mg ; 10 mmol ; 10 eq) est dissoute dans 4 mL d'eau mQ dans laquelle du chlorure de potassium est ajouté (KCl ; 82 mg ; 1,1 mmol ; 1,1 eq). Puis l'oxindolyl-L-alanine (257 mg ; 1 mmol ; 1 eq) est dissoute dans le mélange. Le mélange réactionnel est agité entre -5 et 0 °C avec un bain glace/eau/sel pendant 4 h. Lorsque l'oxindolyl-L-alanine est totalement convertie, le pH est ajusté à 10 avec de l'acide chlorhydrique. Puis du Fmoc-OSu (337 mg ; 1 mmol ; 1 eq) est dissout dans 14 mL d'acétonitrile et ajouté au milieu réactionnel. Le bain réfrigérant est retiré pour faire remonter progressivement la température et l'agitation laissée pendant 1 h tout en contrôlant régulièrement le pH. Le mélange réactionnel est ensuite neutralisé par HCl 1N. Le mélange

subit 3 extractions avec 30 mL d'acétate d'éthyle. Les fractions organiques sont collectées puis séchées avec du $MgSO_4$. Le solvant est ensuite évaporé sous vide et le produit séché sous vide pour obtenir le produit en mélange avec Fmoc-DiOia-OH.

Le produit brut peut être purifié par chromatographie préparative dans les conditions suivantes :

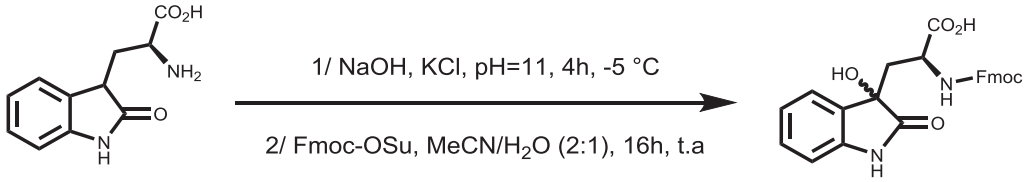
- Eluant : H_2O + 0.1 % TFA / MeCN + 0,1 % TFA.
- Extraction avec 57 % MeCN sur DeltaPack® C18 ; 15 µm ; 100 Å ; 40×100 mm.

HPLC-UV (t_r) : 2,57 min

LC-MS : 431 Th $[M+H]^+$

Rendement : n.d

II.C.4.e. Synthèse de Fmoc-DiOia-OH



L'oxindolyl-L-alanine (257 mg ; 1 mmol ; 1 eq) est dissoute dans 4 mL d'eau mQ. Puis de la soude est ajoutée pour ajuster le pH à 11 et également du chlorure de potassium est ajouté (KCl ; 82 mg ; 1,1 mmol ; 1,1 eq). Le mélange réactionnel est agité entre -5 et 0 °C avec un bain glace/eau/sel pendant 4 h. Lorsque l'oxindolyl-L-alanine est totalement convertie, le pH est ajusté à 10 avec de l'acide chlorhydrique. Puis du Fmoc-OSu (337 mg ; 1 mmol ; 1 eq) est dissout dans 14 mL d'acétonitrile et ajouté au milieu réactionnel. Le bain réfrigérant est retiré pour faire remonter progressivement la température et l'agitation laissée pendant 1 h tout en contrôlant régulièrement le pH. Le mélange réactionnel est ensuite neutralisé par HCl 1N. Le mélange subit 3 extractions avec 30 mL d'acétate d'éthyle. Les fractions organiques sont collectées puis séchées avec du $MgSO_4$. Le solvant est ensuite évaporé sous vide et le produit séché sous vide pour obtenir un mélange de Fmoc-Kyn-OH et Fmoc-DiOia-OH.

Le produit brut peut être purifié par chromatographie préparative dans les conditions suivantes :

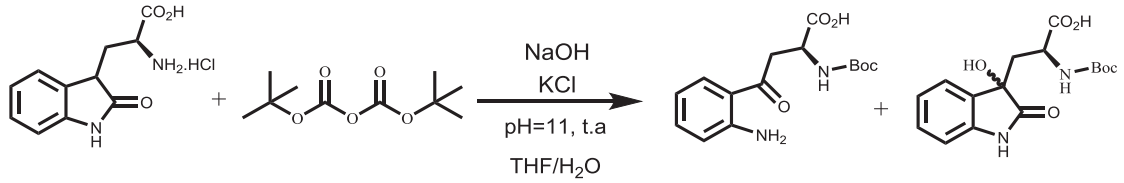
- Eluant : H_2O + 0.1 % TFA / MeCN + 0,1 % TFA.
- Extraction avec 45 % MeCN sur DeltaPack® C18 ; 15 µm ; 100 Å ; 40×100 mm.

HPLC-UV (t_r) : 2,29 min

LC-MS : 459 Th $[M+H]^+$

Rendement : n.d

II.C.4.f. Synthèse de ^{t}Boc-DiOia et ^{t}Boc-Kyn-OH



De la soude (NaOH ; 120 mg ; 3 mmol ; 3 eq) est dissoute dans 5 mL d'eau mQ dans laquelle du chlorure de potassium est ajouté (KCl ; 82 mg ; 1.1 mmol ; 1.1 eq). Puis l'oxindolyl-L-alanine (257 mg ; 1 mmol ; 1 eq) est dissoute dans le mélange. Par la suite l'anhydride de tertiobutyloxycarbonyle ($^{t}Boc_2O$; 327 mg ; 1.5 mmol ; 1.5 eq) est dissout dans 5 mL de THF et ajouté au mélange. Ce dernier est agité à température ambiante le temps d'une nuit (16 h). L'avancement est contrôlé par HPLC-UV et de la soude est rajoutée (NaOH ; 200 mg ; 5 mmol ; 5 eq). La réaction est agitée 5 h de plus. Puis le mélange réactionnel est neutralisé par $KHSO_4$ 1N. Le mélange subit 3 extractions avec 30 mL d'acétate d'éthyle. Les fractions organiques sont collectées puis séchées avec du $MgSO_4$. Le solvant est ensuite évaporé sous vide et le produit séché sous vide pour obtenir un mélange de ^{t}Boc-Kyn-OH and ^{t}Boc-DiOia-OH.

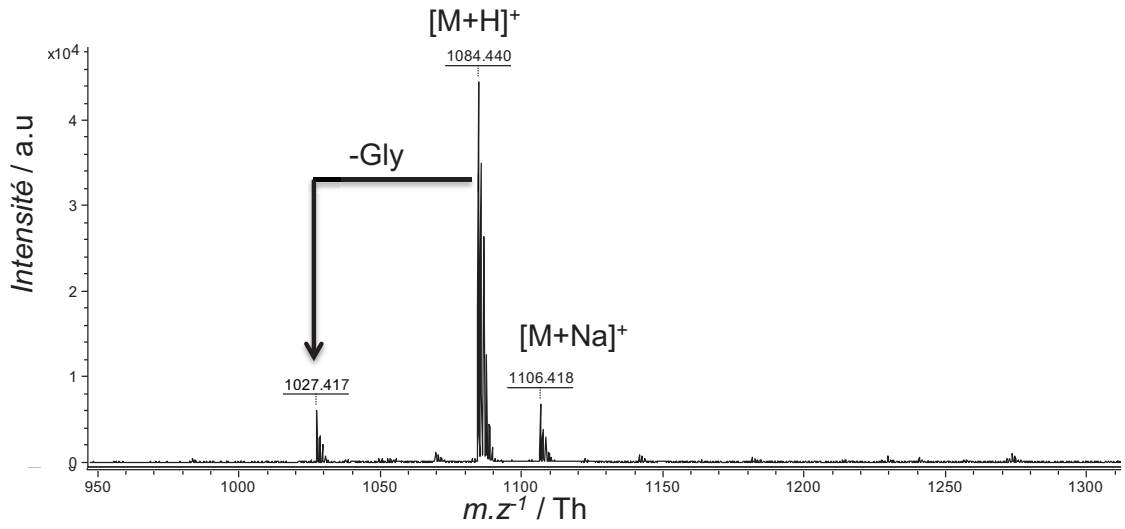
HPLC-UV (t_r) : 2,12 min, ^{t}Boc-Kyn-OH ; 1,76/1,79 min (2 isomères), ^{t}Boc-DiOia-OH

LC-MS : 309 Th $[M+H]^+$, ^{t}Boc-Kyn-OH ; 321 Th $[M+H]^+$, ^{t}Boc-DiOia-OH

Rendement : n.d

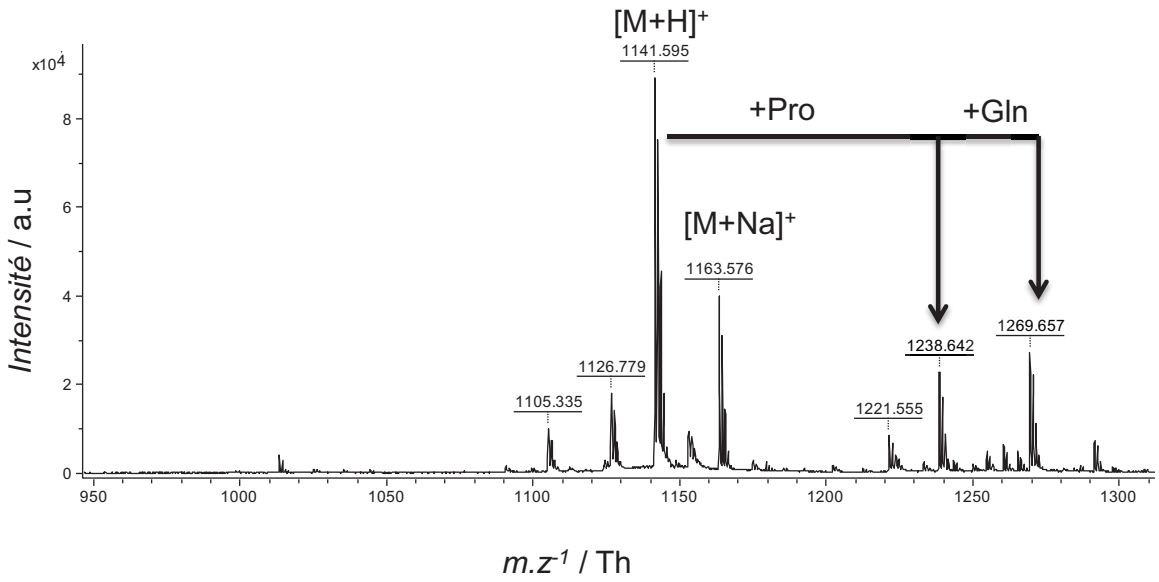
II.D. Spectres MALDI-MS des peptides synthétisés

II.D.1. MR 4 – AVP



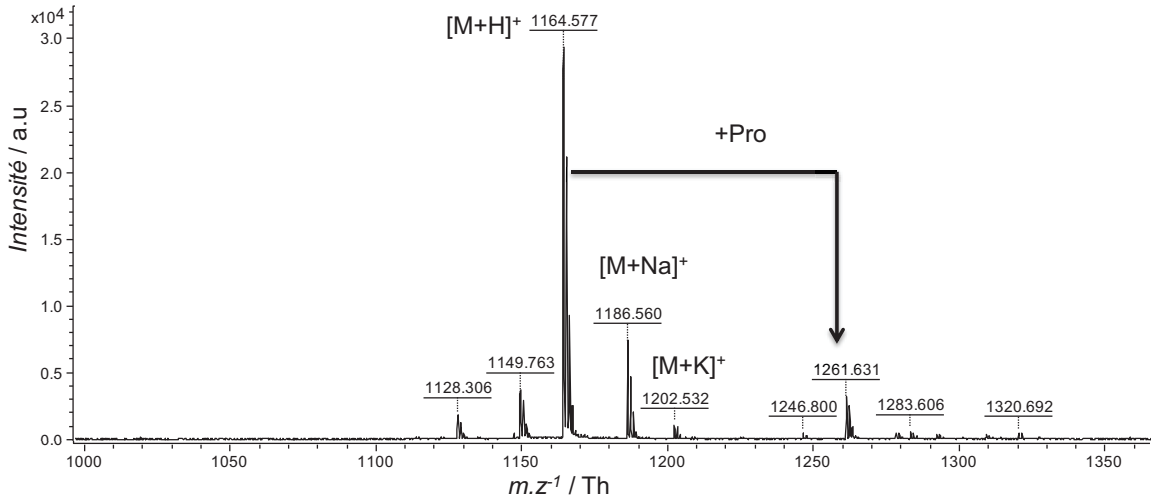
Spectre 24 : Spectre MALDI-ToF-MS du peptide MR 4 – AVP

II.D.2. MR 5 – Homo-HO-LVA



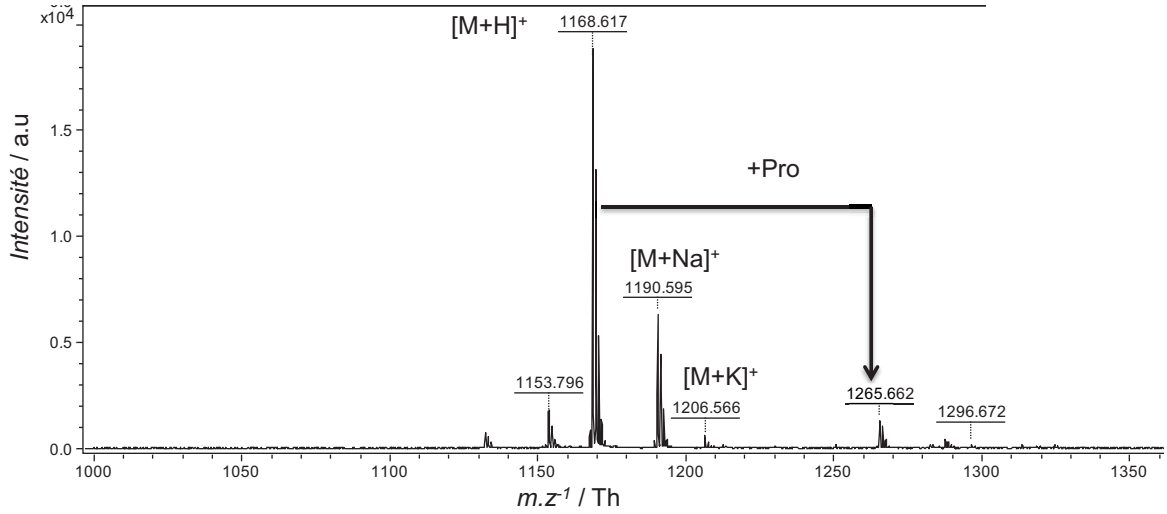
Spectre 25 : Spectre MALDI-ToF-MS du peptide MR 5 – Homo-HO-LVA

II.D.3. MR 6-D_0



Spectre 26 : Spectre MALDI-ToF-MS du peptide MR 6 – D_0

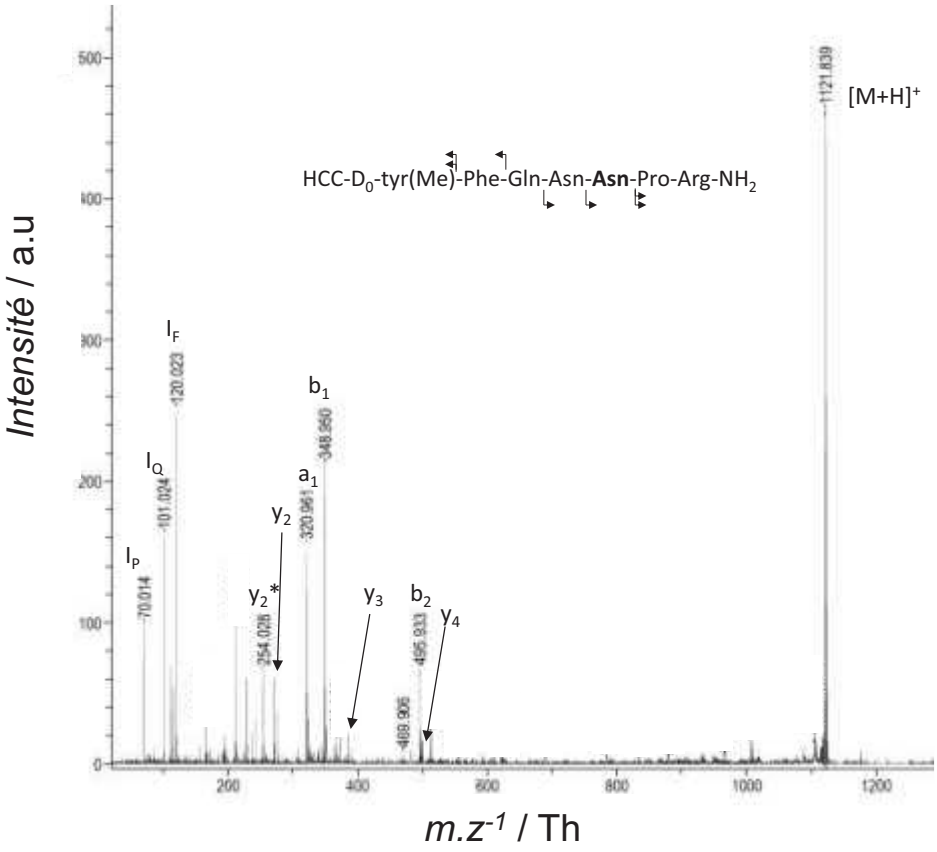
II.D.4. MR 6-D_4



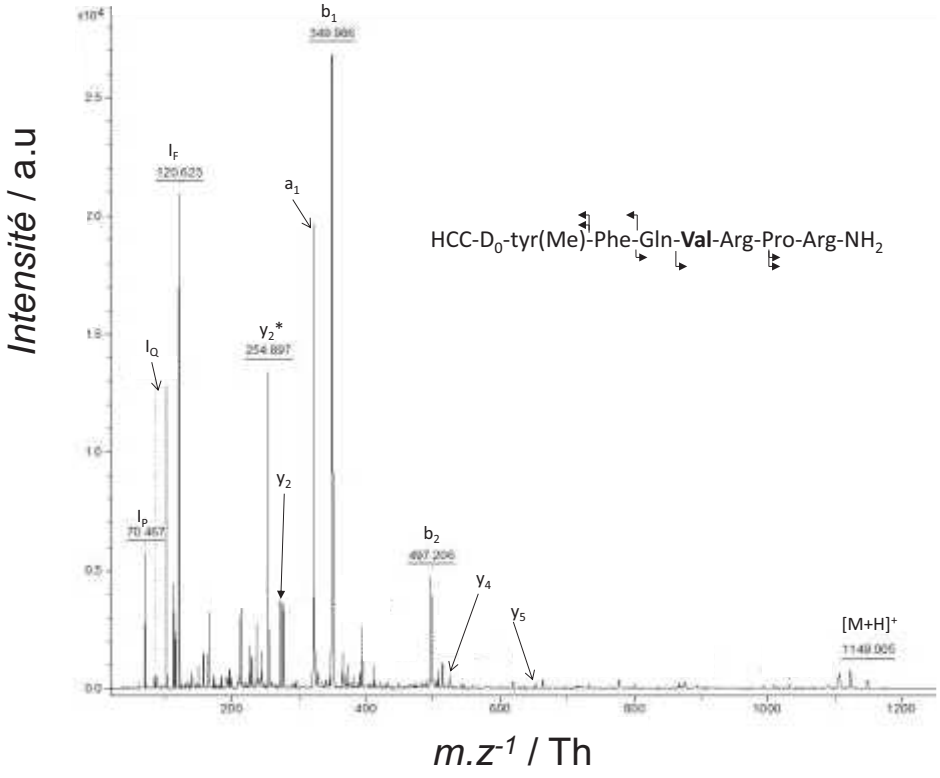
Spectre 27 : Spectre MALDI-ToF-MS du peptide MR 6 – D_4

II.E. Spectres MALDI-ToF/ToF des impuretés présentes dans les échantillons de MR 6-D_0 et MR 6-D_4

II.E.1. Impureté détectée à 1 121,8 Th

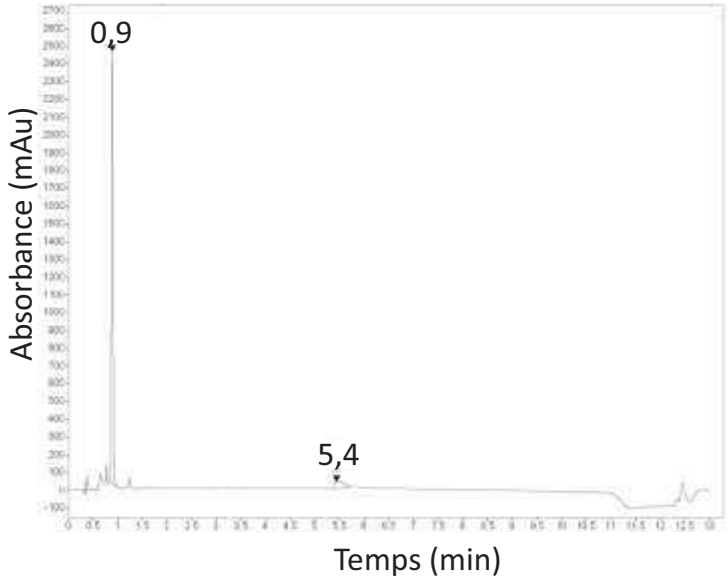


II.E.2. Impureté détectée à 1 149,8 Th



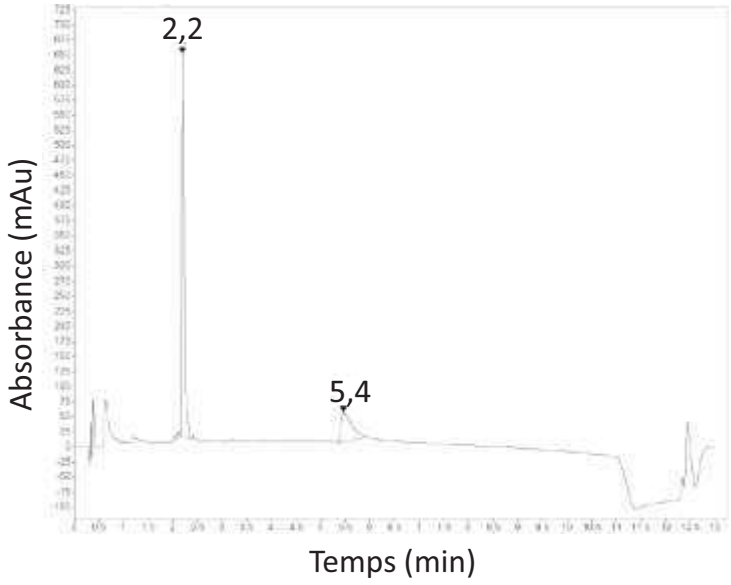
II.F. Chromatogrammes UV de contrôle d'acides aminés utilisés pour la synthèse de peptides

II.F.1. MR 4– AVP



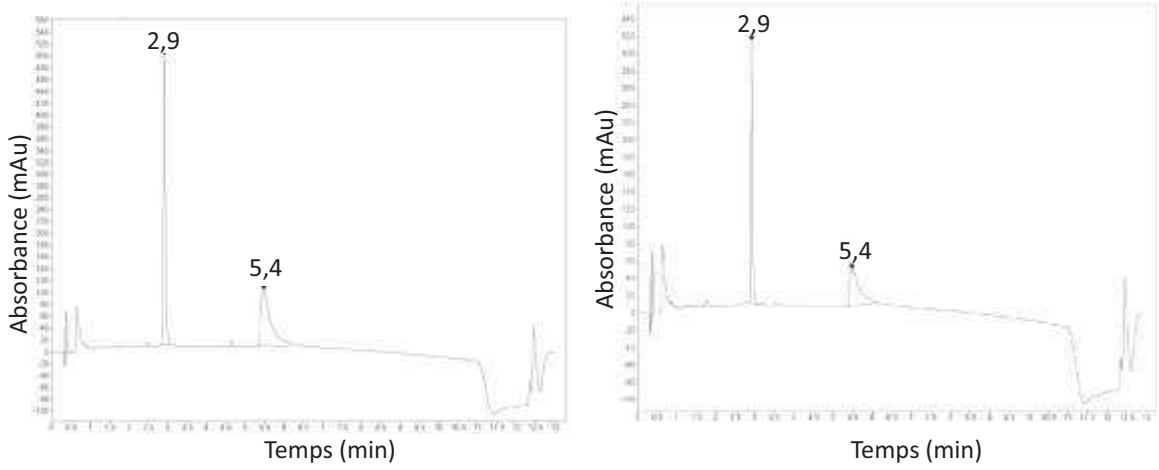
Chromatogramme 6 : Chromatogramme UV obtenu pour l'AVP dans le tampon de liaison qui contient de la BSA (bosse à 5,4 min)

II.F.2. MR 5– Homo-HO-LVA



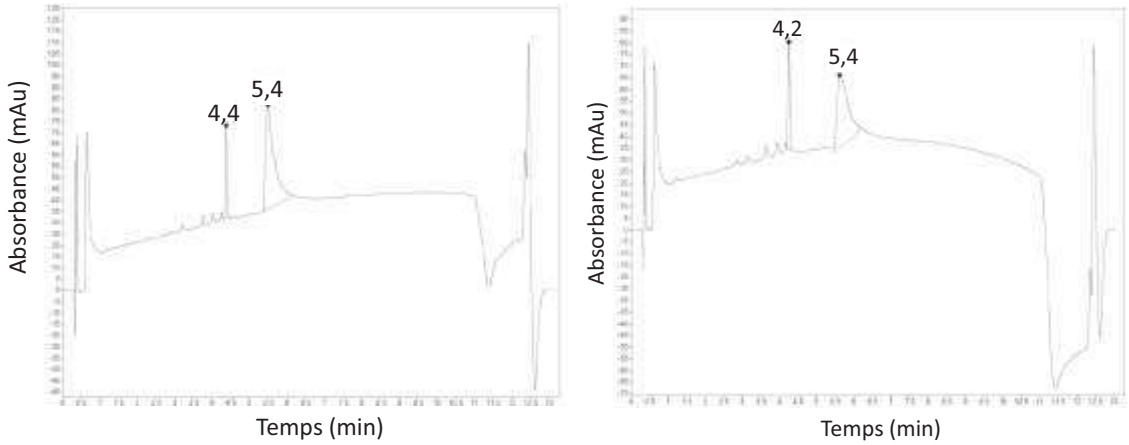
Chromatogramme 7 : Chromatogramme UV obtenu pour le peptide Homo-HO-LVA dans le tampon de liaison qui contient de la BSA (bosse à 5,4 min)

II.F.3. Peptides MR 6 – D_0 et MR 6 – D_4



Chromatogramme 8 : Chromatogramme UV obtenu pour les peptides MR 6-D_0 (à gauche) et MR 6-D_4 (à droite) dans le tampon de liaison qui contient de la BSA (bosse à 5,4 min)

II.F.4. Les peptides MR 10-D_0 et MR 10-D_4



Chromatogramme 9 : Chromatogrammes UV obtenu pour les peptides MR 10-D_0 (à gauche) et MR 10-D_4 (à droite) dans le tampon de liaison qui contient de la BSA (bosse à 5,4 min)

III. Modes opératoires détaillés des expériences de pharmacologie

III.A. Protocole commun

Préparation :

- Micro-tubes eppendorf de récupération de la solution avec peptides dissociés (Low binding) et d'incubation (polypropylène, stérilisés par autoclave).
- Tampon de lavage (à mettre au frigo à 4°C).
- Tampon de dissociation.
- Tampon de liaison (10.X, préparé à l'avance au congélateur).

Protocole :

- Pipetage des séries de ligand marqué, de compétiteur et de tampon.
- Dans un second temps, addition de la solution de protéines membranaires (110 µg/mL) à hauteur de 200 µl par tube à hémolyse.
- Incubation 60 min à 30°C avec agitation à 800 rpm.
- Arrêt manipulation : centrifugeuse 4°C, 15 000 rpm, 10 min. Mettre les micro-tubes sur glace à leur récupération.
- Elimination du surnageant.
- Ajouter d'1 mL de tampon BW 2 froid, puis centrifuger chaque gamme au complet (T = 4°C, 15 000 rpm, 10 min). Eliminer le tampon de lavage.
- Addition sur culot de 50 µl de Tampon « dissociation ».
- Agitation 10 min à 20 °C à 800 rpm, puis centrifugation (T = 4°C, 15 000 rpm, 10 min). Récupération de 40 µL de solution et conservation des micro-tubes au congélateur avant analyse.

Tampons :

Tampon de liaison (tampon BH, pH = 7,3) :

Pour 1L à 1.X ou 100mL à 10.X

	Masse à peser (g)
BSA (1mg/mL)	1
Tris 50 mmol.L^{-1} (Mw=121,1)	6,06
$MgCl_2.6H_2O$ 5 mmol.L^{-1} (Mw=203,3)	1,02
EDTA 2,5 mmol.L^{-1} (Mw=372,2)	0,93
Bacitracine 30 µg.mL^{-1}	0,03

Tampon de dissociation :

Pour 1L de solution 1.X

Volume (L)	
Eau	1
TFA	0,01

Tampon de lavage (tampon BW 2 froid, 4°C, pH = 7,3) :

Pour 1L à 1.X ou 100mL à 10.X

	Masse à peser (g)
Tris 50 mmol.L^{-1} (Mw=121,1)	6,06

III.B. Spécificité des expériences de saturation

X = V_{1A}-R, CCK_B-R

Y = CHO-V_{1A} (B Mouillac, transfectant stable) ; HEK-CCK_B-R (D. Fourmy, transfectant stable)

Saturation du ***X*** en 1 série T (liaison totale) et NS (liaison non spécifique) : 8 concentrations (voir tableaux) x 3 réplicats x 2 séries (T et NS), soit 48 micro-tubes eppendorf de 1,5 ml.

Conditions Expérimentales :

- Cellules ***Y***. Préparations membranaires conservées à -80°C.
- Micro-tubes eppendorf 1,5 ml / V incubation final : 250 µl.
- 25 µl de ligand marqué (L*) 10.X en série T et NS.
- 25 µl de tampon BH en série T // 25 µL de compétiteur (L) en excès (10.X) en série NS.
- 200 µl de préparation membranaire (***Y***).

Solution de compétiteur	**8**	**7**	**6**	**5**	**4**	**3**	**2**	**1**
Solution de membrane (110 µg.mL^{-1})	200 µL	200 µL	200 µL	200 µL	200 µL	200 µL	200 µL	200 µL
JMV4854 10.X (nmol.L^{-1})	60	30	15	10	8	5	2	0
Volume pour incubation	25 µL	25 µL	25 µL	25 µL	25 µL	25 µL	25 µL	-
Préparation de la solution	10 µL JMV4854 6 000 nM qsp 1 000 µl	150 µL sol n°**8** qsp 300 µl	75 µL sol n°**8** qsp 300 µl	50 µL sol n°**8** qsp 300 µl	40 µL sol n°**8** qsp 300 µl	25 µL sol n°**8** qsp 300 µl	10 µL sol n°**8** qsp 300 µl	- -
Buffer BH	25 µL	25 µL	25 µL	25 µL	25 µL	25 µL	25 µL	50 µL
AVP 10.X 10^{-4} mol.L^{-1}	-	-	-	-	-	-	-	-
V_{total}	250 µL	250 µL	250 µL	250 µL	250 µL	250 µL	250 µL	250 µL
Eppendorfs	1 2 3	4 5 6	7 8 9	10 11 12	13 14 15	16 17 18	19 20 21	22 23 24

Solution de compétiteur	**8**	**7**	**6**	**5**	**4**	**3**	**2**	**1**
Solution de membrane (110 µg.mL^{-1})	200 µL	200 µL	200 µL	200 µL	200 µL	200 µL	200 µL	200 µL
JMV4854 10.X (nmol.L^{-1})	60	30	15	10	8	5	2	0
Volume pour incubation	25 µL	25 µL	25 µL	25 µL	25 µL	25 µL	25 µL	-
Préparation de la solution	10 µL JMV4854 6 000 nM qsp 1 000 µl	150 µL sol n°**8** qsp 300 µl	75 µL sol n°**8** qsp 300 µl	50 µL sol n°**8** qsp 300 µl	40 µL sol n°**8** qsp 300 µl	25 µL sol n°**8** qsp 300 µl	10 µL sol n°**8** qsp 300 µl	- -
Buffer BH	-	-	-	-	-	-	-	25 µL
AVP 10.X 10^{-4} mol.L^{-1}	25 µL	25 µL	25 µL	25 µL	25 µL	25 µL	25 µL	25 µL
V_{total}	250 µL	250 µL	250 µL	250 µL	250 µL	250 µL	250 µL	250 µL
Eppendorfs	25 26 27	28 29 30	31 32 33	34 35 36	37 38 39	40 41 42	43 44 45	46 47 48

III.C. Spécificité des expériences de déplacement

X = V_{1A}-R, CCK_B-R

Y = CHO-V_{1A} (B Mouillac, transfectant stable) ; HEK-CCK_B-R (D. Fourmy, transfectant stable)

Expérience de compétition à l'équilibre sur ***X*** entre le ligand marqué (L*) à 0,25 $nmol.L^{-1}$ incubés et des concentrations croissantes de compétiteur (L, de 10^{-13} $mol.L^{-1}$ à 10^{-5} $mol.L^{-1}$), soit 48 micro-tubes eppendorf de 1,5 ml.

Conditions Expérimentales :

- Cellules ***Y***. Préparations membranaires conservées à -80°C.
- Micro-tubes eppendorf 1,5 ml / V incubation final : 250 µl
- 25 µl de ligand marqué (L*) 10.X.
- 25 µL de compétiteur (L) en concentrations croissantes (10.X).
- 200 µl de préparation membranaire (***Y***).

Solution de compétiteur	**16**	**15**	**14**	**13**	**12**	**11**	**10**	**9**
Solution de membrane (110 µg.mL^{-1})	200 µL	200 µL	200 µL	200 µL	200 µL	200 µL	200 µL	200 µL
Compétiteur 10.X (nmol.L^{-1})	1,00E-04	3,00E-05	1,00E-5	3,00E-6	1,00E-6	3,00E-07	1,00E-07	3,00E-08
Volume pour incubation	25 µL	25 µL	25 µL	25 µL	25 µL	25 µL	25 µL	25 µL
Préparation de la solution	40 µL SR121463 10^{-3} M qsp 400 µl	100 µL sol n°**16** qsp 300 µl	30 µL sol n°**16** qsp 300 µl	30 µL sol n°**15** qsp 300 µl	30 µL sol n°**14** qsp 300 µl	30 µL sol n°**13** qsp 300 µl	30 µL sol n°**12** qsp 300 µl	30 µL sol n°**11** qsp 300 µl
Ligand marqué (HCCA-D_0) 10.X 10^{-4} mol.L^{-1}	-	-	-	-	-	-	-	-
V_{total}	250 µL	250 µL	250 µL	250 µL	250 µL	250 µL	250 µL	250 µL
Eppendorfs	1 2 3	4 5 6	7 8 9	10 11 12	13 14 15	16 17 18	19 20 21	22 23 24

Sol n°	**8**	**7**	**6**	**5**	**4**	**3**	**2**	**1**
Solution de membrane (110 µg.mL^{-1})	200 µL	200 µL	200 µL	200 µL	200 µL	200 µL	200 µL	200 µL
Compétiteur 10.X (nmol.L^{-1})	1,00E-08	3,00E-09	1,00E-09	3,00E-10	1,00E-10	3,00E-11	1,00E-11	1,00E-12
Volume pour incubation	25 µL	25 µL	25 µL	25 µL	25 µL	25 µL	25 µL	25 µL
Préparation de la solution	30 µL sol n°**10** qsp 300 µl	30 µL sol n°**9** qsp 300 µl	30 µL sol n°**8** qsp 300 µl	30 µL sol n°**7** qsp 300 µl	30 µL sol n°**6** qsp 300 µl	30 µL sol n°**5** qsp 300 µl	30 µL sol n°**4** qsp 300 µl	30 µL sol n°**2** qsp 300 µl
Ligand marqué (HCCA-D_0) 10.X 10^{-4} mol.L^{-1}	25 µL	25 µL	25 µL	25 µL	25 µL	25 µL	25 µL	25 µL
V_{total}	250 µL	250 µL	250 µL	250 µL	250 µL	250 µL	250 µL	250 µL
Eppendorfs	25 26 27	28 29 30	31 32 33	34 35 36	37 38 39	40 41 42	43 44 45	46 47 48

Listes des figures, illustrations, équations, schémas réactionnels et tableaux

Liste des électrophérogrammes – Partie B – Travaux de thèse

Chapitre 2 : Le projet AVP/V_{1A}

ELECTROPHEROGRAMME 1 : ELECTROPHEROGRAMMES OBTENUS PAR EC-UV (ELECTROPHORESE CAPILLAIRE AVEC DETECTION UV). LE PEPTIDE MR 6-D_0 A ETE ANALYSE A DIFFERENTES VALEURS DE PH POUR OPTIMISER LA SEPARATION..... 237
ELECTROPHEROGRAMME 2 : ANALYSE ELECTROPHORETIQUE DU MR 6-D_0 ; 10 KV ; PH=3 ; 40 MIN..... 237
ELECTROPHEROGRAMME 3 : PROFILS ELECTROPHORETIQUES DU MR 6-D_0 ; 20 KV ; PH = 3 ; 40 MIN..... 238
ELECTROPHEROGRAMME 4 : PROFILS ELECTROPHORETIQUES DU MR 6-D_0; 30 KV ; PH = 3 ; 40 MIN 238
ELECTROPHEROGRAMME 5 : PROFILS ELECTROPHORETIQUES DU MR 6 – D_0 (A GAUCHE) ET DU MR 6 – D_4 (A DROITE); 10 KV ; PH = 3 ; 40 MIN..... 239
ELECTROPHEROGRAMME 6 : PROFILS ELECTROPHORETIQUES DU MR 6-D_0 (A GAUCHE) ET DU MR 6–D_4 (A DROITE) ; P = 0,5 PSI ; 10 KV ; PH = 3 ; 40 MIN..... 239

Liste des chromatogrammes – Partie B – Travaux de thèse

Chapitre 2 : Le projet AVP/V_{1A}

CHROMATOGRAMME 1 : CHROMATOGRAMME MRM DE SUIVI DE TRANSITION DU PEPTIDE MR 6-D_0 A UNE CONCENTRATION INJECTEE DE 100 µMOL.L^{-1}..... 307
CHROMATOGRAMME 2 : CHROMATOGRAMME MRM DE SUIVI DE TRANSITIONS DU PEPTIDE JMV4854 A UNE CONCENTRATION INJECTEE DE 10 µMOL.L^{-1}..... 307
CHROMATOGRAMME 3 : CHROMATOGRAMME MRM DE SUIVI DE TRANSITIONS DU PEPTIDE MR 6-D_0 A UNE CONCENTRATION INJECTEE DE 1 µMOL.L^{-1}..... 308

Chapitre 3 : Le projet CCKB/CCKB-R

CHROMATOGRAMME 4 : ZOOMS DE LA CHROMATOGRAPHIE PREPARATOIRE POUR ^{T}BOC-OIA/^{T}BOC-DIOIA 350
CHROMATOGRAMME 5 : ANALYSE HPLC-UV DE LA FRACTION SUPPOSEE PURE DE FMOC-KYN-OH ET IDENTIFICATION DES MASSES PRESENTES SOUS CHAQUE PIC..... 372

Liste des chromatogrammes – Partie D – Partie expérimentale

CHROMATOGRAMME 6 : CHROMATOGRAMME UV OBTENU POUR L'AVP DANS LE TAMPON DE LIAISON QUI CONTIENT DE LA BSA (BOSSE A 5,4 MIN) 430
CHROMATOGRAMME 7 : CHROMATOGRAMME UV OBTENU POUR LE PEPTIDE HOMO-HO-LVA DANS LE TAMPON DE LIAISON QUI CONTIENT DE LA BSA (BOSSE A 5,4 MIN) 431
CHROMATOGRAMME 8 : CHROMATOGRAMME UV OBTENU POUR LES PEPTIDES MR 6-D_0 (A GAUCHE) ET MR 6-D_4 (A DROITE) DANS LE TAMPON DE LIAISON QUI CONTIENT DE LA BSA (BOSSE A 5,4 MIN) 431
CHROMATOGRAMME 9 : CHROMATOGRAMMES UV OBTENU POUR LES PEPTIDES MR 10-D_0 (A GAUCHE) ET MR 10-D_4 (A DROITE) DANS LE TAMPON DE LIAISON QUI CONTIENT DE LA BSA (BOSSE A 5,4 MIN) 432

Liste des équations – Partie A – Contexte bibliographique

Chapitre 1 : La pharmacologie : présentation des RCPG, théorie de la liaison d'un ligand à son récepteur et approches actuelles pour le screening de récepteurs

Equation 1 : Relation de Cheng-Prusoff permettant le calcul de la constante de dissociation d'un ligand d'affinite inconnue envers un recepteur 45

Chapitre 3 : La spectrométrie de masse MALDI - Approche historique, fondamentale et appliquée

Equation 2 : Equation de la loi de Beer-Lambert adaptee a l'absorption totale d'energie par un chromophore de la couche superieure d'un depot moleculaire ou ε_N est le coefficient d'extinction molaire, E l'irradiance du laser consideree, t la duree de l'impulsion laser et N_A le nombre d'Avogadro 137
Equation 3 : Expression de la fluence laser « H » en fonction de la profondeur « z » et de l'energie absorbee par unite de volume « E_A » 141
Equation 4 : Energie cinetique acquise par les ions formes a partir d'une source MALDI et acceleres par une difference de potentiel U 153
Equation 5 : Equations donnant le temps d'arrivee de chaque ion au detecteur et la relation liant le rapport m/z caracteristique de chaque ion a son temps d'arrivee 153
Equation 6 : Relation permettant d'acceder a la constante de recombinaison ion-ion par effet tunnel dans le modele CPCMD. Cette constante varie en fonction d'un parametre de frequence a, d'un facteur de decroissance b lui-meme dependant de la barriere energetique ΔG de la reaction de recombinaison, d'une energie de reorganisation λ, de la distance intermoleculaire R et du facteur de Franck-Condon K_N 176
Equation 7 : Relation thermodynamique reliant l'enthalpie libre d'un complexe proteine-ligand a la concentration en agent denaturant correspondant au point d'inflexion de la courbe representant la difference de masse en fonction de la concentration en agent denaturant utilisee 187
Equation 8 : Relation thermodynamique pour le calcul des constantes de dissociation par la methode SUPREX ... 188

Liste des équations – Partie B – Travaux de thèse

Equation 9 : Calcul de l'incertitude sur la mesure d'une grandeur Y 278
Equation 10 : Calcul de la concentration d'echantillon par la methode de la dilution isotopique 280
Equation 11 : Calcul du coefficient de variation inter-condition 281
Equation 12 : Calcul du coefficient de variation intra-condition 281
Equation 13 : Calcul de l'intersection mathematique des coefficients de variation inter et intra-condition (a gauche) et du coefficient de variation total (a droite) 281
Equation 14 : Calcul du biais en pourcentage par rapport a la concentration reelle 281
Equation 15 : Expression de l'erreur sur la moyenne (SEM pour « Standard Error on Mean ») ou N represente la donnee dont l'erreur sur la moyenne est recherchee et n le nombre de mesures effectuees de cette donnee (temperature, quantite de matiere, concentration …) 291

Liste des figures – Partie A – Contexte bibliographique

Chapitre 1 : La pharmacologie : présentation des RCPG, théorie de la liaison d'un ligand à son récepteur et approches actuelles pour le screening de récepteurs

FIGURE 1 : REPRESENTATION SCHEMATIQUE D'UN RECEPTEUR COUPLE AUX PROTEINES G (RCPG). CE TYPE DE RECEPTEUR EST COMPOSE DE 7 DOMAINES TRANSMEMBRANAIRES (I, II, …., VII), DE 3 BOUCLES EXTRACELLULAIRES (E_1, E_2 ET E_3), DE 4 BOUCLES INTRACELLULAIRES (I_1, I_2, I_3 ET I_4) ET D'UN PONT DISULFURE ENTRE LES BOUCLES E_1 ET E_2. IL PRESENTE SON COTE N-TERMINAL AU MILIEU EXTRACELLULAIRE ET SON COTE N-TERMINAL AU MILIEU INTRACELLULAIRE 16
FIGURE 2 : VUE D'ENSEMBLE DES LIENS PHYLOGENETIQUES ENTRE LES CLASSES DE RCPG PARMI LESQUELLES LES 3 PRINCIPALES CLASSES DE RCPG (CLASSE A, CLASSE B, CLASSE C). CELLE-CI EST BASEE SUR L'ANALYSE DE GRAUL ET SADEE. LES FAMILLES DE RECEPTEURS PRESENTES CHEZ LES MAMMIFERES SONT SURLIGNEES EN BLEU 17
FIGURE 3 : REPRESENTATION PHYLOGENETIQUE DES RCPG HUMAINS DE CLASSE A. L'ANALYSE PHYLOGENETIQUE A ETE EFFECTUEE APRES ASSIGNATION DES HELICES TRANSMEMBRANAIRES ET ALIGNEMENT DES SEQUENCES DES RECEPTEURS, CE QUI PERMET DE DETERMINER DES DEGRES DE SIMILITUDE ENTRE LES RECEPTEURS : PLUS LES TRAITS A PARTIR DE LA LIGNE COURBE CENTRALE SONT PROCHES ENTRE EUX, PLUS LES SEQUENCES DES DEUX RCPG CORRESPONDANT SONT PROCHES. CETTE CLASSIFICATION EST PROPOSEE SELON LES TYPES DE LIGANDS CONNUS : EN JAUNE ORANGE LES RECEPTEURS OLFACTIFS, EN ROUGE LES RECEPTEURS A PETITES MOLECULES, EN CYAN LES RECEPTEURS PEPTIDIQUES ET LES RECEPTEURS ORPHELINS EN NOIR 18
FIGURE 4 : STRUCTURE DE LA RHODOPSINE OBTENUE PAR CRISTALLISATION ET COMPLEXEE AVEC L'ARRESTINE, UN REGULATEUR DE LA TRANSDUCTION DU SIGNAL 19
FIGURE 5 : STRUCTURE OBTENUE PAR CRISTALLISATION DU RECEPTEUR AU GLUCAGON MONTRANT LES CHAINES LATERALES DES ACIDES AMINES DU SITE DE LIAISON. LES RECEPTEURS DE CETTE CLASSE B ONT TOUS LA PARTICULARITE D'AVOIR UN DOMAINE N-TERMINAL PARTICULIEREMENT DEVELOPPE (HELICES INTRACELLULAIRES) 20
FIGURE 6 : REPRESENTATION PHYLOGENETIQUE DE L'IMPORTANTE DIVERSITE DE LA CLASSE B DES RCPG SUIVANT LE MEME PRINCIPE DE SIMILITUDE QUE LA FIGURE 3. LES RECEPTEURS HUMAINS SONT EN ROUGE, CEUX APPARTENANT A L'ESPECE *DROSOPHILIA* EN BLEU ET CEUX APPARTENANT A *C. ELEGANS* EN VERT. LE NOM DES GENES EST EDITE SELON LA NOMENCLATURE HUGO, LE SITE DE PUBLICATION CELERA ET LA BASE DE DONNEE « WORMBASE »" 21
FIGURE 7 : REPRESENTATION PHYLOGENETIQUE DES RCPG HUMAIN DE CLASSE C SUIVANT LE MEME PRINCIPE DE SIMILITUDE QUE LA FIGURE 3. LE LOGICIEL CLUSTALX VERSION 1.81 A ETE UTILISE POUR GENERER UN ALIGNEMENT DES SEQUENCES ET LA REPRESENTATION ARBORESCENTE A PU ETRE GENEREE GRACE AU LOGICIEL TREE VIEW VERSION 1.6.6. L'ECHELLE DES BRANCHES DE L'ARBRE SONT FONCTION DE LA SUBSTITUTION DES ACIDES AMINES 22
FIGURE 8 : STRUCTURES DE LA GUANOSINE TRIPHOSPHATE (GTP) AVEC SES TROIS GROUPEMENTS PHOSPHATE ET DE LA GUANOSINE DIPHOSPHATE (GDP) AVEC LES DEUX GROUPEMENTS PHOSPHATE EN NOIR 22
FIGURE 9 : STRUCTURE OBTENUE PAR CRISTALLISATION D'UNE PROTEINE G HETEROTRIMERIQUE AVEC LA SOUS-UNITE A A GAUCHE ET LE GDP LIE DANS SON SITE D'INTERACTION ; LE COMPLEXE ENTRE LES SOUS-UNITES Β ET Γ ENTRELACEES EST A DROITE. LA SOUS-UNITE Γ POSSEDE UNE ACCROCHE A LA MEMBRANE CELLULAIRE QUI PERMET AU COMPLEXE $G_{\beta/\gamma}$ DE RESTER ACCROCHE A LA MEMBRANE LORS DE LA SEPARATION DE LA SOUS UNITE A 23
FIGURE 10 : CYCLE D'ACTIVATION D'UNE PROTEINE G PAR UN RCPG A LA RECEPTION D'UN LIGAND (EN VERT). AU COURS DE LA PREMIERE ETAPE (1) LE LIGAND S'APPROCHE DU RECEPTEUR PUIS SE LIE A SE DERNIER A LA SECONDE ETAPE (2). CETTE LIAISON ENTRAINE UN « CHANGEMENT CONFORMATIONNEL » DU RCPG (3) QUI PERMET L'ECHANGE GDP/GTP AU NIVEAU DE LA SOUS-UNITE A DE LA PROTEINE G (4). CELA AMENE A UNE DISSOCIATION DE CETTE SOUS-UNITE DU COMPLEXE $G_{\beta/\gamma}$ (5) ET L'HYDROLYSE DE GTP EN GDP AU SEIN DE LA SOUS-UNITE A (6). CES DEUX ENTITES (G_A ET $G_{\beta/\gamma}$) VONT TRANSDUIRE LE SIGNAL EXTERIEUR ET PEUVENT ACTIVER DES SECONDS MESSAGERS 24
FIGURE 11 : ISOFORMES DES SOUS-UNITES A, Β ET Γ DES PROTEINES G ET EFFETS SUR DIFFERENTS EFFECTEURS (MESSAGERS SECONDS, CANAUX IONIQUES). LES EFFETS STIMULANTS SONT IDENTIFIES PAR DES « + » VERTS ET LES EFFETS INHIBITEURS PAR DES « - » ROUGES 26
FIGURE 12 : VOIE D'ACTION DE L'ADENYL-CYCLASE QUI TRANSFORME L'ATP EN AMPC, UN SECOND MESSAGER DANS LE CADRE DE LA TRANSDUCTION DU SIGNAL. CELUI-CI PEUT ENSUITE REAGIR, ENTRE AUTRE, AVEC UNE PROTEINE KINASE A POUR ENGENDRER DE MULTIPLES PHOSPHORYLATIONS PAR EXEMPLE. LE PYROPHOSPHATE ISSU DE LA DEGRADATION D'ATP EN AMPC EST ENSUITE A SON TOUR DEGRADE EN IONS PHOSPHATE 27
FIGURE 13 : STRUCTURE OBTENUE PAR CRISTALLISATION DE L'ADENYL-CYCLASE ACCROCHE A LA MEMBRANE CELLULAIRE DE HELICES A (A GAUCHE) ET DE LA SOUS-UNITE CATALYTIQUE DE LA PROTEINE KINASE A (A DROITE) COMPLEXE A UN INHIBITEUR DE LA PROTEINE, A DES IONS Mn^{2+} ET A L'ADENYLYLIMIDODIPHOSPHATE. LES STRUCTURES SONT REPRESENTEES AVEC LES CHAINES LATERALES DES RESIDUS IMPLIQUES DANS LES SITES DE LIAISON 27

FIGURE 14 : REPRESENTATION DE L'INFECTION D'UNE CELLULE PAR LE VIH. CELUI-CI RECONNAIT UNE CELLULE HOTE GRACE A LA MOLECULE CD4 ET A UN CO-RECEPTEUR (RECEPTEUR A CHIMIOKINES COMME CCR5)..... 29
FIGURE 15 : PREMIERE METHODE DE PREDICTION DE STRUCTURE DE RCPG : LA MODELISATION PAR HOMOLOGIE 30
FIGURE 16 : SECONDE METHODE DE PREDICTION DE STRUCTURE DE RCPG : LA METHODE DE GODDARD 31
FIGURE 17 : STRUCTURE CRISTALLOGRAPHIQUE HOMODIMERIQUE DU RECEPTEUR B_2-ADRENERGIQUE OBTENUE PAR CHEREZOV ET AL. EN 2007. LA PROTEINE A ETE OBTENUE AVEC DES LIPIDES (BUTANEDIOL) ET DU CHOLESTEROL COCRISTALLISES AINSI QUE LE CARAZOLOL, AGONISTE INVERSE PARTIEL DU RECEPTEUR (AU CENTRE DES 7 DTM POUR DOMAINE TRANSMEMBRANAIRE) 33
FIGURE 18 : FRISE CHRONOLOGIQUE RETRAÇANT LES PRINCIPALES DECOUVERTES ET AVANCEES DANS LE DOMAINE DES RCPG ET PLUS PARTICULIEREMENT DE L'ADOPTION DES RECEPTEURS ORPHELINS 36
FIGURE 19 : REPRESENTATION DES MESURES DE LIAISON TOTALE (EN HAUT) ET NON SPECIFIQUE (EN BAS) DANS LE CADRE DE L'EVALUATION D'UNE INTERACTION LIGAND/RECEPTEUR. DANS LE PREMIER CAS, LE LIGAND TRACEUR EST AJOUTE A DIFFERENTES CONCENTRATIONS TANDIS QUE DANS LE SECOND, UN LIGAND COMPETITEUR EST RAJOUTE POUR SATURER LE RECEPTEUR, DEPLACER LE LIGAND D'AFFINITE INCONNUE DE CE DERNIER ET MESURER LA LIAISON NON SPECIFIQUE DU LIGAND D'ETUDE SUR LE SUBSTRAT BIOLOGIQUE CHOISI..... 42
FIGURE 20 : EQUILIBRE DE DISSOCIATION D'UN COUPLE LIGAND (L) / RECEPTEUR (R). L'EQUILIBRE EST ATTEINT LORSQUE LES VITESSES DE DISSOCIATION ET D'ASSOCIATION ATTEIGNENT DES CONSTANTES AU TERME D'UN CERTAIN TEMPS D'INCUBATION..... 42
FIGURE 21 : DEMONSTRATION MATHEMATIQUE AMENANT A L'EXPRESSION DU NOMBRE DE SITES DE LIAISON OCCUPES EN FONCTION DU B_{MAX} (A), METTANT EN EVIDENCE LE FAIT QU'A DES CONCENTRATIONS EN LIGAND [L] INFINIES, LE NOMBRE DE SITES OCCUPES TENDRA VERS UNE QUANTITE MAXIMALE DE SITES DE LIAISONS EXPRIMEE PAR LE TERME B_{MAX}. ET DEMONSTRATION DE LA LINEARISATION DE SCATCHARD (B) EXPRIMANT LE RAPPORT DE CONCENTRATION EN LIGAND LIE SUR LA CONCENTRATION EN LIGAND LIBRE EN FONCTION DE LA CONCENTRATION EN LIGAND LIE 43
FIGURE 22 : REPRESENTATION GRAPHIQUE D'UNE EXPERIENCE DE SATURATION PAR MESURE DU LIGAND LIE (A GAUCHE) AVEC LE CALCUL DE LA LIAISON SPECIFIQUE SELON L'EQUATION : LIAISON TOTALE = LIAISON SPECIFIQUE + LIAISON NON SPECIFIQUE. LA REPRESENTATION DE SCATCHARD PERMET D'ACCEDER PRECISEMENT ET AISEMENT AUX GRANDEURS MESUREES. LE B_{MAX}, QUANTITE MAXIMALE DE SITES DE LIAISON POUR LE LIGAND, EST DETERMINE GRACE A LA COURBE DE LIAISON SPECIFIQUE OU EN PROLONGEANT LA LINEARISATION DE SCATCHARD ET EN CROISANT L'AXE DES ABSCISSES. D'UN AUTRE COTE, LA CONSTANTE DE DISSOCIATION K_D EST MESUREE A L'ABSCISSE CORRESPONDANT A LA MOITIE DU B_{MAX} OU BIEN GRACE A LA PENTE DE LA LINEARISATION DE SCATCHARD..... 44
FIGURE 23 : REPRESENTATION GRAPHIQUE D'UNE EXPERIENCE DE COMPETITION AVEC UN SEUL SITE D'AFFINITE A GAUCHE ET DEUX SITES D'AFFINITES A DROITE. DANS CHAQUE CAS L'ABSCISSE CORRESPONDANT A 50 % DE LA DIFFERENCE ENTRE DEUX PLATEAUX PERMET DE DETERMINER GRAPHIQUEMENT UNE VALEUR D'IC_{50} QUI SERA UTILISEE POUR CALCULER LA CONSTANTE DE DISSOCIATION K_i CORRESPONDANTE 45
FIGURE 24 : PRINCIPE GENERAL D'UNE EXPERIENCE DE CINETIQUE. LA QUANTITE DE LIGAND MESUREE (EN CONCENTRATION OU EN POURCENTAGE) EST TRACEE EN FONCTION DU TEMPS D'ASSOCIATION ET DE DISSOCIATION JUSQU'A ATTEINDRE UN PLATEAU. LE TRACE EN FONCTION DU TEMPS DES EQUATIONS Y_{ON} ET Y_{OFF} PERMET D'OBTENIR UNE DROITE ET LES CONSTANTES K_{OBS} ET K_{OFF} RESPECTIVEMENT (LES PENTES DES DROITES) AVANT DE POUVOIR ACCEDER A LA CONSTANTE K_{ON} 46
FIGURE 25 : STRUCTURE DE LA MATLALINE..... 49
FIGURE 26 : EXCITATION ET RELAXATION D'UN ELECTRON LORS DU PROCESSUS DE FLUORESCENCE PAR OPPOSITION AU PHENOMENE DE PHOSPHORESCENCE..... 50
FIGURE 27 : VISUALISATION DE CELLULES ENDOTHELIALES PAR FLUORESCENCE A TROIS CANAUX MARQUANT SPECIFIQUEMENT DES CONSTITUANTS CELLULAIRES (BLEU : NOYAUX ; ROUGE : ACTINE ; VERT : MICRO TUBULES)..... 51
FIGURE 28 : MECANISME DE TRANSMISSION D'ENERGIE PAR FRET POUR « FÖRSTER RESONANCE ENERGY TRANSFERT ». L'ENERGIE INCIDENTE A 337 NM EST ABSORBEE PAR LE FLUOROPHOR DONNEUR (LA FLUORESCEINE) PUIS EST TRANSMISE AU FLUOROCHROME RECEVEUR (LA TETRAMETHYLRHODAMINE) POUR ETRE REEMISE A 620 NM 52
FIGURE 29 : L'EMISSION D'ENERGIE A PARTIR D'UNE SOURCE D'EXCITATION (LAMPE, LASER) EST SUIVIE D'UN DELAI PREVU POUR PRENDRE EN COMPTE LA DECROISSANCE DES EMISSIONS DE FLUORESCENCE A COURTE DUREE DE VIE. LA LIGNE ROUGE CORRESPOND AU SIGNAL FRET A 665 NM, LA LIGNE VERTE AU SIGNAL DU DONNEUR LIBRE DE FLUORESCENCE A 620 NM, LA LIGNE GRISE A LA FLUORESCENCE DE LA MATRICE (I.E : LES COMPOSES PRESENTS DANS LE TAMPON) ET LA LIGNE BLEUE AU SIGNAL DE L'ACCEPTEUR LIBRE DE FLUORESCENCE 53

FIGURE 30 : STRUCTURE DU CRYPTATE D'EUROPIUM UTILISE EN HTRF. ON PARLE DE CRYPTATE CAR LE LANTHANIDE EST ENFERME DANS UNE CAGE A L'IMAGE D'UNE CRYPTE 54
FIGURE 31 : PRINCIPE DE L'EXPERIENCE DE SUIVI DE L'AMPC QUI CONSISTE EN LA MESURE DU SIGNAL FRET DU COMPLEXE AMPC-D2. DE L'AMPC LIEE A UN ANTICORPS PORTANT UN FLUOROCHROME DONNEUR SE COMPLEXE AVEC L'ACCEPTEUR D2 POUR EMETTRE LE SIGNAL FRET PAR EXCITATION DU PREMIER A 337 NM. AU FUR ET A MESURE QUE DE L'AMPC LIBRE EST PRODUITE PAR LA CASCADE REACTIONNELLE D'UN RCPG, CELLE-CI COMPLEXE L'ACCEPTEUR D2 CONDUISANT A LA DIMINUTION PUIS A L'ARRET DU SIGNAL FRET..... 54
FIGURE 32 : SCHEMA D'UNE PLAQUE A SPR. LA SURFACE METALLIQUE EST RECOUVERTE PAR UNE COUCHE DE DEXTRANE (UN EXOPOLYSACCHARIDE NATUREL) CAPABLE DE SE LIER AUX NH_2 TERMINAUX DES PROTEINES. UNE LUMIERE EST EMISE ET DIFFRACTEE PAR LE PRISME FRAPPANT SOUS DE MULTIPLES ANGLES LA SURFACE METALLIQUE. TOUS LES RAYONS DIFFRACTES SONT REFLECHIS PAR LA SURFACE METALLIQUE SAUF POUR L'ANGLE POUR LEQUEL LE METAL ABSORBERA LA RADIATION TRANSFORMEE EN ONDE PLASMONIQUE. CELA ENTRAINE UNE ABSENCE DE REFLEXION ET UNE FAIBLE INTENSITE SUR LE DETECTEUR. COMME L'ONDE SE DEPLACE A LA SURFACE DU METAL, N'IMPORTE QUEL CHANGEMENT DANS LA SURFACE FERA VARIER CET ANGLE 56

Chapitre 2 : La quantification par dilution isotopique de peptides

FIGURE 33 : REPRESENTATION SCHEMATIQUE DES STRATEGIES « BOTTOM-UP » (EN BAS), « MIDDLE-DOWN » (AU MILIEU) ET « TOP-DOWN » (EN HAUT). EN STRATEGIE « BOTTOM-UP » LES PROTEINES SONT DIGEREES PAR UNE ENZYME, LE PLUS SOUVENT AVEC DE LA TRYPSINE, POUR OBTENIR DES PEPTIDES PROTEOLYTIQUES TRES COURTS, C'EST-A-DIRE OBTENUS PAR LA COUPURE ENZYMATIQUE D'UNE PROTEINE. L'APPROCHE « MIDDLE-DOWN » SE SERT D'ENZYMES TYPE GLU-C OU ASP-N QUI MENENT A DES PEPTIDES PROTEOLYTIQUES DE PLUS GRANDE TAILLE TANDIS QUE L'APPROCHE « TOP-DOWN » SE SERT DES PROTEINES INTACTES 64
FIGURE 34 : ELUTION CHROMATOGRAPHIQUE (A GAUCHE) AVEC LES COURANTS D'IONS EXTRAITS EN BLEU ET ROUGE RESPECTIVEMENT D'UN PEPTIDE NATIF ET DE SON ANALOGUE MARQUE PAR UN ISOTOPE ET ANALYSE MS DE LA FRACTION DE COELUTION (A DROITE) DISCRIMINANT LES DEUX PEPTIDES..... 66
FIGURE 35 : QUANTIFICATION PAR LC-SRM SUR TRIPLE QUADRIPOLE D'UN PEPTIDE MARQUE EN C-TERMINAL. LES TRANSITIONS LES PLUS CARACTERISTIQUES ET INTENSES SONT DETERMINEES POUR UN PEPTIDE PROTEOTYPIQUE DONNE, DANS UN PREMIER TEMPS. LES VERSIONS NATIVES ET MARQUEES PAR UN ISOTOPE DU PEPTIDE AYANT UNE FORMULE BRUTE IDENTIQUE, AUX ISOTOPES PRES, ON OBSERVE LE DEPLACEMENT DE CERTAINS FRAGMENTS DU AU MARQUAGE ISOTOPIQUE. LA QUANTIFICATION EST EFFECTUEE EN SUIVANT LA TRANSITION DETERMINEE POUR CHACUN DES PEPTIDES (ENDOGENE/MARQUE) ET EN COMPARANT LES SIGNAUX DES COURANTS IONIQUES EXTRAITS (XIC POUR « EXTRACTED IONIC CURRENT ») LIES AUX TRANSITIONS CORRESPONDANTES 67
FIGURE 36 : REPRESENTATION DES GRANDES ETAPES A SUIVRE POUR UNE APPROCHE HOLISTIQUE EN VUE DE LA VALIDATION D'UNE METHODOLOGIE ANALYTIQUE..... 69
FIGURE 37 : PROTOCOLES USUELS EN SPECTROMETRIE DE MASSE QUANTITATIVE. LES RECTANGLES POURPRES ET TURQUOISES REPRESENTENT DEUX CONDITIONS EXPERIMENTALES (ECHANTILLON CONTROLE, ECHANTILLON PERTURBE). LES LIGNES HORIZONTALES REPRESENTENT L'ETAPE DE RASSEMBLEMENT DES ECHANTILLONS..... 71
FIGURE 38 : DESCRIPTION SCHEMATIQUE DU PROCESSUS QUI AMENE DE LA DECOUVERTE D'UN BIOMARQUEUR A UN TEST DE DIAGNOSTIC APPROUVE PAR LA FDA. LES ETUDES DE QUALITE PEUVENT DEMARRER DES LE PASSAGE DE LA PREMIERE ETAPE (SUITE A LA DECOUVERTE) 72
FIGURE 39 : EXEMPLE DE DIAGRAMME DE FOREST A PROPOS DE L'ETUDE DES EFFETS DE LA PROPHYLAXIE ANTIBIOTIQUE SUR LA MORTALITE. « RR » CORRESPOND AU RISQUE RELATIF, N CORRESPOND AUX SUJETS D'ETUDES SANS EFFET ET N AU NOMBRE TOTAL DE SUJETS D'ETUDE 75
FIGURE 40 : EXEMPLE DE DIAGRAMME DE FUNNEL QUI MONTRE L'ABSENCE DE BIAIS DE PUBLICATION. CHAQUE POINT REPRESENTE UNE ETUDE, C'EST-A-DIRE LA MESURE DE L'EFFET D'UN CANDIDAT MEDICAMENT PAR EXEMPLE, L'AXE DES Y REPRESENTE LA TAILLE DE L'ETUDE (LE NOMBRE DE SUJETS D'ETUDE) TANDIS QUE L'AXE DES X MONTRE LES RESULTATS DE L'ETUDE (LA MESURE DE L'EFFET MOYEN DU CANDIDAT MEDICAMENT) 76

FIGURE 41 : SPECTRES DE MASSES DE DEUX FAMILLES DE PEPTIDES A FORTE MASSE (SUPERIEUR A 4 000 TH, A GAUCHE) QUI NECESSITE UN NOMBRE IMPORTANT D'ISOTOPES LOURDS INCORPORES POUR EVITER LE RECOUVREMENT SPECTRAL ET UN SECONDE FAMILLE DE PEPTIDES DE PLUS FAIBLE MASSE (≈ 1 000 TH ; A DROITE) QUI NECESSITE UN PLUS FAIBLE NOMBRE D'ISOTOPES LOURDS... 78
FIGURE 42 : SCHEMA DESCRIPTIF DE L'ETAPE MUDPIT ILLUSTRANT LE PRINCIPE DE « SHOTGUN PROTEOMIC ». DANS UN PREMIER TEMPS, UN MELANGE COMPLEXE DE PEPTIDES PROTEOLYTIQUES EST CHARGE SUR UNE COLONNE BIPHASIQUE SCX/RP (POUR « STRONG CATION EXCHANGE » ET « REVERSED PHASE »), EN L'OCCURRENCE UN MELANGE COMPLEXE ISSU D'UN DIGESTAT TRYPSIQUE DE PROTEOME DE *S. CEREVISIAE*. PAR LA SUITE, LA COLONNE EST MISE EN PLACE DANS LE SYSTEME D'ELUTION. APRES UN EQUILIBRAGE DE LA COLONNE, UN GRADIENT SALIN CONTENANT DU NH_4Ac A 250 MM QUI EST UTILISE A DIFFERENTS POURCENTAGES (DE 10, 15, 20, 30, 40 …., 100 %) PERMET DE DEPLACER UNE PARTIE DES PEPTIDES DE LA ZONE SCX A LA ZONE RP. ENFIN, APRES UNE ETAPE DE LAVAGE DE LA COLONNE POUR ELIMINER LES SELS, L'ELUTION CHROMATOGRAPHIQUE EST OPEREE ET LES PEPTIDES ANALYSES PAR MS/MS 84
FIGURE 43 : STRUCTURE CHIMIQUES D'ELEMENTS UTILISES POUR LE MARQUAGE PHOTOAFFIN DE PROTEINES. EN HAUT DIFFERENTES DIAZIRINES, EN BAS UNE STRUCTURE DE PHENYLAZIDE QUI VONT SE LIER PAR PHOTOREACTION A UN SITE DE PROTEINE PIEGEE PAR AFFINITE ENVERS LE SITE REACTIF DU MARQUEUR PAL 86
FIGURE 44 : STRUCTURE DU REACTIF PHOTOAFFIN MARQUE ISOTOPIQUEMENT : TIP POUR TARGET IDENTIFICATION PROBE 87
FIGURE 45 : STRATEGIE POUR L'ANALYSE D'INTERACTIONS PROTEINE-LIGAND VIA UN MARQUAGE PHOTOAFFIN PAR UN MELANGE 1:1 DE MARQUEUR D_0 ET D_{11} POUR L'ETUDE DE L'INTERACTION CYPA-CSA (CYCLOSPORINE A ET CYCLOPHILINE A)..... 88
FIGURE 46 : STRUCTURE ET REACTIVITE D'UN REACTIF ICAT 89
FIGURE 47 : PROTOCOLE OPERATOIRE TYPE POUR LA METHODOLOGIE ICAT 90
FIGURE 48 : STRUCTURE DU MARQUEUR CICAT AVEC LIEN ACIDOLABILE' 91
FIGURE 49 : STRUCTURE CHIMIQUE DU MARQUEUR SP_2ICAT (POUR « SOLIDE PHASE PHOTOCLEAVABLE ISOTOPE-CODED AFFINITY TAG ») ET CONDITIONS DE PHOTOLYSE. CE MARQUEUR A ETE FIXE SUR UN SUPPORT SOLIDE POUR ENSUITE ETRE COUPLE AUX CYSTEINES. LE MARQUEUR COMPREND UNE LEUCINE SOUS FORME ISOTOPIQUEMENT LEGERE OU LOURDE POUR LA QUANTIFICATION PAR SID 92
FIGURE 50 : STRUCTURE DES MARQUEURS MECAT (A GAUCHE) POUVANT ACCUEILLIR UN BRAS ESPACEUR ET UN FRAGMENT BIOTINE DANS LE GROUPE « R » ET ECAT (A DROITE). CEUX-CI SE COUPLENT AUX PEPTIDES PROTEOLYTIQUES SUR LEUR CHAINE LATERALE PAR LEUR GROUPEMENT MALEIMIDE OU A-HALOGENE. LES SUBSTITUTIONS POSSIBLES SUR LE MARQUEUR MECAT LUI PERMETTENT DES MODIFICATIONS SUPPLEMENTAIRES POUR FACILITER LA PURIFICATION PAR AFFINITE 93
FIGURE 51 : REACTION DE GUANIDINATION D'UN RESIDU LYSINE. LA GUANIDINATION PERMET DE CONVERTIR DE FAÇON SELECTIVE LES RESIDUS LYSINE LES CONVERTISSANT EN HOMOARGININE 93
FIGURE 52 : DIFFERENCES DE MASSES OBSERVEES ENTRE LE PEPTIDE MARQUE ET NON MARQUE : 42 TH SUR L'ION MONOCHARGE ET 21 TH SUR L'ION DICHARGE 94
FIGURE 53 : PROTOCOLE DE COMPARAISON D'ECHANTILLONS. CELUI-CI DEMARRE PAR LA DIGESTION TRYPSIQUE DES DEUX ECHANTILLONS SUIVIT DE LA DERIVATION DE L'UN DES DEUX PAR L'*O*-METHYLUREE. LES FRACTIONS SONT COMBINEES ET DESSALEES AVANT D'ETRE ELUEES ET ANALYSEES PAR LC-MS..... 94
FIGURE 54 : LES PROTEINES SONT DANS UN PREMIER TEMPS DIGEREES PAR LA TRYPSINE POUR GENERER DES PEPTIDES AVEC UNE LYSINE OU UNE ARGININE EN N-TERMINAL. LES PEPTIDES PROTEOLYTIQUES PRESENTANT UNE LYSINE SONT PAR LA SUITE, POUR UN ALIQUOT, GUANIDINES AVANT ELUTION CHROMATOGRAPHIQUE. LES DEUX FRACTIONS SONT ENSUITE RASSEMBLEES AVANT D'ETRE ELUEES ET ANALYSEES EN MS/MS PAR CID. CELA PERMET DE CARACTERISER LA SEQUENCE PEPTIDIQUE EN REPERANT LES PAIRES D'IONS AVEC UN INCREMENT DE MASSE PARMI LA SERIE D'IONS Y DANS LES DEUX FRACTIONS CHROMATOGRAPHIQUES SEPAREES..... 95
FIGURE 55 : DEMONSTRATION DE LA REPRODUCTIBILITE DE LA TECHNIQUE MCAT. DES EXTRAITS DE LEVURE DIGERES PAR ACTION DE LA TRYPSINE ONT ETE CARACTERISES SELON LE PROTOCOLE ETABLI EN TRIPLICA (CHAQUE BATONNET REPRESENTANT UNE MESURE) 95
FIGURE 56 : EVALUATION DE L'ETAT D'OXYDATION DE PROTEINES CONTENANT DES THIOLS AVEC UN MARQUEUR ICAT (METHODOLOGIE OXICAT) 96
FIGURE 57 : REPRESENTATION DU FRAGMENT DTPA COUPLE A UN PEPTIDE PAR UNE LIAISON AMIDE ET CHELATE A UNE TERRE RARE DE LA FAMILLE DES LANTHANIDES. LORSQUE L'YTTRIUM (Y) ET DE LE TERBIUM (TB) SONT UTILISES EN 2PLEX, LA DIFFERENCE DE MASSE ATTEINT 70 TH..... 97

FIGURE 58 : REPRESENTATION DU MARQUEUR MEC DANS SA VERSION 4PLEX PUBLIEE PAR WANG ET AL. EN 2012 AVEC DES DIFFERENCES DE 6, 10, ET 16 TH PAR RAPPORT AU TERBIUM 98
FIGURE 59 : STRUCTURES DES TMT DE 1ERE ET 2E GENERATION DEVELOPPES PAR THOMPSON ET AL. CEUX-CI PRESENTENT DEUX (1ERE GENERATION) OU TROIS (2E GENERATION) ZONES DISTINCTES. LES FRAGMENTS OBTENUS SONT REPRESENTES PAR LA STRUCTURE EN BAS 99
FIGURE 60 : STRUCTURE LEGENDEE DES TMT COMMERCIALISES PAR THERMOFISCHER SCIENTIFIC AVEC LES LIAISONS CASSEES. LES TMT10PLEX SONT DISTINGUABLES PAR DES ANALYSEURS DE HAUTE RESOLUTION ENTRE LES MARQUAGES ISOBARES AU ^{13}C ET A ^{15}N..... 100
FIGURE 61 : STRUCTURE DES MARQUEURS ISOBARES POUR LA TECHNIQUE ITRAQ : ITRAQ4PLEX EN HAUT ET ITRAQ8PLEX EN BAS 101
FIGURE 62 : ETAPES CLES DE LA STRATEGIE ITRAQ. LES 4 MARQUEURS ISOBARES SONT COUPLES SUR LEUR SYSTEME AVANT ANALYSE PAR FRAGMENTATION POUR D'UNE PART, IDENTIFIER LES PEPTIDES GRACE A LEURS IONS DE SEQUENCE ET LES QUANTIFIER GRACE AUX QUATRE SONDES DES MARQUEURS D'AUTRE PART 102
FIGURE 63 : STRUCTURE DE LA 2-METHOXY-4,5-DIHYDRO-1*H*-IMIDAZOLE (MDHI) UTILISEE POUR MARQUER LE COTE C-TERMINAL DE PEPTIDES PROTEOLYTIQUES ET DE L'ANHYDRIDE SUCCINIQUE (SA) UTILISE EN N-TERMINAL 103
FIGURE 64 : PROTOCOLE POUR L'APPLICATION DE LA TECHNIQUE IPTL DANS LEQUEL DEUX PROTEINES PROVENANT DE DEUX ECHANTILLONS A COMPARER SONT DIGEREES PAR LYS-C PRODUISANT DES PEPTIDES PROTEOLYTIQUES AVEC UNE LYSINE EN C-TERMINAL. PAR LA SUITE LES PEPTIDES SONT MARQUES PAR MDHI (OU SA VERSION DEUTEREE). LA GENERATION DES PEPTIDES ISOBARES SE FAIT PAR DERIVATION CROISEE DE L'ACIDE SUCCINIQUE HYDROGENE OU DEUTERE AVEC, RESPECTIVEMENT, LA MDHI DEUTEREE OU HYDROGENEE. LES PEPTIDES ISOBARES SONT DETECTES EN MS ET QUANTIFIES EN MODE MS/MS GRACE AUX SERIES D'IONS B ET Y SEPARES DE 4 TH 104
FIGURE 65 : REACTION DE FORMATION DIMETHYLATION DES CHAINES LATERALES DE LYSINE POUR OBTENIR EN C-TER ET N-TER D'UN PEPTIDE LES COMBINAISONS LEGER/LOURD, INTERMEDIAIRE/INTERMEDIAIRE, LOURD/LEGER..... 105
FIGURE 66 : STRUCTURE CHIMIQUES DES MARQEURS MTRAQ® ET FRAGMENTS OBTENUS EN MODE MS/MS 106
FIGURE 67 : PROTOCOLE GENERAL MTRAQ®. LES ECHANTILLONS BIOLOGIQUES SONT PREPARES ET DIGERES EN PARALLELE. PUIS UN ALIQUOT DE CHAQUE ECHANTILLON EST PRELEVE POUR ETRE MELANGES AVEC LES AUTRES. LE MARQUEUR MTRAQ® Δ8 EST ENSUITE COUPLE AUX PEPTIDES CONTENUS DANS CE MELANGE TANDIS QUE LES DIFFERENTS ECHANTILLONS SONT MARQUES AVEC LES MOLECULES MTRAQ® Δ0 ET Δ4. ENFIN, UN ECHANTILLON DE Δ0, DE Δ4 ET DU MELANGE Δ8 SONT RASSEMBLES AVEC UN RAPPORT 1:1:1 AVANT D'ETRE ANALYSES PAR MRM. PAR LA SUITE LES TRANSITIONS PEUVENT ETRE COMPAREES A L'ETALON INTERNE EN Δ8 ET ENTRE EUX GRACE A CE DERNIER, COMMUN A TOUTES LES ANALYSES..... 107
FIGURE 68 : DANS LE CADRE D'UNE EXPERIENCE ATRAQ®, L'ECHANTILLON PEPTIDIQUE DOIT D'ABORD ETRE PURIFIE DE TOUTE PROTEINE EN AJOUTANT UNE SOLUTION D'ACIDE SULFOSALICYLIQUE QUI PERMET DE FAIRE PRECIPITER CES DERNIERES AVANT DE LES MARQUER AVEC LES DEUX MOLECULES ATRAQ®. UN MELANGE DES DEUX ECHANTILLONS DOIT ETRE EFFECTUE AVANT ANALYSE PAR LC-MS/MS POUR POUVOIR COMPARER LES INTENSITES DES FRAGMENTS SUR UN TRIPLE QUADRIPOLE OU UN QTRAP EN MODE MRM 107
FIGURE 69 : CHROMATOGRAMME ILLUSTRANT LA CAPACITE D'ANALYSE AVEC DES REACTIFS ATRAQ SUR 44 ACIDES AMINES, PETITES MOLECULES ET PROTEINES EN LC-MS/MS MODE MRM SUR UNE ELUTION DE 18 MINUTES 108
FIGURE 70 : PROTOCOLE GENERIQUE POUR L'ANALYSE D'ACIDES AMINES (AAA) SE SERVANT DES MARQUEURS ATRAQ® 109
FIGURE 71 : LES PEPTIDES AQUA POUR « ABSOLUTE QUANTIFICATION » SONT DES COPIES DE PEPTIDES PROTEOTYPIQUES DE LA PROTEINE CIBLE QUI SONT SYNTHETISES ET MARQUES PAR UN ISOTOPE. ILS SONT AJOUTES A L'ECHANTILLON AVANT L'ANALYSE LC-MS 110
FIGURE 72 : STRUCTURE TYPIQUE D'UN MARQUEUR IDBEST 113
FIGURE 73 : STRATEGIES DE DILUTION ISOTOPIQUE POUR DE LA QUANTIFICATION DE PROTEINES PAR SPECTROMETRIE DE MASSE. IL EXISTE TROIS MODES DE QUANTIFICATION DE PROTEINES SUIVANT UNE APPROCHE « BOTTOM – UP » DANS UN FLUIDE BIOLOGIQUE PAR MARQUAGE METABOLIQUE, DONT DEUX SONT PRESENTEES ICI : A- PSAQ POUR « PROTEIN STANDARD ABSOLUTE QUANTIFICATION », IL S'AGIT D'UNE VERSION DE LA PROTEINE CIBLE MARQUEE PAR UN ISOTOPE ET AJOUTEE DIRECTEMENT A L'ECHANTILLON. B- QCONCAT POUR « QUANTIFICATION CONCATAMER », IL S'AGIT D'UNE PROTEINE CHIMERIQUE QUI CONTIENT UN OU PLUSIEURS PEPTIDES PROTEOTYPIQUES DE LA PROTEINE CIBLE MARQUES PAR DES ISOTOPES.

Le peptide concatene est ajoute avant l'etape de digestion pour que l'(les)etalon(s) soit(ent) relargue(s) dans l'echantillon 117
Figure 74 : Quantification de la SEA (pour « Staphylococcal Enterotoxin A ») a partir du chromatogramme des ions extraits pour chaque paire des deux peptides selectionnes pour le suivi en LC-MS par MRM. Le graphique represente les quantites estimees de SEA en fonction des quantites ajoutees 119
Figure 75 : Protocole operatoire utilise pour demontrer la compatibilite de la strategie PSAQ avec l'immunoelimination. Pour cela la SEA a ete ajoutee avec une quantite connue d'etalon PSAQ dans des echantillons avant de subir l'immunoelimination 120
Figure 76 : Representation des deux approches principales en proteomique label-free. La quantification par mesure d'aire est effectuee au niveau MS tandis que la MS/MS sert a l'identification des peptides dont l'abondance est modifiee entre les differents echantillons. Le decompte spectral, quant a lui, quantifie et identifie les peptides de maniere simultanee au niveau MS/MS 123

Chapitre 3 : La spectrométrie de masse MALDI - Approche historique, fondamentale et appliquée

Figure 77 : Chronologie non exhaustive de l'evolution historique des techniques d'ionisation 138
Figure 78 : Premieres matrices utilisees lors du developpement de la technique MALDI avec leur apparition chronologique 139
Figure 79 : Schema d'une source MALDI avec le laser incident focalise par des lentilles et envoye sur la cible par un miroir. Le support des depots est a un potentiel V et la sortie de la source est reliee a la terre 140
Figure 80 : Presentation des differents lasers existant. Les plus couramment utilises en MALDI sont les lasers UV de type Nd:YAG et a azote 141
Figure 81 : Cliches a haute vitesse de nuages de particules generes en IR-MALDI, d'une part avec un laser OPO (pour « Optical Parametric Oscillator ») et une impulsion de 6 ns (a gauche), d'autre part avec un laser Er:YAG (pour « Erbium-doped Yttrium Aluminium Garnet » Er:$Y_3Al_5O_{12}$) et une impulsion de 100 ns. Les deux lasers operent a 2,94 µm avec du glycerol en tant que matrice, une resolution temporelle de 8 ns et une resolution spatiale de 4 µm. Les trois premiers cliches montrent un gradient de composes qui modifient l'indice de refraction du nuage de particules. Le quatrieme cliche represente l'emission des particules dans le nuage par diffraction de la lumiere a 90 ° 142
Figure 82 : Cliches a haute vitesse de nuages de particules generes en UV-MALDI avec un laser Nd:YAG (pour « Neodynium-doped Yttrium Aluminium Garnet » Nd:$Y_3Al_5O_{12}$) a 266 nm et a frequence quadruplee avec une impulsion laser de 8 ns, une resolution temporelle de 8 ns et du nitrobenzylalcool comme matrice. Le cliche de gauche correspond a un delai de 45 ns apres le tir laser tandis que le cliche de droite correspond a l'image du nuage de particule 311 ns apres l'exposition au laser par diffraction de la lumiere a 90° 143
Figure 83 : Representation de la densite de charges durant l'ionisation MALDI ou la courbe bleue represente une impulsion laser, la courbe verte represente la population de molecules en etat excite et la courbe rouge represente la densite relative du nuage de particules en expansion en fonction du temps. La ligne pointillee represente son evolution lors d'une phase « d'explosion » (l'ablation de matiere) tandis que la ligne continue represente une phase d'evaporation douce (la desorption) 144
Figure 84 : Illustration des phases de desorption et d'explosion en MALDI avec la representation de la hauteur par rapport au temps calculee par dynamique moleculaire pour deux energies d'impulsion laser et une coloration en fonction de la pression. A gauche, une faible energie mene a une expansion et une evaporation douce a partir de la surface du depot ; tandis qu'une forte energie d'impulsion laser entraine une phase explosive et l'ejection de « clusters » dans les couches superieures. De plus la vague de pression apres rebond sur la plaque de depot, est suffisamment puissante pour casser le depot froid jusqu'a une profondeur importante, ce qui entraine l'eclatement en fines couches 145
Figure 85 : Representation de la phase d'explosion en MALDI par des cliches lateraux de simulation en dynamique moleculaire en fonction du temps (Cliche 1, 2 puis 3). Le laser incident provient de la droite. Durant le

RECHAUFFEMENT DU DEPOT ET SON EXPANSION SOUS L'EFFET DE LA VAGUE DE COMPRESSION ENGENDREE PAR LE LASER, LES MOLECULES COMMENCENT PAR SE DESORBER DOUCEMENT (CLICHE 1). PUIS LA NUCLEATION PROFONDE SOUS HAUTE PRESSION DANS LES COUCHES INFERIEURES DU DEPOT DEBUTE (CLICHE 2). ENFIN, LE CLICHE 3 MONTRE L'EFFET DE LA VAGUE D'EXPANSION (APRES REBOND) ET LA FORMATION DE BULLES DE VAPEUR DENSES SOUS LA SURFACE QUI MARQUE LE DEBUT DE LA PHASE D'ABLATION 146

FIGURE 86 : PRINCIPE DE L'ENDUCTION CENTRIFUGE OU UNE GOUTTE DE SOLUTION CONTENANT LA MATRICE ET L'ANALYTE PRE MELANGES EST DEPOSEE SUR UN SUPPORT (1) MIS EN ROTATION (2) POUR UNIFORMEMENT REPARTIR LA GOUTTE SUR L'ENSEMBLE DU DEPOT (3) AVANT ANALYSE (4) 152

FIGURE 87 : SCHEMA DU DEPOT D'UN MELANGE MATRICE/ANALYTE PAR ELECTROSPRAY QUI PERMET UNE REPRODUCTIBILITE AMELIOREE ET UNE INTENSITE DE SIGNAL ACCRUE EN MALDI 152

FIGURE 88 : SCHEMA DECRIVANT LE PRINCIPE DE FONCTIONNEMENT DU MALDI-TOF EN MODE AXIAL 154

FIGURE 89 : SCHEMA D'UN INSTRUMENT DE TYPE MALDI-TOF LINEAIRE COMBINE A UN REFLECTRON. L'APPAREIL EST CONSTITUE DE DEUX ZONES DE TRANSFERT D'IONS SANS CHAMP, LA PREMIERE A DESTINATION DU 1^{ER} DETECTEUR ET LA SECONDE LORSQUE LE REFLECTRON EST ACTIVE 154

FIGURE 90 : REPRESENTATION DES TROIS VOIES PRINCIPALES DE FRAGMENTATION EN MS^2 AVEC A, LA DISSOCIATION INDUITE PAR COLLISION (CID) ; B, LA PHOTODISSOCIATION ET C, L'ENSEMBLE DES REACTIONS DE DISSOCIATION AVEC ASSISTANCE D'UN ELECTRON (EXD : ECD, ETD, EID, EDD…) 155

FIGURE 91 : SCHEMA D'UN INSTRUMENT DE TYPE MALDI-TOF/TOF POUR LA SPECTROMETRIE DE MASSE EN TANDEM 156

FIGURE 92 : INSTRUMENT HYBRIDE TRIPLE QUADRIPOLE ET TEMPS DE VOL (QQQ/TOF). CELUI-CI EST COMPOSE DE TROIS QUADRIPOLES JOUANT UN ROLE PASSANT (Q_0), FILTRANT (Q_1) ET FRAGMENTANT (Q_2) TANDIS QUE LE TOF ORTHOGONAL PERMET LA MIGRATION ET LA SEPARATION DES FRAGMENTS PRODUITS 158

FIGURE 93 : SCHEMA DES PROCESSUS MAJEURS PROPOSES DANS LE MODELE DES CLUSTERS OU « LUCKY SURVIVOR » EN IONISATION MALDI. A REPRESENTE L'ANALYTE, M LA MATRICE ET R^- UN CONTRE-ION GENERIQUE 159

FIGURE 94 : REPRESENTATION MECANISTIQUE DANS LE MODELE DES CLUSTERS DE LA NEUTRALISATION DES CHARGES DE PEPTIDES EXCEPTE POUR L'EXCES DE CHARGE QUI SUBSISTE OU A REPRESENTE L'ANALYTE, R_A^- UN ANION ET R_AH SON ACIDE CONJUGUE, R_B ET R_BH^+ UNE BASE ET SON ACIDE CONJUGUE 160

FIGURE 95 : REPRESENTATION MECANISTIQUE DANS LE MODELE DES CLUSTERS DE LA POSSIBILITE DE FORMER DES IONS NEGATIFS A PARTIR DE CONDITIONS ACIDES (1) ET DES IONS POSITIFS A PARTIR DE CONDITIONS BASIQUES (2), OU A REPRESENTE L'ANALYTE, R_A^- UN ANION ET R_AH SON ACIDE CONJUGUE, R_B ET R_BH^+ UNE BASE ET SON ACIDE CONJUGUE 160

FIGURE 96 : PROCESSUS UNIMOLECULAIRES ET BIMOLECULAIRES DE FUSION ENERGETIQUE EXISTANT DANS LE MODELE « COUPLED PHYSICAL AND CHEMICAL DYNAMICS » (CPCD). LES REACTIONS DE COMBINAISON ENERGETIQUE ENTRE LES ETATS EXCITES (ELECTRONS AUX NIVEAUX EXCITES S_1 ET S_N ET A L'ETAT AU REPOS S_0) DES MATRICES SONT L'ETAPE CLE DE LA CONCENTRATION ENERGETIQUE ET DE L'IONISATION 163

FIGURE 97 : FLUORESCENCE DE LA MATRICE EN FONCTION DE LA FLUENCE DU LASER. LES RESULTATS SYMBOLISES PAR LES CERCLES CORRESPONDENT A L'ETUDE PRESENTEE TANDIS QUE LES LOSANGES CORRESPONDENT A UNE AUTRE ETUDE DE LA LITTERATURE A DES FINS COMPARATIVES. LES COURBES SONT ISSUES D'UNE MODELISATION MOLECULAIRE PAR EQUATIONS DIFFERENTIELLES DECRITES DANS LA PUBLICATION DE SETZ ET KNOCHENMUSS DE 2005 165

FIGURE 98 : REACTIONS DE FORMATION D'IONS LORS DE L'ETAPE D'IONISATION SECONDAIRE PAR TRANSFERT DE PROTON (1), TRANSFERT D'ELECTRON (2) OU TRANSFERT DE CATION (3), OU A EST LA MOLECULE D'ANALYTE ET M LA MATRICE 166

FIGURE 99 : ILLUSTRATION DE L'EVOLUTION D'UN ECHANTILLON MALDI PREDITE PAR UNE SIMULATION OBTENUE GRACE AU MODELE CPCD QUANTITATIF. LA FUSION ENERGETIQUE DES ETATS S_1 EN QUANTITE RELATIVE ABONDANTE PERMET D'ATTEINDRE LES ETATS EXCITES SUPERIEURS S_N, PUIS LA FUSION ENERGETIQUE DES ETATS S_1 ET S_N PERMET D'OBTENIR LES IONS DE MATRICE (IONISATION PRIMAIRE), QUI PAR LA SUITE REAGIRONT AVEC L'ANALYTE NEUTRE POUR FORMER LES IONS D'ANALYTE (IONISATION SECONDAIRE) 169

FIGURE 100 : REPRESENTATION DE L'EFFICACITE D'IONISATION PAR RAPPORT A LA LONGUEUR D'ONDE ET A L'IMPULSION LASER EN FONCTION DE LA FLUENCE POUR UNE MATRICE DHB. LES COURBES SUPERIEURES POUR CHAQUE PARAMETRE (I.E : CHAQUE COULEUR) REPRESENTENT LE RENDEMENT CORRESPONDANT A LA COUCHE SUPERIEURE DE L'ECHANTILLON, TANDIS QUE LA COURBE INFERIEURE CORRESPOND AUX RENDEMENTS INTEGRES DE TOUTES LES PARTICULES EMISES 170

FIGURE 101 : REPRESENTATION DU RENDEMENT IONIQUE EN FONCTION DE LA FLUENCE DE L'IMPULSION LASER ET POUR DIFFERENTES TAILLES DE DEPOT. LE GRAPHIQUE 1 MONTRE LE RENDEMENT RELATIF AU VOLUME DE MATIERE IRRADIEE TANDIS QUE LE GRAPHIQUE 2 ILLUSTRE LE RENDEMENT IONIQUE ABSOLU POUR CES MEMES TAILLES DE DEPOT QUI EST PLUS IMPORTANT MAIS MOINS EFFICACE, POINT VERIFIE EXPERIMENTALEMENT 170
FIGURE 102 : ILLUSTRATION DE L'ELEVATION DE TEMPERATURE EN FONCTION DU TEMPS LORS DE L'IONISATION MALDI AVEC LA REPRESENTATION DE LA POSITION DES PARTICULES SUIVANT L'AXE Z EN FONCTION DU TEMPS..... 171
FIGURE 103 : ILLUSTRATION PROPOSEE DE L'IMPACT DES REACTIONS DE DESEXCITATION DES MOLECULES PROCHES DE L'ETAT D'IONISATION (A) OU MEME DEJA IONISEE (B) DANS LE CAS OU LE TRANSFERT ENERGETIQUE EST THERMODYNAMIQUEMENT FAVORABLE ($\Delta_R G < 0$ KJ.MOL^{-1}) 173
FIGURE 104 : ILLUSTRATION DE LA RECOMBINAISON D'IONS PAR EFFET TUNEL. LE PROCESSUS LE PLUS PROBABLE DEBUTE PAR UN TRANSFERT ELECTRONIQUE D'UN ION A L'AUTRE (1) PAR SAUT ENERGETIQUE SUIVIT D'UN REARRANGEMENT POUR S'ADAPTER A LEUR NOUVELLE DISTRIBUTION D'ENERGIE (2) 176
FIGURE 105 : DIAGRAMME SCHEMATIQUE REPRESENTANT LA PHOTOIONISATION ET LES DIFFERENTES REACTIONS PHOTOCHIMIQUES CONSECUTIVES POUR DE PETITES MOLECULES ORGANIQUES TELLES QUE LES MATRICES..... 177
FIGURE 106 : PROCESSUS PHOTOCHIMIQUES D'IONISATION POUR DES ANALYTES EN MALDI, OU M EST LA MATRICE, F UN FRAGMENT DE MATRICE ET P LA PROTEINE OU LE PEPTIDE ANALYSE 178
FIGURE 107 : REPRESENTATION SIMPLIFIE D'UN DIAGRAMME D'ORBITALES MOLECULES DE MATRICES MALDI USUELLES ADSORBEES SUR UNE SURFACE D'OR OU D'ACIER. AVEC UN NIVEAU DE FERMI (E_F) INFERIEUR AU NIVEAU ENERGETIQUE DE LA LUMO, LE PHOTON ABSORBE PAR LE METAL EST TRANSFERE A LA MATRICE DANS SA LUMO SOUS FORME D'UN ELECTRON QUI VA POUVOIR PAR LA SUITE ABSORBER L'ENERGIE LASER. LE NIVEAU ENERGETIQUE ALORS REQUIS EQUIVAUT A L'ABSORPTION CONSECUTIVE DE DEUX PHOTONS POUR ATTEINDRE DIRECTEMENT UN ETAT IONISE..... 179
FIGURE 108 : ILLUSTRATION DE L'EFFET PHOTOELECTRIQUE SUR LES BORDS DE DEPOTS DE PLUS EN PLUS EPAIS (DE GAUCHE A DROITE) OBTENUS PAR LA TECHNIQUE DE L'ELECTROSPRAY. LES RESULTATS SUPERIEURS CORRESPONDENT A UNE ACCUMULATION DE 5 IMPULSIONS LASER, ET CEUX EN-DESSOUS A 50 IMPULSIONS LASER SUR UN DEPOT DE SUBSTANCE P. LES POINTS EXPERIMENTAUX SONT REPRESENTES PAR LES CROIX TANDIS QUE LA LIGNE CONTINUE REPRESENTE LE SIGNAL MOYEN DANS LA ZONE LA PLUS UNIFORME DU DEPOT 180
FIGURE 109 : CLICHE DE MICROSCOPIE ELECTRONIQUE A BALAYAGE D'UNE SURFACE SILICONNEE PRESENTANT DES COLONNES DE 600 NM DE HAUT POUR 300 NM DE DIAMETRE ET UNE DISTANCE INTER COLONNE EVALUEE A 200 NM..... 181
FIGURE 110 : SPECTRES MALDI-TOF DE LA CAFEINE AVEC UNE MATRICE HCCA (A GAUCHE) ET DE DIFFERENTS ANALYTES DANS UNE MATRICE DCTB (A DROITE). L'EFFET DE SUPPRESSION DE MATRICE EST PRESQUE TOTAL DANS LE SPECTRE 1 A GAUCHE OU LE RAPPORT MATRICE/ANALYTE EST FAIBLE AVEC UNE VALEUR PROCHE DE 3. LORSQUE LE RAPPORT EST PLUS IMPORTANT, A 27 PAR EXEMPLE DANS LE SPECTRE 2 A GAUCHE, LES SIGNAUX DE MATRICE APPARAISSENT. EN REVANCHE IL EST POSSIBLE DE DETECTER DES SIGNAUX DE MATRICE MEME AVEC UN RAPPORT DE 3 LORSQUE L'ENERGIE DE L'IMPULSION LASER EST PLUS IMPORTANTE COMME DANS LE SPECTRE 3. CELA ENGENDRE PLUS D'IONS PRIMAIRES PROVENANT DE LA MATRICE QUI DEVIENT ALORS VISIBLE 182
FIGURE 111 : SCHEMA GENERAL POUR LA METHODE DE MARQUAGE DE PROTEINE ICPL. L'ALKYLATION SE FAIT PAR L'IODOACETAMIDE ET LE MARQUAGE PAR LE BUTYRATE D'N-HYDROXYSUCCINIMIDE DIRECTEMENT APRES LYSE DE LA CELLULE. VIENT ENSUITE LE MARQUAGE GRACE A UN GROUPEMENT SOUS FORME LEGERE OU LOURDE QUI AFFICHE UN ESTER D'N-HYDROXYSUCCINIMIDE. APRES RASSEMBLEMENT DES DEUX ECHANTILLONS, LA REDUCTION DE LA COMPLEXITE PROTEIQUE DE L'ECHANTILLON PASSE PAR DES METHODES DE TYPE FFE (POUR « FREE FLOW ELECTROPHORESIS »), LC OU ENCORE ELECTROPHORESE 1D OU 2D. UNE ETAPE SUPPLEMENTAIRE DE SEPARATION EST EFFECTUEE AU NIVEAU PEPTIDIQUE PAR CHROMATOGRAPHIE 2D. LES PEPTIDES MARQUES APPARAISSENT PAR PAIRES SEPAREES PAR UNE DIFFERENCE DE MASSE CONSTANTE EN MODE MS POUR PERMETTRE LA QUANTIFICATION. LE SPECTRE MS/MS SERT, QUANT A LUI, A IDENTIFIER LES PEPTIDES 184
FIGURE 112 : STRUCTURE DU CANDESARTAN (CAD) SOUS FORME LEGERE (Y = H) OU LOURDE (Y=D, CAD-D_4)). C'EST UN ANTAGONISTE DES RECEPTEURS DE L'ANGIOTENSINE II IMPLIQUE DANS LE TRAITEMENT L'HYPERTENSION ARTERIELLE ET DE L'INSUFFISANCE CARDIAQUE AVEC DISFONCTION CYSTOLIQUE VENTRICULAIRE GAUCHE 185
FIGURE 113 : SPECTRE MALDI PSD DES MOLECULES CAD ET CAD-D_4 OBTENUE PAR NAKANISHI ET AL. EN 2013..... 186
FIGURE 114 : COURBE PLIMSTEX OBTENUE AVEC LA PROTEINE I-FABP « WILD-TYPE » (POUR « INTESTINAL FATTY ACID BINDING PROTEIN ») A 0,3 µM TITREE AVEC L'OLEATE DE POTASSIUM DANS UN TAMPON CONTENANT 95 % DE D_2O APRES 3 H

d'echange H/D. La courbe en trait plein correspond a la modelisation mathematique avec une interaction a 2 elements (proteine et ligand) dans un rapport 1:1 et un modele a 3 parametres : une constante d'equilibre (K_1), une valeur de masse (D_0) pour la proteine nue et une difference de masse (ΔD_1) correspondant a la charge en deuterium 189

Chapitre 4 : La synthèse peptidique en quatre points : principe, stratégies, agents de couplages et choix pour les peptides synthétisés

Figure 115 : Structures des peptides parmi les premiers a avoir ete synthetises et ayant une activite biologique, dont l'oxytocine qui presente une structure proche de celle de l'AVP 194
Figure 116 : Structures des residus des 20 acides amines proteogenes regroupes par leur caractere polaire, aliphatique, aromatique, acide et basique. Chaque acide amine proteogene naturel s'est vu attribue un code trois lettres et un code une lettre 195
Figure 117 : Structure d'une nouvelle protection de l'acide aspartique (A) et reactions secondaires de formation d'aspartimide (B) conduisant a l'epimerisation de l'acide aspartique et a la formation de 9 produits en prenant en compte les formes L et D 197
Figure 118 : Protection de chaine laterale de cysteine par un groupement tetrahydropyrane (THP) acido labile 199
Figure 119 : Representation de l'avantage de l'HOAt par rapport a l'HOBt grace aux liaisons hydrogenes qui creent un etat de transition rapproche et favorable a une formation de liaison amide plus rapide 205
Figure 120 : Structure de l'oxyma (2-cyano-2-(hydroxyimino)acetate d'ethyle) a la base de l'agent de couplage COMU 207
Figure 121 : Structures de composes organophosphores utilises en tant qu'agents de couplage pour la formation de liaisons peptidiques 209

Liste des figures – Partie B – Travaux de thèse

Chapitre 2 : Le projet AVP/V_{1A}

Figure 122 : Proposition de mecanisme reactionnel pour la reaction de retro Knoevenagel en milieu basique applique a l'HCCA couple sur la position N-terminale d'un peptide 223
Figure 123 : Representation des niveaux d'energie delivree aux ions lors de leur production et de leur acceleration dans le MALDI-ToF via les potentiels appliques 232
Figure 124 : Proposition de mecanisme de rearrangement ou la formation de l'immonium pour le peptide MR 5 serait possible grace a une somme des energies d'activations necessaire a l'atteinte de ce dernier inferieure a l'energie de l'ion a_1 contrairement au cas du peptide MR 6 235
Figure 125 : Proposition de structure pour le fragment y_3** du peptide modele MR 7 236
Figure 126 : Incubation du peptide MR 6-D_0 a 30 °C sur une echelle de temps coherente avec le temps de manipulation en pharmacologie dans une solution d'eau (legerement acide) et dans le tampon ABC (ammonium bicarbonate a pH = 8) a une concentration de 10 nmol.L^{-1} 243
Figure 127 : Incubation du peptide MR 5 sur une echelle de temps coherente avec le temps de manipulation en pharmacologie dans une solution d'eau (legerement acide) et dans le tampon ABC (ammonium bicarbonate a pH = 8) a une concentration de 10 nmol.L^{-1} 243
Figure 128 : Evolution au cours du temps du MR 6 – D_0 dans le tampon de dissociation a 4°C (conditions de transport). Les differents echantillons sont prepares 17 h, 2 h ou 1 h avant le depot a T_0. 244

FIGURE 129 : COMPARAISON DU CHROMATOGRAMME UV DU PEPTIDE MR 6 – D_0 DANS LE TAMPON DE LIAISON A T_0 (A GAUCHE) QUI PRESENTE UN PIC DE BSA A 5,5 MIN ET DANS UN MELANGE H_2O/MECN 50/50 A T_0 (A DROITE)..... 245
FIGURE 130 : PROPOSITION DE MECANISME REACTIONNEL POUR L'ISOMERISATION DE L'INSATURATION DU FRAGMENT HCCA EN SOLUTION 246
FIGURE 131 : COMPARAISON DU CHROMATOGRAMME UV DU PEPTIDE MR 10-D_0 DANS LE TAMPON DE LIAISON A T_0 (EN HAUT) QUI PRESENTE UN PIC DE BSA A 5,5 MIN ET DANS UN MELANGE H_2O/MECN 50/50 A T_0 (EN BAS)..... 247
FIGURE 132 : PRINCIPE DE LA TECHNIQUE DE DEPOT BAPTISEE GS 1.8 248
FIGURE 133 : ILLUSTRATION DE LA DIFFERENCE DE CRISTALLISATION D'UN ECHANTILLON DEPOSE PAR LA TECHNIQUE GS ET GSP ... 248
FIGURE 134 : ILLUSTRATION DE DEPOTS ISSUS D'UNE EXPERIENCE DE SATURATION SUR PREPARATION MEMBRANAIRE ZOOMEE AUTOUR DE LA MASSE DU PEPTIDE D'INTERET (MR 6-D_0). LE SPECTRE A CORRESPOND A L'ANALYSE D'UN ECHANTILLON AVEC UNE CONCENTRATION INTRODUITE DE 0,2 NM ET LE SPECTRE B A UNE CONCENTRATION INTRODUITE DE 8 NM POUR UN SECHAGE SOUS FLUX D'AIR A TEMPERATURE AMBIANTE, TANDIS QUE LE SPECTRE C CORRESPOND AU DEPOT DE L'ECHANTILLON DE A ET LE SPECTRE D A L'ECHANTILLON DE B SECHES SOUS FLUX D'AIR CHAUFFE 254
FIGURE 135 : ILLUSTRATION DE LA VARIATION DE L'ASPECT DES DEPOTS EN FONCTION DE LA SURFACE DE LA PLAQUE ET DU DIAMETRE DU PUIT 255
FIGURE 136 : COMPARAISON DES DEPOTS MALDI ENTRE LES TECHNIQUES GSP (A), GS 1.8 (B) 256
FIGURE 137 : PRINCIPE DE LA PREPARATION DE SOLUTION DE MATRICE A 10 % (HCCE 10) ET 1 % (HCCE 1) DE LA CONCENTRATION DE SATURATION..... 256
FIGURE 138 : COMPARAISON DES DEPOTS MALDI ENTRE DEUX ESTERS DE L'HCCA (ETHYLIQUE EN A ET METHYLIQUE EN B) A 10 % DE LA CONCENTRATION DE SATURATION (HCCE 10) ET ENTRE DEUX CONCENTRATION DE L'ESTER METHYLIQUE DE L'HCCA (A 10 % DE LA CONCENTRATION DE SATURATION EN B ET 1 % DE CELLE-CI EN C)..... 257
FIGURE 139 : COMPARAISON DES DEPOTS MALDI ENTRE LES TECHNIQUES GSP (A), GSP M1/2 (B) 258
FIGURE 140 : COMPARAISON ENTRE DEUX SERIES DE DEUX SPECTRES AVEC TECHNIQUE DE DEPOT GSP ET GSP-M1/2 POUR UNE CONCENTRATION EN ETALON IDENTIQUE POUR LES 4 SPECTRES. L'INFORMATION PRINCIPALE A RETENIR EST LA POSSIBILITE DE DETECTER ET DE QUANTIFIER L'ANALYTE EN UTILISANT LA TECHNIQUE GSP-M1/2..... 258
FIGURE 141 : ILLUSTRATION DE L'IMPACT DE LA CONCENTRATION DE MATRICE SUR LA QUALITE DE L'ANALYSE MALDI AVEC UN ETALON DEUTERE INTRODUIT A 5.10^{-9} MOL.L^{-1} 259
FIGURE 142 : ILLUSTRATION DE L'ADVECTION A L'ŒUVRE LORS DU SECHAGE D'UNE GOUTTE SUR PLAQUE EN ACIER A FORT ANGLE DE CONTACT (1) ET SUR UNE PLAQUE DE TYPE ANCHORCHIP A FAIBLE ANGLE DE CONTACT (2) QUI ENTRAINE UNE CONCENTRATION DU DEPOT ET UNE COUCHE DE MATRICE PLUS EPAISSE A CONCENTRATION EQUIVALENTE 260
FIGURE 143 : ASPECT DU REVETEMENT DE LA PLAQUE ANCHORCHIP ET D'UN DEPOT DE MATRICE HCCA 260
FIGURE 144 : ILLUSTRATION DE L'EFFET PHOTOELECTRIQUE SUR LES BORDS DE DEPOTS DE PLUS EN PLUS EPAIS (DE GAUCHE A DROITE) OBTENUS PAR LA TECHNIQUE DE L'ELECTROSPRAY POUR DIFFERENTS TEMPS DE DEPOT (2, 4 …. 30 S), DE L'EFFET DE BORD ET DE L'IMPACT DE L'EPAISSEUR DE LA COUCHE DE MATRICE 261
FIGURE 145 : ILLUSTRATION DE L'EFFET PHOTOELECTRIQUE POUR UN DEPOT DE PEPTIDE MR 6-D_0 DANS LA MATRICE HCCE. UNE SERIE DE 100 TIRS LASER A ETE EFFECTUEE A TROIS LOCALISATIONS DIFFERENTES DU DEPOT : AU BORD DU PUIS (A), SUR UN PETIT CRISTAL EXTERIEUR AU PUIT (B) ET A L'INTERIEUR DU PUIT (C). LES RESULTATS OBTENUS MONTRENT CLAIREMENT L'INTERET D'ALLER CHERCHER DES IONS AUX ABORDS ET A L'EXTERIEUR DES PUITS GRACE A L'EFFET PHOTOELECTRIQUE QUI PERMET D'AMELIORER L'IONISATION DES ANALYTES 261
FIGURE 146 : PROPOSITIONS DE STRUCTURE POUR LES IONS DE MATRICE OBSERVES..... 263
FIGURE 147 : PROPOSITION DE REPRESENTATION DE CLUSTER DE MATRICE AVEC DES MOLECULES DE PEPTIDES COCRISTALLISEES ET DES MOLECULES D'EAU QUI VONT STABILISER L'ARCHITECTURE MOLECULAIRE COMPLEXE VIA DES INTERACTIONS HYDROGENES ET COULOMBIENNES AVEC DES CATIONS SODIUM 263
FIGURE 148 : EVOLUTION DU RAPPORT S/N ET DE LA RESOLUTION DU PIC A_1 DU MASSIF ISOTOPIQUE DU PEPTIDE MR 6-D_0 EN FONCTION LA CONCENTRATION DEPOSEE ET DE LA FLUENCE (H_{LASER}) UTILISEE..... 265
FIGURE 149 : ILLUSTRATION DE LA LIMITE DE DETECTION DU PEPTIDE MR 5 (HOMO-HO-LVA) JUSQU'A 5.10^{-9} MOL.L^{-1} DANS LA MATRICE HCCE METHYLE..... 266
FIGURE 150 : ILLUSTRATION DE LA LIMITE DE DETECTION DU PEPTIDE MR 4 (AVP) JUSQU'A 5.10^{-8} MOL.L^{-1} DANS LA MATRICE HCCE METHYLE 266

FIGURE 151 : MELANGE EQUIMOLAIRE MR 5-HOMO-HO-LVA /MR 6-D_0/MR 7 267
FIGURE 152 : TRACE D'UNE GAMME ETENDUE DE MESURE DU PEPTIDE MR 6-D_0 AVEC OU SANS AJOUT SUPPLEMENTAIRE DE PEPTIDE MR 4. LE RESULTAT QUI EN RESSORT EST UNE IDENTITE DES DEUX GAMMES SANS DIFFERENCE SIGNIFICATIVE DES MESURES DE CONCENTRATION QUELLE QUE SOIT LE CAS CONSIDERE 270
FIGURE 153 : REGRESSION LINEAIRE A PARTIR DES MOYENNES DES POINTS DE MESURE PRECEDENTS SUR UNE GAMME DE CONCENTRATION RESTREINTE (10^{-10} A 10^{-8} MOL.L^{-1}) MONTRANT LA SIMILITUDE ENTRE LES DEUX DROITES DE REGRESSION .. 271
FIGURE 154 : REGRESSION LINEAIRE A PARTIR DES MOYENNES DES POINTS DE MESURE OBTENUS EN SUBSTITUANT LE RAJOUT DE PEPTIDE MR 4 PAR UN AUTRE PEPTIDE (EMC-09) CONÇU SPECIFIQUEMENT POUR UNE AUTRE PLATE-FORME D'ANALYSE SUR UNE GAMME DE CONCENTRATION RESTREINTE (10^{-10} A 10^{-8} MOL.L^{-1}) MONTRANT LA MEME SIMILITUDE ENTRE LES DEUX DROITES DE REGRESSION 271
FIGURE 155 : REPRESENTATION DU PROTOCOLE D'INCUBATION MIS EN PLACE POUR MIMER CETTE ETAPE LORS DE L'EXPERIENCE DE PHARMACOLOGIE 274
FIGURE 156 : REPRESENTATION DU PROTOCOLE DESTINE A MIMER UNE EXPERIMENTATION GLOBALE ALLANT DE L'INTRODUCTION DE L'ANALYTE (1) POUR INCUBATION JUSQU'AU PRELEVEMENT DE LA SOLUTION A DEPOSER (2) 275
FIGURE 157 : REPRESENTATION MATHEMATIQUE DES B-ETI 279
FIGURE 158 : REPRESENTATION MATHEMATIQUE DU DOMAINE DE VALIDATION 279
FIGURE 159 : SOURCES D'INCERTITUDES AU COURS DU PROCESSUS DE QUANTIFICATION PAR MALDI 282
FIGURE 160 : VALIDATION STATISTIQUE DE LA METHODE ANALYTIQUE – ETALON DEUTERE A 10 NMOL.L^{-1} 284
FIGURE 161 : VALIDATION STATISTIQUE DE LA METHODE ANALYTIQUE – ETALON DEUTERE A 1 NMOL.L^{-1} 286
FIGURE 162 : VALIDATION STATISTIQUE DE LA METHODE ANALYTIQUE – ETALON DEUTERE A 100 NMOL.L^{-1} 288
FIGURE 163 : ILLUSTRATION DE L'INCOMPATIBILITE DE FRAGMENTS DE SERIES DE MESURES SUR DEUX JOURS D'ANALYSE DIFFERENTS 289
FIGURE 164 : COURBE D'ETALONNAGE OBTENUE EN REPRESENTANT LES MOYENNES DE 6 MESURES DE RAPPORTS D'AIRE ENTRE LES PEPTIDES MR 6-D_0 ET MR 6-D_4 EN FONCTION DE LA CONCENTRATION EN PEPTIDE MR 6-D_0 293
FIGURE 165 : ILLUSTRATION DE LA SELECTION DES FILTRES POUR L'AFFICHAGE DES MOLECULES CIBLEES 295
FIGURE 166 : CLICHES D'IMAGERIE DE DEPOTS SUR PLAQUE ANCHORCHIP – MR 6-D_0 (1 164, 6 ± 0,5 %) 296
FIGURE 167 : ILLUSTRATION DE LA REPARTITION DU PEPTIDE D'INTERET MR 6-D_0 AU SEIN DE DEPOTS QUI MET EN EVIDENCE UNE TENDANCE A SE CONCENTRER SUR LES BORDS DU PUIT 296
FIGURE 168 : CLICHE D'IMAGERIE REPRESENTANT LA REPARTITION DU PEPTIDE D'INTERET (MR 6-D_0, A GAUCHE EN JAUNE) ET DE L'ETALON DEUTERE (MR 6-D_4, A DROITE EN ROUGE) 297
FIGURE 169 : CLICHE D'IMAGERIE REPRESENTANT LA SUPERPOSITION DES DEUX PEPTIDES (MR 6-D_0 ET MR 6-D_4) 298
FIGURE 170 : CLICHE D'IMAGERIE REPRESENTANT LA SUPERPOSITION DES DEUX PEPTIDES (MR 6-D_0 ET MR 6-D_4) 299
FIGURE 171 : CLICHE D'IMAGERIE REPRESENTANT LA REPARTITION D'UN PEPTIDE ADDITIONNE (EMC-09) AU MELANGE 300
FIGURE 172 : CLICHE D'IMAGERIE REPRESENTANT LA SUPERPOSITION DES TROIS PEPTIDES (MR 6-D_0 ET MR 6-D_4 ET EMC-09) .. 301
FIGURE 173 : CLICHE D'IMAGERIE REPRESENTANT LA REPARTITION DU PEPTIDE D'INTERET (MR 6-D_0, A GAUCHE EN JAUNE) ET DE L'ETALON DEUTERE (MR 6-D_4, A DROITE EN ROUGE) LORS DE LA MESURE DE LA LIAISON TOTALE 302
FIGURE 174 : CLICHE D'IMAGERIE REPRESENTANT LA REPARTITION DES DEUX PEPTIDES COCRISTALLISES LORS DE LA MESURE DE LA LIAISON TOTALE 302
FIGURE 175 : CLICHE D'IMAGERIE REPRESENTANT LA REPARTITION DU PEPTIDE D'INTERET (MR 6-D_0, A GAUCHE EN JAUNE) ET DE L'ETALON DEUTERE (MR 6-D_4, A DROITE EN ROUGE) LORS DE LA MESURE DE LA LIAISON NON SPECIFIQUE 303
FIGURE 176 : CLICHE D'IMAGERIE REPRESENTANT LA REPARTITION DES DEUX PEPTIDES COCRISTALLISES LORS DE LA MESURE DE LA LIAISON NON SPECIFIQUE 304
FIGURE 177 : CLICHE D'IMAGERIE REPRESENTANT LA REPARTITION DE L'AVP DANS LES DEPOTS LORS DE LA MESURE DE LA LIAISON NON SPECIFIQUE 304
FIGURE 178 : CLICHE D'IMAGERIE REPRESENTANT LA SUPERPOSITION DES FILTRES CORRESPONDANT AUX TROIS PEPTIDES (MR 6-D_0 ET MR 6-D_4 ET MR 6– AVP) 305
FIGURE 179 : FRAGMENTS Y_{4*} ET A_1 OBSERVE EN MRM SUR QQQ. ILS SERVIRONT A LA DETECTION SPECIFIQUE ET SENSIBLE PAR MRM EN SUIVANT LES TRANSITIONS 582,8 → 524,6 ET 582,8 →321,3 POUR UN ION PARENT DICHARGE 306

FIGURE 180 : ENCHAINEMENT DES RESIDUS D'ACIDES AMINES QUI COMPOSENT LA SEQUENCE DU RECEPTEUR V_{1A} OBTENU A PARTIR D'ADNC. LES FOURCHES SYMBOLISENT DES SITES POTENTIELS DE GLYCOSYLATION 310
FIGURE 181 : CELLULES CONFLUENTES OBSERVEES AU MICROSCOPE OPTIQUE 312
FIGURE 182 : REPIQUAGE DE CELLULES EN FLACON 313
FIGURE 183 : CELLULE DE MALLASSEZ 314
FIGURE 184 : DROITE D'ETALONNAGE POUR LA MESURE DE L'ABSORBANCE UV DE SOLUTIONS DE PREPARATION MEMBRANAIRE OBTENUES A PARTIR DE CELLULES CHO-V_{1A} SUREXPRIMANT LE RECEPTEUR V_{1A} 316
FIGURE 185 : COURBE DE SATURATION OBTENUE PAR MALDI SUR PREPARATION MEMBRANAIRE CHO 319
FIGURE 186 : PROTOCOLE PHARMACOLOGIQUE RESUME « AT A GLANCE » DANS LE CADRE DE L'ANALYSE PAR SCINTIGRAPHIE 320
FIGURE 187 : COURBE DE SATURATION DU PEPTIDE MR 5 MARQUE A L'IODE 125 POUR UNE QUANTIFICATION PAR SCINTIGRAPHIE 321
FIGURE 188 : REPRESENTATION DE SCATCHARD DE LA FIGURE 187 P.328 321
FIGURE 189 : PROTOCOLE PHARMACOLOGIQUE RESUME « AT A GLANCE » DANS LE CADRE DE L'ANALYSE PAR MALDI-SID-MS ... 323
FIGURE 190 : SPECTRES MALDI OBTENUS A PARTIR DE REPLICATS CONTENANT 0 NMOL.L^{-1} DE LIGAND TRACEUR (BLANCS) AUXQUELS A ETE AJOUTE L'ETALON A 1 164,6 TH LORS POUR LA QUANTIFICATION DE LA SERIE DE MESURES COMPLETE 323
FIGURE 191 : COURBE DE SATURATION DU PEPTIDE MR 6-D_0 PORTANT UN MARQUAGE HCCA POUR UNE QUANTIFICATION PAR MALDI-SID-MS APRES ETALONNAGE PREALABLE AU COURS DE LA MEME SERIE D'ANALYSES 324
FIGURE 192 : REPRESENTATION DE SCATCHARD DE LA FIGURE 191 P.331 325
FIGURE 193 : COURBE DE COMPETITION ENTRE LE LIGAND [^{125}I]MR 5ET DIFFERENTS COMPETITEURS, A SAVOIR LES PEPTIDES MR 6-D_0 ET MR 5. LES RESULTATS SONT EXPRIMES EN POURCENTAGE DE LIAISON DU LIGAND TRACEUR 327
FIGURE 194 : COURBE DE COMPETITION ENTRE LE LIGAND MR 6-D_0 ET LE PEPTIDE MR 5 EN TANT QUE COMPETITEUR. LES RESULTATS SONT EXPRIMES EN POURCENTAGE DE LIAISON DU LIGAND TRACEUR 328
FIGURE 195 : ILLUSTRATION DE L'INTERFERENCE CREEE PAR L'ADDUIT SODIUM DU PEPTIDE MR 5 A 10^{-5} MOL.L^{-1} ENVERS LE PEPTIDE MR 6-D_0 329
FIGURE 196 : COURBE DE COMPETITION ENTRE LE LIGAND MR 6-D_0 ET LE PEPTIDE MR 5EN TANT QUE COMPETITEUR AVEC POINTS AUX DEMI-LOGS. LES RESULTATS SONT EXPRIMES EN POURCENTAGE DE LIAISON DU LIGAND TRACEUR 330
FIGURE 197 : STRUCTURES CHIMIQUES, FORMULE CHIMIQUE ET MASSE MOLAIRE DU RELCOVAPTAN® ET DU SATAVAPTAN® 331
FIGURE 198 : COURBE DE COMPETITION ENTRE LE LIGAND MR 6-D_0 ET DEUX LIGANDS NON PEPTIDIQUES, A SAVOIR LE RELCOVAPTAN ET LE SATAVAPTAN AVEC POINTS AUX DEMI-LOGS. LES RESULTATS SONT EXPRIMES EN POURCENTAGE DE LIAISON DU LIGAND TRACEUR 332
FIGURE 199 : ETALONNAGE EFFECTUE AVANT LA QUANTIFICATION PAR MALDI-SID-MS POUR LA MESURE DE LIAISON TOTALE ET NON SPECIFIQUE. CETTE ETAPE EST EFFECTUEE SYSTEMATIQUEMENT AVANT CHAQUE QUANTIFICATION 334
FIGURE 200 : SPECTRES OBTENUS A PARTIR DE MESURES DE BLANC CONTENANT UNIQUEMENT L'ETALON DEUTERE A LA CONCENTRATION UTILISEE POUR LA QUANTIFICATION ET L'ETALONNAGE (10^{-9} MOL.L^{-1}). LES CONDITIONS DE MANIPULATION ET DE DEPOT DE L'ECHANTILLON SONT IDENTIQUES AU RESULTAT DE L'OPTIMISATION (HCCE 1, GSP-M1/2) 335
FIGURE 201 : COURBES DE SATURATION DU PEPTIDE MR 6-D_0 REPRESENTANT DEUX TRACES DE LA LIAISON SPECIFIQUE OBTENUS PAR DEUX METHODES DE CALCULS DIFFERENTES APRES QUANTIFICATION PAR MALDI-SID-MS 336
FIGURE 202 : COURBES DE COMPETITION A L'EQUILIBRE ENTRE LE PEPTIDE MR 6-D_0 (LIGAND TRACEUR) ET LE SATAVAPTAN REPRESENTANT DEUX TRACES DE LA MESURE DU DEPLACEMENT DU LIGAND TRACEUR PAR DEUX METHODES DE CALCULS DIFFERENTES APRES QUANTIFICATION PAR MALDI-SID-MS 338
FIGURE 203 : SECONDE APPLICATION DE LA COMPARAISON DES METHODES DE TRAITEMENT A UN LIGAND NON PEPTIDIQUE DE FORTE AFFINITE POUR LE RECEPTEUR D'ETUDE V_{1A}. CELLE-CI MONTRE UNE PARFAITE SIMILITUDE ENTRE LES DEUX TRAITEMENTS DE DONNEES PAR QUANTIFICATION DIRECTE EN ROUGE ET PAR QUANTIFICATION VIA UN ETALONNAGE EN BLEU 339

Chapitre 3 : Le projet CCKB/CCKB-R

FIGURE 204 : ANALYSE MS DU PRODUIT SOLIDE BRUT ISSU DE LA REACTION DE SYNTHESE DE L'OIA 344
FIGURE 205 : ASPECT DU MILIEU D'OXYDATION DU TRYPTOPHANE APRES PRECIPITATION ET FILTRATION DE L'OXINDOLYLALANINE .. 344
FIGURE 206 : ILLUSTRATION DE L'EVOLUTION DE LA PROPORTION DE KYNURENINE LORS DE SA SYNTHESE A -5 °C A PH = 14 EN FONCTION DU TEMPS DE REACTION 347

FIGURE 207 : CHROMATOGRAMME HPLC-UV DU MILIEU REACTIONNEL A 1 H DE REACTION A PH = 13 ET PH = 14 MONTRANT LA CONVERSION TOTALE DE L'UN DES DEUX ISOMERES DE L'OXINDOLYL-L-ALANINE. L'INTENSITE RELATIVE DES IONS EST REPRESENTEE EN ORDONNE ET LE TEMPS D'ELUTION EN ABSCISSE 347
FIGURE 208 : ILLUSTRATION DE L'EVOLUTION DE LA PROPORTION DE DIOXINDOLYL-L-ALANINE LORS DE SA SYNTHESE A -5 °C A PH = 11 EN FONCTION DU TEMPS DE REACTION 348
FIGURE 209 : ILLUSTRATION DE L'EVOLUTION DE LA PROPORTION DE FORMES OXYDEES DU TRYPTOPHANE ET PROTEGEES LORS DE LEUR SYNTHESE A T.A ET A PH = 11 349
FIGURE 210: PROPOTISION DE REARRANGEMENT DU FRAGMENT A_3* DES PEPTIDES MR 10-D_0 ET MR 10-D_4 PARTICULIEREMENT INTENSE DANS LES SPECTRES DE MS^2 ET STRUCTURE PROPOSEE DE CELUI-CI 355
FIGURE 211 : STRUCTURES DES FORMES OXYDEES DU TRYPTOPHANE CONNUES DANS LA LITTERATURE 357
FIGURE 212 : PROPORTION DES DIFFERENTES FORMES OXYDEES DU TRYPTOPHANE DANS L'ECHANTILLON STOCKE CORRESPONDANT AU PEPTIDE MR 9-D_0 357
FIGURE 213 : ILLUSTRATION DE LA LIMITE DE DETECTION DU PEPTIDE MR 10-D_0 DANS LA MATRICE HCCA DETERMINEE A 5.10^{-9} MOL.L^{-1} 359
FIGURE 214 : ILLUSTRATION DE LA LIMITE DE DETECTION DU PEPTIDE MR 10-D_0 DANS LA MATRICE HCCA DETERMINEE A 5.10^{-11} MOL.L^{-1} 359
FIGURE 215 : VALIDATION STATISTIQUE DE LA METHODE ANALYTIQUE AVEC LES PEPTIDES MR 10-D_0 ET MR 10-D_4 ET UNE CONCENTRATION EN ETALON DEUTERE DE 1 NMOL.L^{-1} 360
FIGURE 216 : COURBE D'ETALONNAGE OBTENUE EN REPRESENTANT LES MOYENNES DE 6 MESURES DE RAPPORTS D'AIRE ENTRE LES PEPTIDES MR 10-D_0 ET MR 10-D_4 EN FONCTION DE LA CONCENTRATION EN PEPTIDE MR 10-D_0 361
FIGURE 217 : SEQUENCE PRIMAIRE DU RECEPTEUR CCKB HUMAIN (HCCK-B) ALIGNE AVEC LES SEQUENCES DU RECEPTEUR A GASTRINE CANIN (DGASTRIN) ET LA SEQUENCE DU RECEPTEUR CCK-A MURIN (RCCK-A). LES RESIDUS EN NOIRS SONT COMMUNS A DEUX SEQUENCES AU MOINS ET LES BARRES NUMEROTEES DE I A VII CORRESPONDENT AUX DOMAINES TRANSMEMBRANAIRES PREDITS PAR ALGORITHME 363
FIGURE 218 : DROITE D'ETALONNAGE POUR LA MESURE DE L'ABSORBANCE UV DE SOLUTIONS DE PREPARATION MEMBRANAIRE OBTENUES A PARTIR DE CELLULES HEK293 SUREXPRIMANT LE RECEPTEUR CCKB 364
FIGURE 219 : COURBE DE SATURATION DU PEPTIDE MR 10-D_0 PORTANT UN MARQUAGE HCCA POUR UNE QUANTIFICATION PAR MALDI-SID-MS 365
FIGURE 220 : INCOHERENCE ENTRE LE MASSIF ISOTOPIQUE DE L'ANALYTE A M/Z = 1 030,5 TH ET CELUI DE L'ETALON A 1 034,5 TH A UNE CONCENTRATION DE 10 NMOL.L^{-1} 367
FIGURE 221 : COURBES DE LIAISON SPECIFIQUE DU PEPTIDE MR 10-D_0 ENVERS LE RECEPTEUR CCKB-R EN UTILISANT DEUX CONCENTRATIONS D'ETALON DIFFERENTES REPRESENTANT DEUX TRACES DE LA LIAISON SPECIFIQUE OBTENUS PAR DEUX METHODES DE CALCULS DIFFERENTES APRES QUANTIFICATION PAR MALDI-SID-MS. LA COURBE BLEU CLAIR CORRESPONDANT A LA QUANTIFICATION PAR L'ETALON A 10 NMOL.L^{-1} TANDIS QUE LA COURBE BLEU MARINE CORRESPOND A CELLE EFFECTUEE AVEC UN ETALON A 1 NMOL.L^{-1} 367
FIGURE 222 : COURBES DE SATURATION DU PEPTIDE MR 10-D_0 REPRESENTANT DEUX TRACES DE LA LIAISON SPECIFIQUE OBTENUS PAR DEUX METHODES DE CALCULS DIFFERENTES APRES QUANTIFICATION PAR MALDI-SID-MS EN UTILISANT UNE CONCENTRATION D'ETALON DE 10 NMOL.L^{-1} 369
FIGURE 223 : COURBES DE SATURATION DU PEPTIDE MR 10-D_0 REPRESENTANT DEUX TRACES DE LA LIAISON SPECIFIQUE OBTENUS PAR DEUX METHODES DE CALCULS DIFFERENTES APRES QUANTIFICATION PAR MALDI-SID-MS EN UTILISANT UNE CONCENTRATION D'ETALON DE 1 NMOL.L^{-1} 370
FIGURE 224 : STRUCTURE ET FORMULE CHIMIQUES PROPOSEES POUR LA MASSE A 441 TH ET UN TEMPS DE RETENTION DE 2,99 MINUTES 373
FIGURE 225 : SPECTRE DE FRAGMENTATION DE L'ION A 458 TH ET PROPOSITIONS DE STRUCTURES DE CE DERNIER AINSI QUE DES FRAGMENTS OBTENUS. LES MECANISMES DE PERTES DE NEUTRES SONT PROPOSES A LA FIGURE 229 P.385 373
FIGURE 226 : SPECTRE DE FRAGMENTATION DE L'ION A 459 TH ET PROPOSITIONS DE STRUCTURES DE CE DERNIER AINSI QUE DES FRAGMENTS OBTENUS. LES MECANISMES DE PERTES DE NEUTRES SONT PROPOSES A LA FIGURE 230 P.386 374
FIGURE 227 : SPECTRE DE FRAGMENTATION DE LA MASSE A 441 TH A 2,67 MINUTES D'ELUTION (VOIR CHROMATOGRAMME 11 P.380) QUI CACHE L'ION MOLECULAIRE DU FMOC-DIOIA-OH 375

FIGURE 228 : PROPOSITION DE GENEALOGIE DES FRAGMENTS OBSERVES EN MS^2 POUR LA MOLECULE DE RAPPORT M/Z = 431 TH POUR L'ADDUIT PROTONE $[M+H]^+$ DE L'ACIDE AMINE MODIFIE FMOC-KYN-OH 376
FIGURE 229 : PROPOSITION DE GENEALOGIE DES FRAGMENTS OBSERVES EN MS^2 POUR LA MOLECULE DE RAPPORT M/Z = 458 TH POUR L'ADDUIT PROTONE $[M+H]^+$ DE L'ECHANTILLON DE FMOC-KYN-OH 377
FIGURE 230 : PROPOSITION DE GENEALOGIE DES FRAGMENTS OBSERVES EN MS^2 POUR LA MOLECULE DE RAPPORT M/Z = 459 TH POUR L'ADDUIT PROTONE $[M+H]^+$ DE L'ECHANTILLON DE FMOC-KYN-OH 378
FIGURE 231 : ILLUSTRATION DE LA STRATEGIE DE SYNTHESE DE NOUVEAUX MARQUEURS POUR ESI ET MALDI COMPOSE D'UNE CHARGE PREFORMEE DANS LA PARTIE « SONDE » DU MARQUEUR ET UN LIEN LABILE ENTRE CETTE SONDE ET LE PEPTIDE DONT LE ROLE EST DE FAVORISER SA PROPRE COUPURE 384
FIGURE 232 : CONCEPTION DE NOUVEAUX MARQUEURS A CHARGE PREFORMEE BASEE SUR DES MATRICES MALDI 386
FIGURE 233 : SPECTRE DE FRAGMENTATION DU PEPTIDE MODELE MR 7 PORTANT LE MARQUEUR MR 14 EN POSITION N-TERMINALE ET PROPOSITION DE STRUCTURES POUR LES FRAGMENTS AUX BASSES MASSES A PARTIR DES FORMULES BRUTES DETERMINEES PAR SPECTROMETRIE DE MASSE A HAUTE RESOLUTION 387

Liste des figures – Partie D – Partie expérimentale

FIGURE 234 : DEPOTS AVEC TRACES DE POLYETHYLENEIMINE (A GAUCHE), SANS POLYETHYLENEIMINE (A DROITE) ET EN CONDITION D'ETALONNAGE (EN BAS) 401
FIGURE 235: PROFIL HPLC DE LA PURIFICATION DE [^{125}I]MR 5 418

Liste des illustrations – Partie E – Annexes

FIGURE 236 : REPRESENTATION SCHEMATIQUE D'UN TRIPLE QUADRIPOLE DANS UNE EXPERIENCE DE MRM 480
FIGURE 237 : TRANSFORMATION EN PYROGLUTAMATE D'UNE GLUTAMINE EN N-TERMINAL 481
FIGURE 238 : ILLUSTRATION DE LA VALIDATION DE TRANSITIONS D'UN PEPTIDE VFAQFSSFVDSVIAK SELECTIONNEES POUR UNE EXPERIENCE DE MRM PAR LA METHODE « SRM-TRIGGERED MS/MS SCANNING » 483
FIGURE 239 : REPRESENTATION DU POTENTIEL ZETA ET DE LA DOUBLE COUCHE ELECTRIQUE A LA SURFACE D'UN CAPILLAIRE 488
FIGURE 240 : REPRESENTATION D'UN CIRCUIT D'ELECTROPHORESE CAPILLAIRE. L'ANOLYTE CORRESPOND A L'ANALYTE INTRODUIT AU NIVEAU DE L'ANODE TANDIS QUE LE CATHOLYTE CORRESPOND A LA SORTIE DU CAPILLAIRE COTE CATHODE 489
FIGURE 241 : DIFFERENCE ENTRE LONGUEUR TOTALE D'UN CAPILLAIRE L_T D'EC ET LA LONGUEUR DE SEPARATION L_D 490
FIGURE 242 : REPRESENTATION DE LA MIGRATION D'UN ZWITTERION EN FONCTION DU PH 490
FIGURE 243 : ISOMERISATION DU RETINAL SUITE A L'ABSORPTION D'UN PHOTON DANS LES CELLULES PHOTOSENSIBLES DE LA RETINE. CELA ENTRAINE UN « CHANGEMENT CONFORMATIONNEL » DE LA RHODOPSINE ET LA TRANSDUCTION DU SIGNAL LUMINEUX POUR RECREER DANS L'AIRE VISUELLE DU CERVEAU UNE IMAGE. 492
FIGURE 244 : STRUCTURE DE L'ADENOSINE DIPHOSPHATE 493
FIGURE 245 : EXEMPLE D'EFFET DU COMPLEXE $G_{BГ}$ EN TANT QUE SECOND MESSAGER, DANS LE CAS D'UN RECEPTEUR HISTAMINIQUE, QUI VA ENTRAINER L'HYDROLYSE D'UN PHOSPHOGLYCERIDE PAR LA PHOSPHOLIPASE A_2 ACTIVEE 493
FIGURE 246 : STRUCTURE OBTENUE PAR CRISTALLOGRAPHIE DE LA MELITTINE SOUS LA FORME DE L'HOMOTETRAMERE BIOLOGIQUEMENT ACTIF AVEC LA REPRESENTATION DES CHAINES LATERALES DES RESIDUS IMPLIQUES DANS LES INTERACTIONS AVEC L'ORGANISME DANS LEQUEL EST INJECTE PAR PIQURE LE VENIN D'ABEILLE. CE POLYPEPTIDE EST UN PUISSANT ACTIVATEUR DE LA PLA2 QUI VA ENTRAINER UNE REACTION INFLAMMATOIRE, LA ROUGEUR AUTOUR DE LA PIQURE D'ABEILLE PAR EXEMPLE 494
FIGURE 247 : EXEMPLE D'EFFET DU COMPLEXE $G_{BГ}$ EN TANT QUE SECOND MESSAGER SUR LA PHOSPHOLIPASE A_2 AMENANT A LA PRODUCTION DE MOLECULES MEDIATRICE DE LA REACTION INFLAMMATOIRE QUI SUIT DES MORSURES D'ANIMAUX VENIMEUX OU DES PIQURES D'INSECTES. 495
FIGURE 248 : A GAUCHE, STRUCTURE OBTENUE PAR CRISTALLOGRAPHIE DU RECEPTEUR MUSCARINIQUE AVEC UN ANTAGONISTE LIEE AU SITE D'INTERACTION, LE QNB (POUR « 3-QUINUCLIDINYL-BENZILATE ») ET SA PROTEINE G ASSOCIEE. A DROITE, L'ACETYLCHOLINE, AGONISTE NATUREL DES RECEPTEURS MUSCARINIQUES ET NICOTINIQUES ET LA MUSCARINE, AGONISTE UTILISE

POUR DIFFERENCIER LES RECEPTEURS NICOTINIQUES ET MUSCARINIQUES AYANT UNE BIEN PLUS FORTE AFFINITE POUR CES DERNIERS. 496
FIGURE 249 : SITES D'ACTIVITE ENZYMATIQUE DES DIFFERENTES CLASSES DE PHOSPHOLIPASES 497
FIGURE 250 : EXEMPLE DE REACTION CATALYSEE PAR LA PHOSPHOLIPASE C QUI ABOUTIT A LA FORMATION D'IP_3, UN SECOND MESSAGER 497
FIGURE 251 : STRUCTURE DE LA PROTEINE DE MAMMIFERE PLC-B2 OBTENUE PAR CRISTALLISATION AVEC LIEN X-Y (HELICE A), DOMAINE C2 (FEUILLETS B), MAINS EF (HELICES A), TONNEAU TIM (HELICES A) ET LE DOMAINE D'HOMOLOGIE DE PLECKSTRINE (EN BLEU) 498
FIGURE 252 : ACTION DE L'ENZYME PLA_1 SUR LA PHOSPHATIDYLCHOLINE (PHOSPHOLIPIDE DE GAUCHE) QUI PRODUIT UN LYSOPHOSPHOLIPIDE ET UN ACIDE GRAS A PARTIR DE PHOSPHOLIPIDES 500
FIGURE 253 : STRUCTURE CRISTALLINE DE LA PHOSPHOLIPASE A1 COCRISTALLISEE AVEC DU POLYETHYLENEGLYCOL OBTENUE EN 2001 PAR MURAYAMA ET AL. LES CHAINES LATERALES DES RESIDUS IMPLIQUES DANS LA LIAISON AU LIGAND SONT REPRESENTEES EN BATONNETS. 500
FIGURE 254 : STRUCTURE DU ROUGE DE PHENOL (GAUCHE) ET DE LA PHENOLPHTALEINE (DROITE) 503
FIGURE 255 : EVOLUTION DE LA COLORATION D'UNE SOLUTION DE ROUGE DE PHENOL EN FONCTION DU PH 504

Liste des illustrations – Partie D – Partie expérimentale

ILLUSTRATION 1 : PHOTOGRAPHIE LEGENDEE DU SYNTHETISEUR DE PEPTIDES CEM LIBERTY 391
ILLUSTRATION 2 : PHOTOGRAPHIE LEGENDEE DE LA PLATE-FORME DE SYNTHESE EN FAST SPPS 391
ILLUSTRATION 3 : PHOTOGRAPHIE LEGENDEE DE L'HPLC ANALYTIQUE AGILENT 392
ILLUSTRATION 4 : PHOTOGRAPHIE LEGENDEE DE L'ANALYSEUR A TRIPLE QUADRIPOLE POUR L'ANALYSE LC-MS DE ROUTINE 393
ILLUSTRATION 5 : PHOTOGRAPHIE LEGENDEE DU SYNAPT G2-S 395
ILLUSTRATION 6 : PHOTOGRAPHIE LEGENDEE DE L'HPLC PREPARATIVE MANUELLE 396
ILLUSTRATION 7 : PHOTOGRAPHIE LEGENDEE DE L'HPLC PREPARATIVE AUTOMATIQUE WATERS 397
ILLUSTRATION 8 : PHOTOGRAPHIE LEGENDEE DE L'HPLC PREPARATIVE AUTOMATIQUE GILSON 399
ILLUSTRATION 9 : PHOTOGRAPHIE LEGENDEE DE L'ANALYSEUR RMN 300 MHZ 400
ILLUSTRATION 10 : PHOTOGRAPHIE LEGENDEE DU TRIPLE QUANDRIPOLE THERMOFISCHER SCIENTIFIC 403
ILLUSTRATION 11 ; PHOTOGRAPHIE LEGENDEE DE LA PLATE-FORME A FILTRATION BRANDEL 404
ILLUSTRATION 12 : PHOTOGRAPHIE DE LA CENTRIFUGEUSE 405
ILLUSTRATION 13 : PHOTOGRAPHIE LEGENDEE DU THERMOMIXEUR 405
ILLUSTRATION 14 : PHOTOGRAPHIE LEGENDEE DES DEUX BALANCES DE PRECISION UTILISEES POUR LES PESEES DE PEPTIDES 406
ILLUSTRATION 15 : PHOTOGRAPHIE LEGENDEE D'UN PH-METRE UTILISE POUR L'ANALYSE PRECISE DE PH DE SOLUTION DE PEPTIDES 407
ILLUSTRATION 16 : PHOTOGRAPHIE LEGENDEE DE L'APPAREIL SERVANT A L'ANALYSE PAR ELECTROPHORESE CAPILLAIRE 407
ILLUSTRATION 17 : PHOTOGRAPHIE DE L'ANALYSEUR ELEMENTAIRE « ELEMENTAR » 408
ILLUSTRATION 18 : PHOTOGRAPHIE LEGENDEE DU SPECTROPHOTOMETRE UV-VISIBLE 408
ILLUSTRATION 19 : PHOTOGRAPHIE LEGENDEE DU NEBULISEUR SUNCOLLECT 409

Liste des molécules – Partie B – Travaux de recherche

Chapitre 2 : Le projet AVP/V_{1A}

MR 1 : FRAGMENT HCCA-D_4, SYNTHETISE AVANT LA PROTECTION DE LA FONCTION ALCOOL POUR L'OBTENTION DE MR 6-D_4 220
MR 2 : SYNTHESE DE ^{T}BOC-HCCA ET ^{T}BOC-HCCA-D_4 POUR L'OBTENTION DE MR 6-D_0 ET MR 6-D_4 220
MR 3 : SYNTHESE DU FRAGMENT ACIDE 3-(4-^{T}BOC-HYDROXYPHENYL)PROPANOÏQUE POUR L'OBTENTION DE MR 5 221
MR 4 : AVP 221
MR 5 : HOMO-HO-LVA 222
MR 6 : LIGAND TRACEUR POUR LE RECEPTEUR MODELE V_{1A} SOUS FORME HYDROGENEE (LEGERE, D_0) ET DEUTEREE (LOURDE, D_4). 223

MR 7 : Sequence peptidique modele 224

Chapitre 3 : Le projet CCKB/CCKB-R

MR 8 : Synthese de l'acide amine Fmoc-Ahx-OH a partir d'acide 6-aminohexanoïque pour l'obtention de MR 10-D_0 et MR 10-D_4 341
MR 9 : Ligand traceur modifie pour le second recepteur modele avec le residu tryptophane, CCKB-R, synthese en version hydrogenee (legere) et deuteree (lourde) 342
MR 10 : Ligand traceur modifie pour le second recepteur modele, CCKB-R, synthese sous forme hydrogenee (legere) et deuteree (lourde) 342
MR 11 : Synthese de l'oxindolyl-L-alanine (Oia). Le premier stereoisomere (MR 11-A) a ete designe arbitrairement a gauche et le second stereoisomere (MR 11-B) a droite 343
MR 12 : Kynurenine 345
MR 13 : Stereosisomeres identifies de la dioxindolyl-L-alanine ; a gauche le stereoisomere A arbitrairement choisi et a droite le stereoisomere B 346
MR 14 a gauche, premier marqueur a charge preformee obtenu et MR 15 a droite, seconde generation de marqueur 384
MR 16 : Peptide construit sur la sequence modele de MR 6-D_0 en substituant l'HCCA par le marqueur a charge preformee MR 14 p.392 387

Liste des schémas réactionnels – Partie A – Contexte bibliographique

Chapitre 4 : La synthèse peptidique en quatre points : principe, stratégies, agents de couplages et choix pour les peptides synthétisés

Schema reactionnel 1 : Premieres syntheses de dipeptides par T. Curtius suivit par E. Fischer en 1901 193
Schema reactionnel 2 : Inversion de configuration absolue du C_A un acide amine par formation d'oxazolone protonee. Cela se produit lorsque la fonction acide carboxylique est activee sur un dipeptide (ou plus) dont l'avant-dernier acide amine n'est pas une glycine pour la formation d'une liaison peptidique 196
Schema reactionnel 3 : Schema reactionnel de preparation du chlorure de 1,2-dimethylindole-3-sulfonyle (MIS-Cl) et de la protection de la Fmoc-Arg(MIS)-OH a partir d'une Z-Arg-OH commerciale 198
Schema reactionnel 4 : Reaction de formation de 3-(1-piperidyl)alanine a partir d'une cysteine protegee sur sa chaine laterale par le groupement Acm (pour « Acetamidomethyle ») 199
Schema reactionnel 5 : Formation d'une liaison peptidique en solution dans le cas ou la synthese est effectuee en strategie « Fmoc/tBu » 199
Schema reactionnel 6 : Formation de liaison amide sur support solide. En l'occurrence, il s'agit de l'ancrage du premier acide amine d'une chaine de peptide amide (bras rink amide) 201
Schema reactionnel 7 : Schema reactionnel de formation de liaison peptidique *in situ* a l'aide de carbodiimides. Trois voies mecanistiques sont possibles parmi lesquelles la formation de l'ester active apres attaque de l'acide carboxylique de l'acide amine a coupler sur le carbodiimide (A) ; la formation directe de la liaison peptidique par reaction de l'amine libre du peptide en croissance sur l'O-acylisouree (B) ; la formation d'un anhydride de l'acide amine a coupler suivie de la formation de la liaison peptidique par attaque nucleophile de l'amine libre (C) 204
Schema reactionnel 8 : Mecanisme de formation de *N*-acyluree inactive lors d'un couplage peptidique avec des carbodiimides en tant qu'agent activant 205
Schema reactionnel 9 : Formation de liaison peptidique a l'aide de sels d'uroniums (A) et structures d'agents activant alternatifs (B) 206

SCHEMA REACTIONNEL 10 : FORMATION DE LIAISON PEPTIDIQUE A L'AIDE DE SELS D'URONIUMS (A) ET STRUCTURES DES URONIUMS APRES ETUDES CRISTALLOGRAPHIQUES (B). CELLES-CI ONT MONTRE L'EXISTENCE DE SELS D'IMMINIUMS 206
SCHEMA REACTIONNEL 11 : MECANISME REACTIONNEL DE GUANIDINATION D'UN PEPTIDE EN CROISSANCE LORS DE L'UTILISATION DE SELS D'URONIUMS COMME L'HATU MARQUANT L'ARRET DE LA CONSTRUCTION PEPTIDIQUE 207
SCHEMA REACTIONNEL 12 : MECANISME DE FORMATION DE LIAISON PEPTIDIQUE EN UTILISANT LE COMU ET UN EQUIVALENT DE BASE. IL EST AUSSI POSSIBLE D'INTRODUIRE UN DEUXIEME EQUIVALENT DE BASE QUI AGIRA AU NIVEAU DE LA SUBSTITUTION NUCLEOPHILE DE L'AMINE LIBRE DU PEPTIDE EN CROISSANCE POUR LA DEPROTONER 208
SCHEMA REACTIONNEL 13 : MECANISME D'ARRET DE LA CROISSANCE D'UN PEPTIDE DU A L'ACTION DE L'HODHBT SUR LUI-MEME DANS LE CADRE DE L'UTILISATION CONJOINTE DE DCC. L'HODHBT REAGIT SUR LUI-MEME POUR DONNER UNE TRIAZINE AROMATIQUE 210
SCHEMA REACTIONNEL 14 : ACTIVATION D'UN ACIDE AMINE SOUS FORME DE FLUORURE A PARTIR DE FLUOROFORMAMIDINIUM POUR LA FORMATION D'UNE LIAISON PEPTIDIQUE 210
SCHEMA REACTIONNEL 15 : MECANISME PROPOSE DE FORMATION D'UN DERIVE A-AMINOCROTONIQUE (A) PAR ACTIVATION AU FLUOROFORMAMIDINIUM DE LA THREONINE ET DE Δ-LACTAME DANS LE CAS DE L'ARGININE (B). LA REACTIVITE DU FLUORURE D'ACIDE FACILITE LA FORMATION DU CYCLE A 4 CHAINONS AVANT L'OUVERTURE DU CYCLE PAR ABSTRACTION DU PROTON PORTE PAR LE C_A 211
SCHEMA REACTIONNEL 16 : SCHEMA REACTIONNEL DE FORMATION D'UNE LIAISON PEPTIDIQUE GRACE A UN AGENT ACTIVANT DE TYPE TRIAZINE EN PRESENCE DE NMM 212

Liste des schémas réactionnels – Partie B – Travaux de recherche

Chapitre 3 : Le projet CCKB/CCKB-R

SCHEMA REACTIONNEL 17 : VOIES DE SYNTHESE D'ACIDES AMINES MODIFIES A PARTIR DU TRYPTOPHANE EN SERIE BOC/BZL ET FMOC/^{T}BU 343
SCHEMA REACTIONNEL 18 : PROPOSITION DE MECANISME REACTIONNEL POUR LA FORMATION DE KYNURENINE A PARTIR D'OXINDOLYL-L-ALANINE (OIA) FAISANT INTERVENIR LA THEORIE DES ORBITALES MOLECULAIRES (A) AU SERVICE DE L'ASPECT MECANISTIQUE (B) 345
SCHEMA REACTIONNEL 19 : PROPOSITION DE MECANISME REACTIONNEL POUR LA FORMATION DE DIOXINDOLYL-L-ALANINE (DIOIA) A PARTIR D'OXINDOLYL-L-ALANINE (OIA) AVEC ASSISTANCE DE LA THEORIE DES ORBITALES MOLECULAIRES 346
SCHEMA REACTIONNEL 20 : SYNTHESE DE FMOC-KYN-OH EN ONE-POT 348
SCHEMA REACTIONNEL 21 : SYNTHESE EN ONE-POT DE FMOC-DIOIA-OH 348
SCHEMA REACTIONNEL 22 : SYNTHESE EN ONE-POT DE ^{T}BOC-KYN-OH (A GAUCHE) ET ^{T}BOC-DIOIA-OH (A DROITE) 349

Liste des spectres – Partie B – Travaux de recherche

Chapitre 2 : Le projet AVP/V_{1A}

SPECTRE 1 : SPECTRE DE MASSE OBTENU PAR MALDI-TOF DU PEPTIDE MR 7 SELON LA METHODE D'ANALYSE STANDARD DE PEPTIDES 228
SPECTRE 2 : SPECTRE DE MASSE OBTENU SUR SYSTEME ZQ 2 000 POUR L'AVP, AVEC LES IONS MONO- ET DICHARGES 229
SPECTRE 3 : SPECTRE DE MASSE OBTENU SUR SYSTEME ZQ 2 000 POUR LE PEPTIDE HOMO-HO-LVA AVEC LES IONS MONO- ET DICHARGES 230
SPECTRE 4 : SPECTRES DE MASSE OBTENU SUR SYSTEME ZQ 2 000 POUR LES PEPTIDES MR 6–D_0 (A GAUCHE) ET MR 6–D_4 (A DROITE), AVEC LES IONS MONO- ET DICHARGES 230
SPECTRE 5 : SPECTRES DE MASSE DUE PEPTIDE MR 7 AVEC LES IONS MONO-, DI- ET TRICHARGES OBTENUS SUR SYSTEME ZQ 2 000. EN HAUT, LE SPECTRE DU PEPTIDE DEPROTEGE EN N-TERMINAL ; EN BAS, LE SPECTRE DU PEPTIDE ANCRE SUR RESINE AVEC SA PROTECTION DE TYPE FMOC EN N-TERMINAL APRES MICRO CLIVAGE AU TFA 231
SPECTRE 6 : SPECTRES DE FRAGMENTATION DE L'AVP OBTENU SUR MALDI-TOF/TOF ULTRAFLEX III, BRUKER DALTONICS© 232

Spectre 7 : Spectres de fragmentation de l'Homo-HO-LVA obtenu sur MALDI-ToF/ToF Ultraflex III, Bruker Daltonics© 233
Spectre 8 : Spectres de fragmentation des peptides MR 6–D_0 (en haut) et MR 6–D_4 (en bas) obtenus sur MALDI-ToF/ToF Ultraflex III, Bruker Daltonics© 234
Spectre 9 : Spectre de fragmentation du peptide MR 7 obtenu sur MALDI-ToF/ToF Ultraflex III, Bruker Daltonics© 235
Spectre 10 : Spectres du peptide MR 6 – D_0 obtenus sur Synapt G2-S avec source ESI+. A gauche, la comparaison entre le massif isotopique theorique et experimental ; a droite, la comparaison entre l'analyse du peptide lyophilise en sortie de synthese (2014) et 2 ans plus tard (2016)..... 242
Spectre 11 : Spectres du peptide MR 6– D_4 obtenus sur Synapt G2-S avec source ESI+. A gauche, la comparaison entre le massif isotopique theorique et experimental ; a droite, la comparaison entre l'analyse du peptide lyophilise en sortie de synthese (2014) et 2 ans plus tard (2016)..... 242
Spectre 12 : Observation d'adduits de matrice HCCE apres depot sur plaque Anchorchip..... 262
Spectre 13 : Illustration de la limite de detection du peptide MR 6-D_0 a environ 5.10^{-13} mol.L^{-1} ou 0,5 amol deposees dans la matrice HCCE methyle, analyse repetee 3 fois 264

Chapitre 3 : Le projet CCKB/CCKB-R

Spectre 14 : Spectres de masse obtenus par MALDI-ToF des peptides MR 9–D_0 et MR 9–D_4 selon la methode d'analyse standard de peptides 351
Spectre 15 : Spectres de masse obtenus par MALDI-ToF des peptides MR 10–D_0 et MR 10–D_4 selon la methode d'analyse standard de peptides 351
Spectre 16 : Spectres de masse obtenu sur systeme ZQ 2 000 pour les peptides MR 9–D_0 (en haut) et MR 9–D_4 (en bas), avec les ions mono- et dicharges avec une perte d'eau systematique sur l'ion dicharge 352
Spectre 17 : Spectres de masse obtenu sur systeme ZQ 2 000 pour les peptides MR 10-D_0 (en haut) et MR 10-D_4 (en bas), avec les ions mono- et dicharges avec une perte d'ammoniac et d'eau sur l'ion dicharge 353
Spectre 18 : Spectre de fragmentation du peptide MR 9–D_0 obtenu sur MALDI-ToF/ToF Ultraflex III, Bruker Daltonics© 353
Spectre 19 : Spectre de fragmentation du peptide MR 9–D_4 obtenus sur MALDI-ToF/ToF Ultraflex III, Bruker Daltonics© 354
Spectre 20 : Spectre de fragmentation du peptide MR 10-D_0 obtenu sur MALDI-ToF/ToF Ultraflex III, Bruker Daltonics© 355
Spectre 21 : Spectre de fragmentation du peptide MR 10-D_4 obtenu sur MALDI-ToF/ToF Ultraflex III, Bruker Daltonics© 355
Spectre 22 : Spectre de masse zoome de l'echantillon de peptide stocke (synthetise par G. MIRALLES et correspondant au peptide MR 9-D_0) montrant ses differents produits d'oxydation..... 356
Spectre 23 : Spectre MALDI-MS du peptide MR 9-D_4 seul destine a evaluer la proportion d'hydrogene dans cet echantillon deutere..... 358

Liste des spectres – Partie D – Partie expérimentale

Spectre 24 : Spectre MALDI-ToF-MS du peptide MR 4 – AVP..... 427
Spectre 25 : Spectre MALDI-ToF-MS du peptide MR 5 – Homo-HO-LVA 428
Spectre 26 : Spectre MALDI-ToF-MS du peptide MR 6 – D_0..... 428
Spectre 27 : Spectre MALDI-ToF-MS du peptide MR 6 – D_4..... 429

Liste des tableaux – Partie A – Contexte bibliographique

Chapitre 1 : La pharmacologie : présentation des RCPG, théorie de la liaison d'un ligand à son récepteur et approches actuelles pour le screening de récepteurs

TABLEAU 1 : TABLEAU PRESENTANT LES RECEPTEURS MUTES ET ACTIVES DE MANIERE CONSTITUTIVE (EN PERMANENCE) AVEC LA PATHOLOGIE ASSOCIEE RETROUVEE CHEZ L'HOMME ET L'ANIMAL 28
TABLEAU 2 : TABLEAU PRESENTANT LES RECEPTEURS MUTES AVEC PERTE D'ACTIVITE CONSTITUTIVE ET LA PATHOLOGIE ASSOCIEE 28
TABLEAU 3 : CARTE D'IDENTITE DU RECEPTEUR V_{1A} 38
TABLEAU 4 : CARTE D'IDENTITE DU RECEPTEUR B A LA CHOLECYSTOKININE 40
TABLEAU 5 : TYPES D'EXPERIMENTATION POSSIBLES POUR CARACTERISER UN RECEPTEUR DE TYPE RCPG DU POINT DE VUE FONCTIONNEL. 41
TABLEAU 6 : RADIOISOTOPES UTILISES EN PHAMACOLOGIE PRESENTANT LES DEMI-VIES, LE TYPE DE RAYONNEMENT EMIS, L'ENERGIE EMISE ET LES MOYENS DE DETECTION 48
TABLEAU 7 : AVANTAGES ET INCONVENIENTS DE LA FLUORESCENCE APPLIQUEE AUX SCIENCES DU VIVANT 53
TABLEAU 8 : TABLEAU RESUME DES PRINCIPALES TECHNIQUES DE CRIBLAGE DE RCPG 58
TABLEAU 9 : AVANTAGES ET INCONVENIENTS DE LA QUANTIFICATION EN MODE MS ET MS/MS 67
TABLEAU 10 : FORCES ET LIMITATIONS DES ETALONS POUR SID POUR LA QUANTIFICATION ABSOLUE DE PROTEINES. - : FAIBLE ; + : BONNE ; ++ TRES BONNE ; +++ : EXCELLENTE 116
TABLEAU 11 : RESUME DES TECHNIQUES DE QUANTIFICATION PAR MARQUAGE CHIMIQUE, METABOLIQUE ET DE TYPE LABEL-FREE .. 128
TABLEAU 12 : RESUME DES STRUCTURES DES PRINCIPALES MATRICES UTILISEES POUR L'ANALYSE DE BIOMOLECULES, LEUR DOMAINE SPECTRAL ET LA LONGUEUR D'ONDE DE TRAVAIL 147
TABLEAU 13 : PROPRIETES INTRINSEQUES DE MOLECULES POUVANT ETRE CONSIDEREES COMME DES BONNES MATRICES MALDI .. 148
TABLEAU 14 : RESUME DES PRINCIPALES TECHNIQUES DE DEPOT 151
TABLEAU 15 : BASICITE EN PHASE GAZEUSE (BG) DE QUELQUES BASES ANIONIQUES ET NEUTRES TIREES DU SITE HTTP://WEBBOOK.NIST.GOV/ 161
TABLEAU 16 : POTENTIEL D'IONISATION PI DES MATRICES (EV) 162
TABLEAU 17 : AFFINITES PROTONIQUES (AP) DE MATRICES ET D'ANALYTES 167
TABLEAU 18 : AFFINITES CATIONIQUES DE MATRICES ET DE BIOMOLECULES 168
TABLEAU 19 : PARAMETRES UTILISES POUR LES SIMULATIONS DU MODELE « COUPLED PHYSICAL, CHEMICAL AND MOLECULAR DYNAMICS » (CPCMD) 175
TABLEAU 20 : RESUME D'ANCRES ET DE LIENS REPRESENTATIFS GREFFES SUR LES BILLES DE RESINE UTILISEES EN SYNTHESE PEPTIDIQUE SUR SUPPORT REGROUPEES PAR COMPATIBILITE ENVERS LES DEUX STRATEGIES DE SYNTHESE (FMOC/^{T}BU ET BOC/BZL), ET PAR TYPE DE PEPTIDE PRODUIT APRES CLIVAGE 202
TABLEAU 21 : PRESENTATION DES DIFFERENTS PEPTIDES SYNTHETISES POUR CES TRAVAUX DE RECHERCHE 213
TABLEAU 22 : MASSIFS ISOTOPIQUES DU SPECTRE DU PEPTIDE MR 4 AVEC LES ASSIGNATIONS CORRESPONDANTES 224
TABLEAU 23 : MASSIFS ISOTOPIQUES DU SPECTRE DU PEPTIDE MR 5 AVEC LES ASSIGNATIONS CORRESPONDANTES 225
TABLEAU 24 : MASSIFS ISOTOPIQUES OBSERVES SUR LE SPECTRE DE MASSE DU PEPTIDE MR 6 – D_0 AVEC LEUR ASSIGNATION 226
TABLEAU 25 : MASSIFS ISOTOPIQUES OBSERVES SUR LE SPECTRE DE MASSE DU PEPTIDE MR 6 – D_4 AVEC LEUR ASSIGNATION 226
TABLEAU 26 : CONDITIONS OPTIMALES D'ANALYSE RETENUES 239
TABLEAU 27 : ANALYSE ELEMENTAIRE DU PEPTIDE MR 6 241
TABLEAU 28 : MESURES DE PH DES SOLUTIONS DES DIFFERENTS PEPTIDES A 10^{-5} MOL.L^{-1} PREPAREES DANS H_2O + 1 % TFA PAR RAPPORT A UNE SOLUTION DE REFERENCE (APPAREILLAGE EN PARTIE D – *PARTIE EXPERIMENTALE*, PARAGRAPHE I.I.2 P.415) 244
TABLEAU 29 : PROPORTIONS UV DES PEPTIDES MIS EN JEU DANS LES EXPERIENCES DE SATURATION ET DE COMPETITION SUR PREPARATION MEMBRANAIRE DANS LE TAMPON DE LIAISON ET DANS UN MELANGE CHOISI USUELLEMENT POUR ANALYSER LES PEPTIDES EN HPLC-UV 245
TABLEAU 30 : APERÇU SYNTHETIQUE DU NOMBRE DE TIRS LASER ET DU TEMPS PASSE SUR LE MALDI ULTRAFLEX III, BRUCKER DALTONICS© POUR LE DEVELOPPEMENT ANALYTIQUE 247
TABLEAU 31 : RESUME DES PROTOCOLES DE DEPOTS UTILISES AU COURS DE CES TRAVAUX DE THESE 250

TABLEAU 32 : PRESENTATION DES AJOUTS PROGRESSIFS DE SOLVANT POUR DISSOUDRE TOTALEMENT LES CRISTAUX DE MATRICE DANS UNE SOLUTION D'ACETONE 251
TABLEAU 33 : PRESENTATION DES AJOUTS PROGRESSIFS DE SOLVANT POUR DISSOUDRE TOTALEMENT LES CRISTAUX DE MATRICE DANS UNE SOLUTION D'ACETONITRILE 252
TABLEAU 34 : CORRESPONDANCE CONCENTRATION/QUANTITE DE MATIERE DEPOSEE MONTRANT L'EFFET DE DILUTION UNE FOIS LES SOLUTIONS DEPOSEES 253
TABLEAU 35 : COMPARAISON DES COEFFICIENTS DE VARIATION ET DE LA SENSIBILITE DES MESURES EN FONCTION DU SECHAGE DES DEPOTS SUR DEUX EXPERIENCES DE SATURATION (LIAISON TOTALE ET NON SPECIFIQUE) POUR L'ENSEMBLE DES POINTS DE MESURES : 3 SERIES DE 8 POINTS DEPOSES 2 FOIS CHACUN POUR LA LIAISON TOTALE ET 3 SERIES DE 8 POINTS DEPOSES 2 FOIS CHACUN POUR LA LIAISON NON SPECIFIQUE POUR UN TOTAL DE 96 PRISES DE MESURE 254
TABLEAU 36 : SYNTHESE DES LIMITES DE DETECTION DETERMINEES POUR LES DIFFERENTS PEPTIDES MIS EN JEU DANS LES EXPERIENCES DE LIAISON DE SATURATION ET DE COMPETITION SUR PREPARATION MEMBRANAIRE. LE PEPTIDE EMC-09 EST UN ANALOGUE DU MR 5 AVEC UN ATOME DE SELENIUM EN POSITION BENZYLIQUE 268
TABLEAU 37 : ILLUSTRATION DE L'EFFET DE SUPPRESSION ANALYTE-ANALYTE ENTRE LE LIGAND TRACEUR MR 6-D_0 ET MR 4 DEPOSES AVEC LA MATRICE HCCA 272
TABLEAU 38 : EVALUATION DU TEMPS D'INCUBATION DE LA BSA SUR L'ANALYSE MALDI. L'ABREVIATION PS DESIGNE UN TUBE A HEMOLYSE EN POLYSTYRENE, PP UN MICRO-TUBE EN POLYPROPYLENE ET « * » L'ENDUCTION PREALABLE PAR DE LA BSA.... 274
TABLEAU 39 : EVALUATION DES MATERIAUX UTILISES POUR L'INCUBATION LORS DES EXPERIENCES DE PHARMACOLOGIE DU POINT DE VUE DE L'ANALYSE MALDI, A GAUCHE SANS ENDUCTION PREALABLE DE BSA ET A DROITE AVEC AJOUT DE BSA (SYMBOLISE PAR « * »). L'ENDUCTION « LOW BINDING » DES MICRO-TUBES EST SYMBOLISEE PAR « - » 275
TABLEAU 40 : EVALUATION DU PROCESSUS ANALYTIQUE GLOBAL (EXPERIENCE DE PHARMACOLOGIE ET ANALYSE MALDI) SUR L'ANALYSE MALDI 276
TABLEAU 41 : SYNTHESE DES COMPARAISONS ENTRE DIFFERENTS MATERIAUX, DIFFERENTS TEMPS D'INCUBATION DE BSA ET LES DIFFERENTS PROCEDES DE MANIPULATION GLOBAUX 276
TABLEAU 42 : DONNEES DE LA VALIDATION STATISTIQUE POUR UN ETALON A 10 NMOL.L^{-1} 283
TABLEAU 43 : DISPERSION ET BIAIS DES MESURES DE LA COURBE D'ETALONNAGE AVEC ETALON DEUTERE A 10^{-8} MOL.L^{-1} 285
TABLEAU 44 : DONNEES DE LA VALIDATION STATISTIQUE POUR UN ETALON A 1 NMOL.L^{-1} 287
TABLEAU 45 : DISPERSION ET BIAIS DES MESURES DE LA COURBE D'ETALONNAGE AVEC ETALON DEUTERE A 1 NMOL.L^{-1} 287
TABLEAU 46 : TABLEAU RESUME DES GRANDEURS STATISTIQUES POUR UN ETALON A 100 NMOL.L^{-1} 288
TABLEAU 47 : DISPERSION ET BIAIS DES MESURES DE LA COURBE D'ETALONNAGE AVEC ETALON DEUTERE A 100 NMOL.L^{-1} 289
TABLEAU 48 : ETUDE DE L'IMPACT DU NOMBRE DE TIRS LASER SUR LA QUANTIFICATION 292
TABLEAU 49 : REPRESENTATION DES RESULTATS D'UN ETALONNAGE. LA MOYENNE ET SON ERREUR ASSOCIEE, AINSI QUE LES COEFFICIENTS DE VARIATION ET LES BIAIS DES MESURES PAR RAPPORT A LA DROITE DE REGRESSION LINEAIRE SONT AFFICHES DE MEME QUE LES VALEURS THEORIQUES PROVENANT DE CETTE REGRESSION LINEAIRE ET LE BIAIS THEORIQUE PAR RAPPORT AU RAPPORT D'AIRE THEORIQUEMENT ATTENDU ET CORRESPONDANT AU RAPPORT DES CONCENTRATIONS PREPAREES DONNE PAR L'EQUATION 14 P.289 294
TABLEAU 50 : PARAMETRES UTILISES POUR L'IMAGERIE SUR DEPOTS EFFECTUES POUR UNE EXPERIMENTATION D'ETALONNAGE EN PRESENCE DE MR 6-D_0 ET MR 6-D_4 EN MELANGE 297
TABLEAU 51 : NUMEROTATION DES DEPOTS DE MR 6-D_0 ET MR 6-D_4 EN MELANGE ASSOCIES AUX CONCENTRATIONS ET QUANTITES DE MATIERES DEPOSEES POUR UN VOLUME DEPOSE DE 1 µL 297
TABLEAU 52 : NUMEROTATION DES DEPOTS DE MR 6-D_0, MR 6-D_4 ET EMC-09 EN MELANGE ASSOCIES AUX CONCENTRATIONS ET QUANTITES DE MATIERES DEPOSEES POUR UN VOLUME DEPOSE DE 1 µL 299
TABLEAU 53 : NUMEROTATION DES DEPOTS PROVENANT D'UNE MESURE DE LIAISON TOTALE ASSOCIES AUX CONCENTRATIONS ET QUANTITES DE MATIERES DEPOSEES POUR L'ANALYSE DE LA LIAISON TOTALE ET UN VOLUME DEPOSE DE 1 µL 301
TABLEAU 54 : NUMEROTATION DES DEPOTS PROVENANT D'UNE MESURE DE LIAISON NON SPECIFIQUE ASSOCIES AUX CONCENTRATIONS ET QUANTITES DE MATIERES DEPOSEES POUR L'ANALYSE DE LA LIAISON NON SPECIFIQUE CORRESPONDANTE ET UN VOLUME DEPOSE DE 1 µL 303
TABLEAU 55 : CONDITIONS OPTIMISEES DE MRM 306
TABLEAU 56 : PRESENTATION DES AIRES CORRESPONDANT AUX IONS A PARTIR DU COURANT D'IONS EXTRAITS 308

TABLEAU 57 : COMPOSITION DU TAMPON DE LIAISON « BH » 314
TABLEAU 58 : TABLEAU DONNANT LES MESURES D'ABSORBANCE DES PREPARATIONS MEMBRANAIRES DE CELLULE CHO-V_{1A} SUREXPRIMANT LE RECEPTEUR V_{1A} CCKB ET DES TITRES ASSOCIES 316
TABLEAU 59 : COMPOSITION DU TAMPON DE LIAISON TAGLITE® POUR CELLULES ENTIERES 317
TABLEAU 60 : PRESENTATION DES VALEURS MOYENNES, DE L'ERREUR SUR LA MOYENNE ET LE COEFFICIENT DE VARIATION CONCERNANT LA MESURE DE LIAISON TOTALE ET NON SPECIFIQUE POUR LA FIGURE 185 P.327 319
TABLEAU 61 : TABLEAU RESUME DES POINTS DE MESURE CONCERNANT LA MESURE DE LA CONSTANTE DE DISSOCIATION DU PEPTIDE [^{125}I]HOMO-HO-LVA ([^{125}I]MR 5) REPRESENTE PAR LA FIGURE 187 P.329 322
TABLEAU 62 : TABLEAU RESUME DES POINTS DE MESURE CONCERNANT LA CONSTANTE DE DISSOCIATION DU PEPTIDE MR 6-D_0 REPRESENTE PAR LA FIGURE 191 P.332 325
TABLEAU 63 : RESUME DES CONSTANTES DE DISSOCIATION MESUREES PAR MALDI-SID-MS ET PAR SCINTIGRAPHIE PAR EXPERIENCE DE SATURATION A L'EQUILIBRE 326
TABLEAU 64 : PRESENTATION DES VALEURS MOYENNES, DE L'ERREUR SUR LA MOYENNE ET LE COEFFICIENT DE VARIATION POUR LA FIGURE 193 P.335. LES RESULTATS SONT EXPRIMES EN POURCENTAGE DE LIAISON DU LIGAND TRACEUR, LE PEPTIDE [^{125}I]MR 5 327
TABLEAU 65 : PRESENTATION DES VALEURS MOYENNES, DE L'ERREUR SUR LA MOYENNE ET LE COEFFICIENT DE VARIATION POUR LA FIGURE 194 P.336. LES RESULTATS SONT EXPRIMES EN POURCENTAGE DE LIAISON DU LIGAND TRACEUR 329
TABLEAU 66 : PRESENTATION DES VALEURS MOYENNES, DE L'ERREUR SUR LA MOYENNE ET LE COEFFICIENT DE VARIATION POUR LA FIGURE 196 P.338. LES RESULTATS SONT EXPRIMES EN POURCENTAGE DE LIAISON DU LIGAND TRACEUR 330
TABLEAU 67 : PRESENTATION DES VALEURS MOYENNES, DE L'ERREUR SUR LA MOYENNE ET LE COEFFICIENT DE VARIATION POUR LA FIGURE 198 P.340. LES RESULTATS SONT EXPRIMES EN POURCENTAGE DE LIAISON DU LIGAND TRACEUR 333
TABLEAU 68 : RESUME DES CONSTANTES DE DISSOCIATION MESUREES PAR MALDI-SID-MS ET PAR SCINTIGRAPHIE PAR EXPERIENCE DE COMPETITION A L'EQUILIBRE 333
TABLEAU 69 : REPRESENTATION DES RESULTATS D'UN ETALONNAGE DANS LE CADRE DU PROJET AVP/V_{1A}. LA MOYENNE ET SON ERREUR ASSOCIEE, AINSI QUE LES COEFFICIENTS DE VARIATION ET LES BIAIS DES MESURES PAR RAPPORT A LA DROITE DE REGRESSION LINEAIRE SONT AFFICHES DE MEME QUE LES VALEURS THEORIQUES PROVENANT DE CETTE REGRESSION LINEAIRE ET LE BIAIS THEORIQUE PAR RAPPORT AU RAPPORT D'AIRE THEORIQUEMENT ATTENDU ET CORRESPONDANT AU RAPPORT DES CONCENTRATIONS PREPAREES DONNE PAR L'EQUATION 14 P.289 335
TABLEAU 70 : TABLEAU RESUME DES POINTS DE MESURE CONCERNANT LA CONSTANTE DE DISSOCIATION DU PEPTIDE MR 6-D_0 REPRESENTE PAR LA FIGURE 201 P.344 337
TABLEAU 71 : RESUME DES CONSTANTES DE DISSOCIATION OBTENUES PAR SATURATION ET B_{MAX} MESURES PAR MALDI-SID-MS SELON LES DEUX METHODES DE CALCULS PROPOSEES 337
TABLEAU 72 : TABLEAU RESUME DES POINTS DE MESURE CONCERNANT LA CONSTANTE DE DISSOCIATION DU PEPTIDE MR 6-D_0 REPRESENTE PAR LA FIGURE 202 P.346. LES RESULTATS SONT EXPRIMES EN POURCENTAGE DE LIAISON DU LIGAND TRACEUR 338
TABLEAU 73 : RESUME DES CONSTANTES DE DISSOCIATION OBTENUES PAR COMPETITION ET IC_{50} MESURES PAR MALDI-SID-MS SELON LES DEUX METHODES DE CALCULS PROPOSEES DANS LE CAS DU SATAVAPTAN© 339
TABLEAU 74 : ANALYSE ELEMENTAIRE DU PEPTIDE MR 10 356
TABLEAU 75 : DONNEES DE LA VALIDATION STATISTIQUE DE LA FIGURE 215 POUR UN ETALON A 1 NMOL.L^{-1} 360
TABLEAU 76 : DISPERSION ET BIAIS DES MESURES DE LA COURBE D'ETALONNAGE DE LA FIGURE 215 AVEC ETALON DEUTERE A 1 NMOL.L^{-1} 361
TABLEAU 77 : REPRESENTATION DES RESULTATS D'UN ETALONNAGE DANS LE CADRE DU PROJET CCKB-R. LA MOYENNE ET SON ERREUR ASSOCIEE, AINSI QUE LES COEFFICIENTS DE VARIATION ET LES BIAIS DES MESURES PAR RAPPORT A LA DROITE DE REGRESSION LINEAIRE SONT AFFICHES DE MEME QUE LES VALEURS THEORIQUES PROVENANT DE CETTE REGRESSION LINEAIRE ET LE BIAIS THEORIQUE PAR RAPPORT AU RAPPORT D'AIRE THEORIQUEMENT ATTENDU ET CORRESPONDANT AU RAPPORT DES CONCENTRATIONS PREPAREES DONNE PAR L'EQUATION 14 P.289 362
TABLEAU 78 : TABLEAU DONNANT LES MESURES D'ABSORBANCE DES PREPARATIONS MEMBRANAIRES DE CELLULE HEK293 SUREXPRIMANT LE RECEPTEUR CCKB ET DES TITRES ASSOCIES 364
TABLEAU 79 : TABLEAU RESUME DES POINTS DE MESURE CONCERNANT LA CONSTANTE DE DISSOCIATION DU PEPTIDE MR 10-D_0 REPRESENTE PAR LA FIGURE 219 P.373 366

TABLEAU 80 : TABLEAU RESUME DES POINTS DE MESURE CONCERNANT LA CONSTANTE DE DISSOCIATION DU PEPTIDE MR 6-D_0 REPRESENTE PAR LA FIGURE 221 P.375 368
TABLEAU 81 : TABLEAU DE COMPARAISON ENTRE LES POINTS DE MESURE CONCERNANT LA CONSTANTE DE DISSOCIATION DU PEPTIDE MR 10-D_0 REPRESENTE PAR LA FIGURE 222 P.377 SELON LA METHODE DE CALCUL 370
TABLEAU 82 : TABLEAU DE COMPARAISON ENTRE LES POINTS DE MESURE CONCERNANT LA CONSTANTE DE DISSOCIATION DU PEPTIDE MR 10-D_0 REPRESENTE PAR LA FIGURE 223 P.378 SELON LA METHODE DE CALCUL 371
TABLEAU 83 : RESUME DES CONSTANTES DE DISSOCIATION OBTENUES PAR SATURATION ET B_{MAX} MESURES PAR MALDI-SID-MS SELON LES DEUX METHODES DE CALCULS PROPOSEES. LES VALEURS DE B_{MAX} ONT ETE OBTENUES PAR EXTRAPOLATION LOGICIELLE (GRAPHPAD PRISM 6.0®) 371
TABLEAU 84 : RESUME DES PREMIERES MOLECULES SYNTHETISEES DANS LE CADRE DE FUTURS DEVELOPPEMENTS DE MARQUEURS A CHARGE PREFORMEE 386
TABLEAU 85 : RESUME DES CARACTERISATIONS DES PEPTIDES MR 4 – AVP, MR 5 - HOMO-HO-LVA, MR 6-D_0 ET MR 6-D_4 .. 416
TABLEAU 86 : RESUME DES CARACTERISATIONS DES PEPTIDES MR 9-D_0, MR 9-D_4, MR 10-D_0 ET MR 10-D_4 417
TABLEAU 87 : RESUME DES CONDITIONS DE SYNTHESE PARTICULIERE ET DES DONNEES ANALYTIQUES CONCERNANT LES MARQUEURS PORTANT UNE CHARGE PREFORMEE ET UN LIEN 419
TABLEAU 88 : RESUME DES CONDITIONS DE SYNTHESE PARTICULIERE ET DES DONNEES ANALYTIQUES CONCERNANT LES MARQUEURS PORTANT UNE CHARGE PREFORMEE 421
TABLEAU 89 : RESUME DES PRINCIPAUX HETEROELEMENTS UTILISES EN ICP-MS 486

Table des matières détaillée

REMERCIEMENTS ..... **IV**

PRODUCTIONS SCIENTIFIQUES ..... **VI**

PREAMBULE ..... **VII**

SOMMAIRE ..... **IX**

LISTE DES SIGLES ET ABREVIATIONS ..... **XI**

PARTIE A – CONTEXTE BIBLIOGRAPHIQUE **13**

CHAPITRE 1 : LA PHARMACOLOGIE : PRESENTATION DES RCPG, THEORIE DE LA LIAISON D'UN LIGAND A SON RECEPTEUR ET APPROCHES ACTUELLES POUR LE CRIBLAGE DE RECEPTEURS **14**

I. LES RCPG 15
I.A. Descriptif des RCPG *15*
I.B. Les différentes Classes de RCPG *17*
I.B.1. Classe A : les récepteurs de type rhodopsine 18
I.B.2. Classe B : les récepteurs de type sécrétine et leurs parents 19
I.B.3. Classe C : les récepteurs métabotropiques du glutamate et leurs parents 21
I.C. La transduction du signal par les protéines G *22*
I.D. Exemple de signalisation en cascade : l'action de l'adényl-cyclase *27*
I.E. Rôle des RCPG dans certaines pathologies : *28*
I.F. Importance de l'étude des RCPG en pharmacologie : une cible privilégiée *30*
I.G. Les RCPG orphelins, syndrome de l'effervescence de la recherche pharmacologique *33*
I.H. Présentation des modèles d'étude des travaux thèse *37*
I.H.1. Le récepteur à la vasopressine V_{1A} 37
I.H.2. Le récepteur CCKB-R (ou CCK2-R) 39
II. THEORIE DE LA LIAISON D'UN LIGAND A SON RECEPTEUR 40
II.A. Présentation des grandeurs mesurées *40*
II.B. Expérience de saturation de la liaison à l'équilibre *41*
II.C. Expérience de déplacement de la liaison à l'équilibre *44*
II.D. Expérience de cinétique de liaison *45*
III. APPROCHES ACTUELLES EMPLOYEES POUR LE CRIBLAGE DES RCPG 46
III.A. La radioactivité pour la mesure de la liaison d'un ligand à son récepteur *46*
III.B. La fluorescence : historique, photochimie et application à l'étude des RCPG *48*
III.B.1. Bref historique 49
III.B.2. Aspect photochimique de la fluorescence 49
III.B.3. Application de la fluorescence et du FRET à l'étude de RCPG 51
III.C. La technique HTRF, une récente amélioration du FRET *53*
III.D. La technique SPR, une approche de type « Label-free » *55*
III.E. La spectrométrie de masse MALDI-ToF comme nouvel outils de mesure de la liaison d'un ligand à son récepteur *59*
CONCLUSION 60

CHAPITRE 2 : LA QUANTIFICATION PAR DILUTION ISOTOPIQUE DE PEPTIDES **62**

I. HISTORIQUE ET FONDEMENTS DE LA METHODE SID 62
I.A. Les travaux pionniers en spectrométrie de masse par dilution isotopique (SID-MS) *62*
I.B. Les deux voies de quantification : MS^1 et MS^2 ..... *66*
I.C. La validation des méthodologies *68*
I.C.1. Première étape : l'aspect analytique 68
I.C.2. Seconde étape : le point de vue clinique 73
II. INTRODUCTION A LA QUANTIFICATION DE PEPTIDES PAR DILUTION ISOTOPIQUE EN SPECTROMETRIE DE MASSE 77

II.A. Le principe de la dilution isotopique pour la quantification de peptides et protéines 77
II.B. La spectrométrie de masse, plate-forme incontournable de caractérisation de biomolécules complexes 79
II.C. La réduction de la complexité des échantillons issus de fluides biologiques au service de la « shotgun proteomic » 82
III. LES TECHNIQUES DE MARQUAGE CHIMIQUE POUR LA QUANTIFICATION DE PEPTIDES PAR SID 85
III.A. La pêche aux protéines, ou Photoaffinity labelling 85
III.B. Les techniques de marquage conçues pour une purification par affinité : les méthodes X-CAT 88
III.B.1. La première approche de marquage isotopique combinée à une purification par affinité : ICAT 88
III.B.2. L'introduction d'hétéroéléments : les approches ECAT et MeCAT 92
III.B.3. Une approche originale sans marquage isotopique : la technique MCAT 93
III.B.4. Un second souffle pour les marqueurs ICAT : l'approche oxICAT 96
III.C. Une approche à large champ d'application : la technique MECT 97
III.D. Les marqueurs isobares appliqués en spectrométrie de masse en tandem 98
III.D.1. Une approche conçue pour la spectrométrie de masse en tandem : les marqueurs TMT 98
III.D.2. Une deuxième approche multiplexée pour la MS² : les marqueurs iTRAQ 100
III.D.3. Un double marquage pour des peptides isobares : l'approche IPTL 103
III.E. La versatilité des marqueurs isobares et les développements autour de la technique iTRAQ 105
III.E.1. L'approche mTRAQ®, ou comment tirer avantage des capacités de la MRM 105
III.E.2. L'approche aTRAQ® , ou comment quantifier un acide aminé 107
III.F. La mise en jeu de peptides protéotypiques : la technique AQUA 109
III.G. La technique IDBEST, ou comment combiner ESI, MALDI et ICP-MS 112
IV. LES TECHNIQUES A BASE DE MARQUAGE METABOLIQUE POUR LA QUANTIFICATION DE PEPTIDES PAR SID 114
IV.A. L'introduction du marquage métabolique pour la quantification par SID : les approches SILAC et SILAP 114
IV.B. Le marquage métabolique et les approches de type « bottom-up » 116
V. LA QUANTIFICATION DE PEPTIDES PAR LES APPROCHES LABEL-FREE 122
V.A. La mesure des aires de signaux MS 123
V.B. Le décompte spectral 125
CONCLUSION 135

CHAPITRE 3 : LA SPECTROMETRIE DE MASSE MALDI - APPROCHE HISTORIQUE, FONDAMENTALE ET APPLIQUEE 137

I. DEVELOPPEMENT DE LA TECHNIQUE MALDI 137
I.A. Aspect historique de l'ionisation MALDI 137
I.B. La source MALDI et l'expression fondamentale des énergies en jeu 140
I.B.1. La source MALDI et l'AP-MALDI 140
I.B.2. Le processus de désorption/ablation de la matière 142
I.C. Les matrices au cœur de l'analyse MALDI : propriétés et préparation 146
I.C.1. Des classes de matrice adaptées aux analytes cibles 146
I.C.2. A propos des propriétés des matrices 148
I.C.3. Matrice chaude ou matrice froide, quelle différence ? 148
I.C.4. Les techniques de dépôts développées 149
I.D. L'analyse MS1 en MALDI-ToF 152
I.E. L'analyse MS² en MALDI-ToF 154
II. LES MODELES POUR DECRIRE L'IONISATION MALDI 158
II.A. Le modèle des clusters aussi appelé « lucky survivor model » 158
II.B. Le modèle CPCD et la fusion énergétique ou « pooling effect» 161
II.B.1. L'étape d'ionisation primaire 161
II.B.2. La deuxième étape d'ionisation : la production des ions d'analyte à partir des ions de matrice primaires .. 165
II.C. L'expression quantitative du modèle CPCD 168
II.C.1. Modélisation de l'ionisation primaire 168
II.C.2. Mise en lumière de problématiques liées à l'ionisation secondaire 172
II.C.3. Le contre coup de l'ionisation secondaire : la dilution énergétique 172

II.D. L'arrivée d'une nouvelle dimension du modèle CPCD : la dynamique moléculaire *173*
II.D.1. L'apport de la dynamique moléculaire 173
II.D.2. Une réaction parasite modélisée : la recombinaison d'ion par effet tunnel 175
II.E. Les aspects partagés par les modèles d'ionisation MALDI *177*
II.E.1. L'ionisation de la matrice et l'observation d'adduits 177
II.E.2. Les phénomènes de surface 178
II.E.2.a. Impact des surfaces métalliques sur l'ionisation des échantillons 178
II.E.2.b. L'influence de la structuration de surfaces 180
II.E.3. Les effets de suppression de matrice et d'analyte 181
III. LA QUANTIFICATION EN SPECTROMETRIE DE MASSE MALDI-TOF 182
III.A. La dilution isotopique en MALDI-ToF-MS *183*
III.B. Les approches par étude thermodynamique : SUPREX et PLIMSTEX *186*
CONCLUSION 190

CHAPITRE 4 : LA SYNTHESE PEPTIDIQUE EN QUATRE POINTS : PRINCIPE, STRATEGIES, AGENTS DE COUPLAGES ET CHOIX POUR LES PEPTIDES SYNTHETISES 193

APPROCHE HISTORIQUE DE LA SYNTHESE PEPTIDIQUE 193
I. PRINCIPES FONDAMENTAUX DE LA SYNTHESE PEPTIDE 194
I.A. Les acides aminés protéogènes, structure et nomenclature *194*
I.B. Principe de base *195*
II. LA PROTECTION DES ACIDES AMINES AU SERVICE DES STRATEGIES DE SYNTHESE EN PHASE LIQUIDE ET SOLIDE 196
II.A. De l'utilité des groupements protecteurs *196*
II.B. Avancées à propos des protections de chaînes latérales *197*
II.C. L'approche en solution pour la synthèse peptidique *199*
II.D. La synthèse peptidique en phase solide (SPPS) *200*
II.D.1. La construction du peptide 200
II.D.2. Ancres et bras représentatifs greffés sur billes de résine 202
III. AGENTS DE COUPLAGES HISTORIQUES ET RECENTES AVANCEES 203
III.A. Les agents historiques de couplage peptidique, les carbodiimides *203*
III.A.1. Utilisation en synthèse : formation d'O-acylisourée 203
III.A.2. Réaction parasite : le passage d'une O-acylisourée à une N-acylurée 205
III.B. Une première alternative aux carbodiimides, les sels de phosphoniums et d'uroniums *205*
III.B.1. Les sels de phosphoniums 205
III.B.2. Les sels d'uroniums 206
III.B.3. La principale déconvenue des sels d'uroniums : la guanidination 207
III.B.4. Une troisième génération de sels d'uronium, le COMU® 207
III.C. Le phosphore neutre créateur de liaison peptidique, les agents organophosphorés *209*
III.C.1. Application en synthèse peptidique 209
III.C.2. Réaction parasite des agents de couplage organophosphorés : cas du HODhbt 209
III.D. L'avancée constituée par les agents de type fluoroformamidinium *210*
III.D.1. Une forte réactivité en synthèse peptidique 210
III.D.2. Les réactions secondaires des fluoroformamidinium : spécificité selon l'acide aminé 210
III.E. Les triazines comme plate-forme de création de liaison peptidique *211*
IV. PRESENTATION DES PEPTIDES SYNTHETISES DANS LE CADRE DE CES TRAVAUX DE THESE 212
CONCLUSION 213

PARTIE B – TRAVAUX DE THESE 215

CHAPITRE 1 : PRESENTATION DU PROJET DE RECHERCHE 216

I. LE CONTEXTE DANS LEQUEL S'INSCRIVENT CES TRAVAUX DE THESE 216
II. LE CHEMINEMENT SCIENTIFIQUE A L'ORIGINE DE CE PROJET DE RECHERCHE 216

CHAPITRE 2 : LE PROJET AVP/V_{1A} 219

I. INTRODUCTION 219

II. LES DIFFERENTS MODES DE SYNTHESE 219
II.A. Synthèse manuelle de fragments 219
II.B. La synthèse sur support solide automatisée 221
II.C. La synthèse ultra rapide : Fast SPPS 223
III. CONTROLE QUALITE DES PEPTIDES 224
III.A. L'analyse des peptides d'intérêt par MALDI-MS 224
III.A.1. MR 4 – AVP 224
III.A.2. MR 5 – Homo-HO-LVA 225
III.A.3. Les peptides MR 6 – D_0 et MR 6 – D_4 225
III.A.4. Analyse des massifs isotopiques suspects à m/z = 1128,3 et 1149,8 dans le spectre de masse du MR 6 – D_0 227
III.A.5. Le peptide modèle – MR 7 228
III.B. Contrôle par HPLC-UV 228
III.B.1. MR 4 – AVP 228
III.B.2. MR 5 – Homo-HO-LVA 229
III.B.3. Peptides MR 6 – D_0 et MR 6 – D_4 229
III.C. Evaluation des états d'ionisation des peptides par ESI-MS 229
III.C.1. MR 4 – AVP 229
III.C.2. MR 5 – Homo-HO-LVA 229
III.C.3. Peptides MR 6–D_0 et MR 6–D_4 230
III.C.4. Peptide modèle MR 7 230
III.D. Contrôle par MS² : caractérisation des séquences peptidiques 231
III.D.1. MR 4 – AVP 232
III.D.2. MR 5 – Homo-HO-LVA 232
III.D.3. Peptides MR 6–D_0 et MR 6–D_4 233
III.D.4. Peptide modèle MR 7 235
III.E. Etude du peptide MR 6 par électrophorèse capillaire 236
III.F. Analyse élémentaire du peptide MR 6 240
IV. ETUDE PAR SPECTROMETRIE DE MASSE MALDI DE LA STABILITE DU PEPTIDE MR 6 241
IV.A. Stabilité du peptide en condition de stockage et en solution 241
IV.A.1. Contrôle de la stabilité de l'échantillon solide à long terme 241
IV.A.2. Stabilité au pH de travail en pharmacologie et dans différents tampons 242
IV.B. Etude du pH des peptides en solution impliqués dans les expériences de pharmacologie sur les récepteurs V_{1A} et CCKB-R 244
IV.C. Etude de l'équilibre E/Z du MR 6 – D_0 244
V. DEVELOPPEMENTS METHODOLOGIQUES EN SPECTROMETRIE DE MASSE MALDI : ETUDE DE LA DETECTION DES PEPTIDES ET DU DEPOT AVEC MR 6-D_0 247
V.A. Protocoles de dépôts développés 247
V.A.1. Discussion à propos des protocoles de dépôt 247
V.A.2. Etude de la saturation de la matrice HCCE méthyle 251
V.A.3. Etude de la dilution créée par les protocoles de dépôt 252
V.A.4. Influence de la température de séchage 253
V.A.5. Optimisation de la technique de dépôt et des conditions de dépôt 255
V.B. Etude sur les dépôts 259
V.B.1. Discussion à propos de l'épaisseur de matrice 259
V.B.2. Observation des clusters de matrice 262
V.C. Etude de la détection des différents peptides utilisés : MR 4-AVP, MR 5-Homo-HO-LVA et MR 6-D_0. 264
V.C.1. Discussion des résultats concernant la détection avec la matrice HCCE 264
V.C.2. Etude sur la détection des peptides MR 6-D_0 et du MR 5-Homo-HO-LVA et MR 7 codéposés 267
V.C.3. Comparaison des limites de détection 268
VI. ETUDES AUTOUR DU PROCESSUS DE MANIPULATION DE L'ECHANTILLON 269
VI.A. Comportement du MR 6-D_0 face à des composés en mélange et étude d'interférences en conditions de quantification avec la matrice HCCE 269
VI.A.1. Evaluation de l'impact de l'ajout d'un compétiteur vis-à-vis de la quantification du peptide d'intérêt 269
VI.A.2. Etude du phénomène supposé d'interférences dans la matrice HCCA 272
VI.B. Etude sur le conditionnement de l'échantillon 273

VII. ETUDE STATISTIQUE DE LA QUANTIFICATION DIRECTE ET ETALONNAGE EXTERNE 277
VII.A. Principe de la validation statistique d'études analytiques 277
VII.B. Application des grandeurs statistiques décrites à la méthode analytique développée via une quantification relative directe 280
VII.C. Discussion des résultats obtenus après application des outils statistiques sur une étude d'une semaine 282
VII.D. Discussion des résultats obtenus après application des outils statistiques sur une étude d'une journée 286
VII.E. Discussion à propos de l'impact du jour de manipulation sur la quantification 289
VIII. QUANTIFICATION CLASSIQUE PAR DILUTION ISOTOPIQUE AVEC DROITE D'ETALONNAGE 290
VIII.A. Détermination du nombre de réplicats pour une régression correcte 290
VIII.B. Discussion autour du nombre de tirs LASER à accumuler 291
VIII.C. Résultats d'étalonnage 292
IX. ETUDES D'IMAGERIE SUR MR 6 294
IX.A. Sélection des filtres de masse pour l'affichage des résultats 295
IX.B. Répartition du peptide MR 6-D_0 déposé seul 295
IX.C. Clichés d'imagerie issue de mélanges MR 6-D_0 / MR 6-D_4 296
IX.D. Clichés d'imagerie sur dépôts de mélange MR 6-D_0/ MR 6-D_4 / EMC-09 298
IX.E. Imagerie issue d'une expérience de saturation 301
IX.E.1. Imagerie sur la liaison totale 301
IX.E.2. Imagerie sur la liaison non spécifique 302
X. ETUDE DE DETECTION DU PEPTIDE MR 6-D_0 EN ESI SUR QQQ ET Q-TOF 305
X.A. Expériences de détection par MRM sur QqQ 305
X.B. Expériences de détection sur Synapt-G2-S 308
XI. LE MODELE LIGAND/RECEPTEUR AVP/V_{1A} 309
XI.A. Les différents supports pour la mesure de la liaison d'un ligand à son récepteur membranaire 309
XI.A.1. Travail sur préparation membranaire 309
XI.A.2. La transfection : principe général appliqué aux cellules CHO-V_{1A} 309
XI.A.3. Le Repiquage 311
XI.A.4. Le comptage des cellules 314
XI.A.5. Dosage des membranes 315
XI.A.6. Les conditions particulières d'utilisation des préparations membranaires VS travail sur cellules entières . 317
XI.B. Expériences de saturation (radioactivité et MALDI) 318
XI.B.1. Saturation sur préparation membranaire CHO 318
XI.B.2. Mesure de radioactivité 320
XI.B.3. Mesure MALDI 322
XI.C. Expériences de compétition 326
XI.C.1. Mesure de radioactivité 326
XI.C.2. Mesure MALDI-SID-MS 328
XI.D. Comparaison entre une quantification « directe » par dilution isotopique et une quantification avec droite d'étalonnage 334
CONCLUSION 340

CHAPITRE 3 : LE PROJET CCKB-R 341

I. INTRODUCTION 341
II. LA SYNTHESE MANUELLE DE PEPTIDES SUR SUPPORT SOLIDE 341
III. LA SYNTHESE D'ACIDES AMINES MODIFIES 342
IV. CONTROLE QUALITE DES PEPTIDES 350
IV.A. Les peptides MR 9–D_0 et MR 9–D_4 350
IV.B. Les peptides MR 10–D_0 et MR 10–D_4 351
IV.C. Les peptides MR 10-D_0 et MR 10-D_4 352
V. LC-MS : MASSIFS ISOTOPIQUES 352

V.A. Les peptides MR 9–D_0 et MR 9–D_4 ... *352*
V.B. Les peptides MR 10-D_0 et MR 10-D_4 ... *352*
VI. CONTROLE PAR MS^2 : CARACTERISATION DES SEQUENCES PEPTIDIQUES ... 353
VI.A. Les peptides MR 9–D_0 et MR 9–D_4 ... *353*
VI.B. Les peptides MR 10-D_0 et MR 10-D_4 ... *355*
VI.C. Analyse élémentaire des peptides MR 10 ... *356*
VII. ETUDES EN SPECTROMETRIE DE MASSE DES PEPTIDES DU PROJET CCKB-R ... 356
VII.A. Etude du MR 9-D_0 et de ses états d'oxydation ... *356*
VII.B. Etude de la proportion d'hydrogène dans l'étalon deutéré ... *358*
VII.C. Détection du peptide MR 10-D_0 ... *358*
VII.D. Validation statistique appliquée au peptide MR 10-D_0 ... *359*
VII.E. Protocole d'étalonnage appliqué au peptide MR 10-D_0 ... *361*
VIII. APPLICATION A CCKB-R MODELE CCKB/CCKB-R : ... 363
VIII.A. Dosage des membranes ... *364*
VIII.B. Expérience de saturation par MALDI-SID-MS ... *364*
VIII.C. Comparaison entre une quantification « directe » par dilution isotopique et une quantification avec droite d'étalonnage ... *368*
IX. ETUDES SUR LA FRAGMENTATION D'ACIDES AMINES MODIFIES POUR CCKB-R ... 372
IX.A. Analyses en mode MS^1 ... *372*
IX.B. Analyses en mode MS^2 ... *373*
IX.C. Résumé et proposition de généalogie des structures proposées ... *376*
CONCLUSION ... 379

PARTIE C – CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES ... 380

I. LE MALDI-SID-MS, UNE NOUVELLE APPROCHE DE QUANTIFICATION APPLIQUEE AUX PEPTIDES ... 382
II. LE DEVELOPPEMENT DE MARQUEURS A CHARGE PREFORMEE ... 382
II.A. Objectifs recherchés par le développement de nouveaux marqueurs et stratégie envisagée ... *383*
II.B. Les marqueurs à charge préformée : premières synthèses des molécules avec lien amide, les pyridiniums acides ... *384*
II.C. Les pyridiniums dérivés de matrices MALDI, une évolution de l'HCCA en tant que marqueur peptidique ? ... *386*
III. LE PREMIER PEPTIDE SYNTHETISE ET LES TESTS PRELIMINAIRES DE FRAGMENTATION ... 387

PARTIE D – PARTIE EXPERIMENTALE ... 389

I. APPAREILLAGES ET METHODES ANALYTIQUES ... 390
I.A. Systèmes de synthèse peptidique ... *390*
I.A.1. Robot de synthèse liberty ... 390
I.A.2. Plate-forme fast SPPS ... 391
I.B. Systèmes de chromatographie analytique ... *392*
I.B.1. HPLC analytique Agilent ... 392
I.B.2. ESI-Q (ZQ 2000 Waters) ... 392
I.B.3. Synapt G2-S (Waters) ... 394
I.C. Systèmes de chromatographie préparative ... *395*
I.C.1. HPLC préparative Waters (HPLC 4000) : ... 395
I.C.2. HPLC préparative automatique – ESI-Q (Waters micromass) : ... 396
I.C.3. HPLC préparative (Gilson PLC 2020) : ... 398
I.D. Systèmes RMN ... *399*
I.E. Spectrométrie de masse ... *400*
I.F. Plaque AnchorChip 400-384 ... *400*
I.G. Visuels de dépôts MALDI ... *400*
I.G.1. MALDI-LIFT-TOF-TOF ... 401

I.G.2. QqQ Thermo Scientific ... 402
I.H. Systèmes expérimentaux en pharmacologie ... 404
I.H.1. Brandel ... 404
I.H.2. Centrifugeuse ... 404
I.H.3. Thermomixeur ... 405
I.H.4. Pièce de culture cellulaire ... 405
I.I. Systèmes divers ... 406
I.I.1. Balances de précision ... 406
I.I.2. pH-mètre ... 406
I.I.3. Electrophorèse capillaire ... 407
I.I.4. Analyseur élémentaire ... 407
I.I.5. Spectrophotomètre UV-Visible ... 408
I.I.6. Nébuliseur Suncollect ... 409
II. SYNTHESES ET CARACTERISATIONS ... 409
II.A. Protocoles de dépôt MALDI optimisés ... 409
II.A.1. Goutte séchée inversée ... 409
II.A.2. Goutte séchée pré mélangée ... 409
II.A.3. Goutte séchée pré mélangée à 50 % de solution de matrice (GSP-M1/2) ... 410
II.B. Préparation de matrice ... 410
II.B.1. Solution d'HCCA saturée ... 410
II.B.2. Solution d'HCCE 10 % ... 410
II.B.3. Solution d'HCCE 1 % ... 410
II.C. Modes opératoires détaillés ... 411
II.C.1. Synthèse des marqueurs pour SID ... 411
II.C.1.a. Synthèse de l'acide (E)-2-cyano-3-(4-hydroxyphényl-2,3,5,6-D4)acrylique ... 411
II.C.1.b. Synthèse de l'acide 3-(4-((tert-butoxycarbonyl)oxy)phényl)-2-cyanoacrylique, Y = H ... 411
II.C.1.c. Synthèse de l'acide (E)-3-(4-((tert-butoxycarbonyl)oxy)phényl-2,3,5,6-D_4)-2-cyanoacrylique, Y = D ... 412
II.C.1.d. Synthèse de l'acide 3-(^{t}Boc-4-hydroxyphényl)propionique ... 413
II.C.2. Synthèses des peptides ... 414
II.C.2.a. Protocole général de synthèse automatisée sous micro-ondes ... 414
II.C.2.b. Synthèse de l'AVP ... 414
II.C.2.c. Couplage des fragments en position N-terminale pour les peptides MR 6-D_0, MR 6-D_4 et MR 5 ... 415
II.C.2.d. Protocole général de synthèse manuelle ... 416
II.C.2.e. Synthèse des peptides MR 10-D_0, MR 10-D_4 ... 416
II.C.2.f. Radiomarquage à l'iode 125 ... 418
II.C.3. Synthèses de marqueurs en position N-terminale ... 419
II.C.3.a. Protocole général de synthèse des marqueurs portant la charge préformée et un lien ... 419
II.C.3.b. RMN des marqueurs portant une charge préformée et un lien ... 419
II.C.3.c. Protocole général de synthèse des marqueurs portant la charge préformée et un lien ... 420
II.C.3.d. RMN des marqueurs portant uniquement une charge préformée ... 422
II.C.4. Synthèses des acides aminés modifiés ... 424
II.C.4.a. Synthèse de Fmoc-Ahx-OH ... 424
II.C.4.b. Synthèse d'Oia (mélange racémique): ... 424
II.C.4.c. Synthèse de H-Kyn-OH ... 425
II.C.4.d. Synthèse de Fmoc-Kyn-OH ... 425
II.C.4.e. Synthèse de Fmoc-DiOia-OH ... 426
II.C.4.f. Synthèse de ^{t}Boc-DiOia et ^{t}Boc-Kyn-OH ... 427
II.D. Spectres MALDI-MS des peptides synthétisés ... 427
II.D.1. MR 4 – AVP ... 427
II.D.2. MR 5 – Homo-HO-LVA ... 428
II.D.3. MR 6-D_0 ... 428
II.D.4. MR 6-D_4 ... 429
II.E. Spectres MALDI-ToF/ToF des impuretés présentes dans les échantillons de MR 6-D_0 et MR 6-D_4 ... 429
II.E.1. Impureté détectée à 1 121,8 Th ... 429
II.E.2. Impureté détectée à 1 149,8 Th ... 430
II.F. Chromatogrammes UV de contrôle d'acides aminés utilisés pour la synthèse de peptides ... 430
II.F.1. MR 4– AVP ... 430

II.F.2. MR 5– Homo-HO-LVA 431
II.F.3. Peptides MR 6 – D_0 et MR 6 – D_4 431
II.F.4. Les peptides MR 10-D_0 et MR 10-D_4 432
III. MODES OPERATOIRES DETAILLES DES EXPERIENCES DE PHARMACOLOGIE 432
III.A. Protocole commun 432
III.B. Spécificité des expériences de saturation 433
III.C. Spécificité des expériences de déplacement 436

LISTES DES FIGURES, ILLUSTRATIONS, EQUATIONS, SCHEMAS REACTIONNELS ET TABLEAUX 439

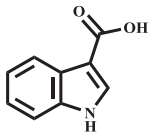
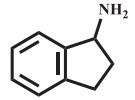
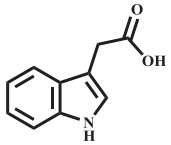
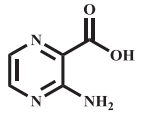
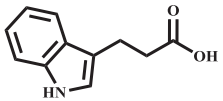
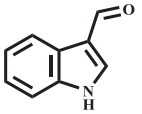
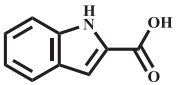
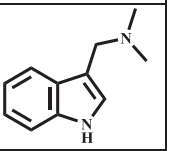
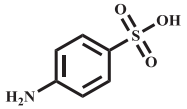
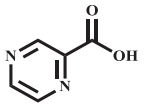
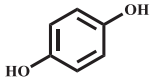
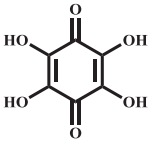
TABLE DES MATIERES DETAILLEE 463

PARTIE E – *ANNEXES* 471

I. TABLEAU DE DEVELOPPEMENT DES MATRICES MALDI 473
II. POUR ALLER PLUS LOIN 478
II.A. Spectrométrie de masse 478
II.A.1. Démonstration de l'équation exprimant l'énergie absorbée par la matrice MALDI 478
II.A.2. Démonstration de l'équation donnant le temps d'arrivée d'un ion au détecteur et de l'équation d'étalonnage 478
II.A.3. La quantification par MRM 479
II.A.3.a. La sélection des peptides cibles 481
II.A.3.b. La sélection des transitions pour l'étude SRM 482
II.A.3.c. La validation des transitions pour l'étude SRM 483
II.A.4. L'émergence de l'ICP-MS et de l'ionisation par plasma 484
II.B. Electrophorèse capillaire 487
I.A.1. Principe de fonctionnement et caractéristiques 487
I.A.2. Quelques applications de l'électrophorèse capillaire 491
II.C. Pharmacologie 491
II.C.1. Catégories des sous-unités des protéines G et cascades de signalisation 491
II.C.1.a. La sous-unité α 491
II.C.1.b. Le complexe β-γ (Gβ/γ) et une première classe de phospholipase (PLA2) 493
II.C.1.c. Deuxième classe de phospholipase : les phosphodiestérases 496
II.C.1.d. Troisième classe de phospholipase : les phospholipases A1 499
II.C.2. Démonstration de l'équation de Cheng-Prusoff pour une expérience de compétition à l'équilibre entre un ligand et un compétiteur sur un récepteur 501
II.C.3. Le rouge de phénol et son utilisation en pharmacologie 503

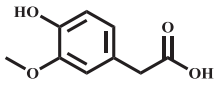
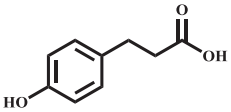
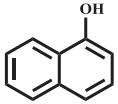
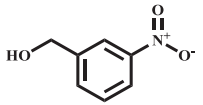
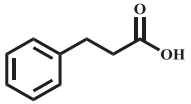
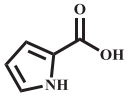
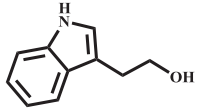
Partie E – ***Annexes***

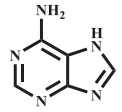
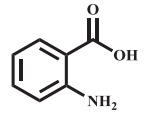
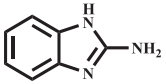
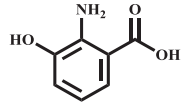
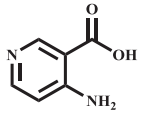
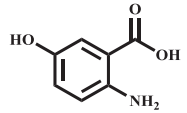
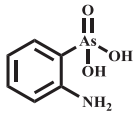
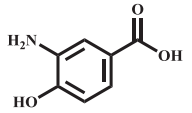
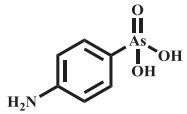
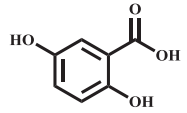
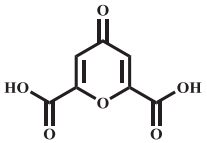
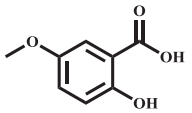
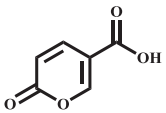
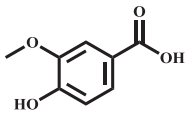
I. Tableau de développement des matrices MALDI[618]

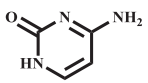
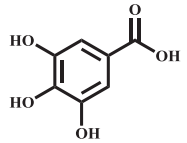
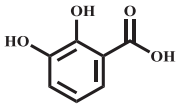
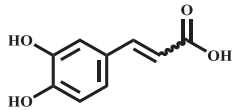
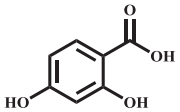
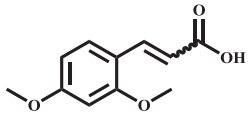
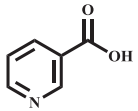
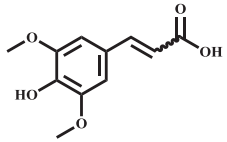
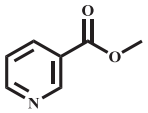
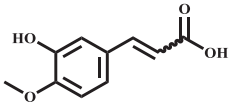
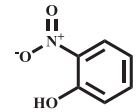
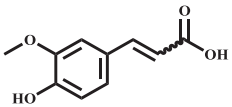
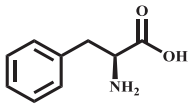
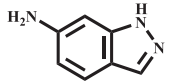
$M^{+\bullet}$	Signaux observés[619]	Structure	$[M-H]^{+}/[M+2H]^{+\bullet}$	Signaux observés	Structure
Acide indole-3-carboxylique	-		1-aminoindane	0	
Acide indole-3-acétique	-		Acide 3-aminopyrazine-2-carboxylique	+	
Acide indole-3-propionique	-		Indole-3-carbaldéhyde	0	
Acide indole-2-carboxylique	-		Diméthylaminométhyl indole (gramine)	-	
Acide 4-aminobenzènesulfonique (acide sulfanilique)	-		Acide pyrazine-2-carboxylique	+	
1-4-dihydroxybenzène (hydroquinone)	-		Tétrahydoxy-*p*-benzoquinone	+	

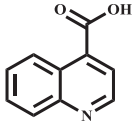
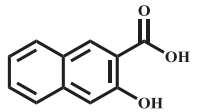
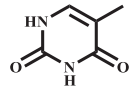
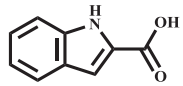
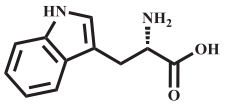
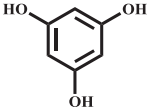
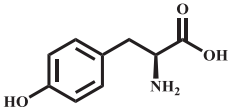
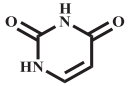
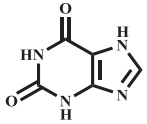
[618] H. Ehring, M. Karas, F. Hillenkamp, *Organic Mass Spectrometry* **1992**, *27*, 472–480

[619] « ++ » : Signal très intense de protéine obtenu ; « + » : signal intense de protéine ; « 0 » : faible signal ; « - » : pas de signal observé

$M^{+\bullet}$	Signaux observés	Structure
Acide 4-hydroxy-3-méthoxyphénylacétique (acide homovanillique)	-	
Acide 3-(*p*-hydroxyphényl)propionique	-	
1-naphtol	-	
3-nitrobenzylalcool	-	
Acide 3-phénylpropionique	+	
Acide pyrrole-2-carboxylique	-	
Tryptophol	-	

$[M+H]^+$	Signaux observés	Structure	$[M+H]^+ / M^{+\bullet}$	Signaux observés	Structure
Adénine	-		Acide 2-aminobenzoïque	+	
2-aminobenzimidazole	-		Acide 2-amino-3-hydroxybenzoïque	-	
Acide aminonicotinique	0		Acide 2-amino-5-hydroxybenzoïque	+	
Acide *o*-arsanilique	-		Acide 3-amino-4-hydroxybenzoïque	0	
Acide *p*-arsanilique	-		**<u>Acide 2,5-dihydroxybenzoïque (DHB)</u>**	++	
Acide chelidonique	+		Acide 2-hydroxy-5-méthoxybenzoïque	0	
Acide coumalique	-		Acide 4-hydroxy-3-méthoxybenzoïque (acide vanillique)	-	

$[M+H]^+$	Signaux observés	Structure	$[M+H]^+/ M^{+\bullet}$	Signaux observés	Structure
Cytosine	+		Acide 3,4,5-trihydroxybenzoïque	0	
Acide 2,3-dihydroxybenzoïque	+		Acide 3,4-dihydroxycinnamique (acide caféïque)	+	
Acide 2,4-dihydroxybenzoïque	+		Acide 2,4-diméthoxycinnamique	0	
Acide nicotinique	-		Acide 3,5-diméthoxy-4-hydroxycinnamique (acide sinapinique)	+	
Ester méthylique de l'acide nicotinique	0		Acide 3-hydroxy-4-méhtoxycinnamique	0	
2-nitrophénol	-		Acide 4-hydroxy-3-méthoxycinnamique (acide férulique)	+	
Phénylalanine	-		6-aminoindazole	-	

$[M+H]^+$	Signaux observés	Structure	$[M+H]^+$/ $M^{+\bullet}$	Signaux observés	Structure
Acide quinoline-4-carboxylique	-		Acide 3-hydroxy-2-naphtoïque	+	
Thymine	0		Acide indole-2-carboxylique (337 nm)	+	
Tryptophane	-		1,3,5-trihydroxybenzène	0	
Tyrosine	-				
Uracile	0				
Xanthine	-				

II. Pour aller plus loin

II.A. Spectrométrie de masse

II.A.1. Démonstration de l'équation exprimant l'énergie absorbée par la matrice MALDI

Soit l'énergie absorbée par unité de volume égale à l'opposé de la dérivée de la fluence laser par rapport à la profondeur. En effet la différence de la fluence laser à mesure que le rayonnement progresse dans le dépôt correspond exactement à l'énergie absorbée par la matrice, selon la loi de conservation de l'énergie :

$$(1) : \frac{E_a}{V} = -\frac{dH}{dz}$$

D'après l'équation de la fluence laser, on a :

$$(2) : \frac{dH}{dz} = -\alpha . H_0 e^{-\alpha z} = -\alpha . H$$

En combinant les équations (1) et (2), on obtient enfin :

$$\frac{E_a}{V} = \alpha . H$$

II.A.2. Démonstration de l'équation donnant le temps d'arrivée d'un ion au détecteur et de l'équation d'étalonnage

Soit l'énergie cinétique acquise par les ions au moment de leur ionisation :

$$(1) : E_c = z.e.U = \frac{1}{2} m.v^2$$

On obtient alors l'expression de leur vitesse en fonction de leur masse :

$$(2) : v = \sqrt{\frac{2.z.e.U}{m}}$$

Sachant que la vitesse des ions est fonction de la distance parcourue (L, la longueur du tube de vol) et du temps « t » pour arriver au détecteur, on obtient :

$$(3) : t = L. \sqrt{\frac{m}{2.z.e.U}}$$

A partir de cette équation (3), il est possible de la transformer pour faire apparaître le rapport m/z qui est traditionnellement représenté sur les spectres de masse :

$$(4) : \frac{m}{z} = 2.e.U.(t/L)^2$$

Cela permet de faire apparaître une équation d'étalonnage du type :

$$(5) : m/z = A.^{2}, \text{ avec } A = \frac{2.e.U}{L^2}$$

Cependant il faut prendre en compte un temps de retard dû au déclenchement électronique de l'enregistrement du signal matérialisé par une constante B. Cela permet d'expliquer la raison pour laquelle un étalonnage d'un MALDI-ToF avec un dépôt de peptides étalons peut se faire par une expression quadratique :

$$(6) : m/z = A.t^2 + B$$

II.A.3. La quantification par MRM

Historiquement, les approches similaires à de la MRM ont été utilisées depuis les années 1970 dans des laboratoires pour la quantification de molécules de faible masse et de métabolites.[620,621] A la fin des années 1990, de nombreux peptides issus de digestions enzymatiques ont été utilisés pour la quantification de protéines cibles.[622] Actuellement un grand nombre d'études ont rapporté l'utilisation de la spectrométrie de masse pour la quantification de protéines cibles seules ou multiplexées. Généralement les digestions de plasma et de sérum effectuées à l'origine sans prendre garde à la complexité des échantillons ont conduit à des valeurs basses, de l'ordre du milligramme par litre au mieux. Des études sur l'enrichissement des échantillons en peptides, différentes étapes de purification ainsi que le préfractionnement des échantillons ont permis de diminuer les limites de détection des expériences en spectrométrie de masse. Actuellement la quantification par MRM est largement utilisée aussi bien dans le cadre d'études quantitatives de protéines du sérum humain avec résidus glycosylés,[636] de peptide en sortie d'électrophorèse capillaire,[623] de détection de biomarqueurs de cancers[624] ou encore de l'analyse quantitative de facteurs viraux de streptocoques.[625]

La quantification par MRM consiste en le suivi de plusieurs transitions entre l'ion moléculaire et certains de ses fragments. En règle générale, les fragments les plus intenses sont choisis pour avoir la meilleure sensibilité possible et atteindre le seuil de détection le plus bas possible. Lorsqu'une seule transition est suivie on parle de SRM pour « Single Reaction Monitoring » tandis que le sigle MRM est utilisé lors du suivi de deux transitions ou plus (« Multiple Reaction Monitoring »).

---

[620] Baty J.D ;Robinson P.R. *Biomed Mass Spectrom* **1977**, *4*, 36–41
[621] Zakett D.; Flynn R.G.A; Cooks R.G. *J Phys Chem,* **1978**, *82*, 2359
[622] Barr J.R. ; Maggio V.L. ; Patterson D.G. Jr. ; Cooper G.R. ; Henderson L.O.; Turner W.E; et al. *Clin Chem* **1996**, *42,*1676–82
[623] Li, Y.; Wojcik, R.; Dovichi, N. J.; Champion, M. M. *Anal. Chem.* **2012**, *84*, 6116
[624] Makawita, S.; Diamandis, E. P. *Clin. Chem.* **2010**, *56*, 212
[625] Lange, V.; Malmström, J. A.; Didion, J.; King, N. L.; Johansson, B. P.; Schäfer, J.; Rameseder, J.; Wong, C.-H.; Deutsch, E. W.; Brusniak, M.-Y.; Bühlmann, P.; Björck, L.; Domon, B.; Aebersold, R. *Mol. Cell. Proteomics MCP* **2008**, *7*, 1489

Cette technique est très utilisée en protéomique.[626] Celle-ci tire parti des capacités uniques du triple quadripôle pour des analyses quantitatives. Dans une telle configuration (voir Figure 236) le premier et le dernier quadripôle agissent en tant que filtres pour sélectionner des valeurs de m/z prédéfinies. Celles-ci correspondent respectivement à un ion et à l'un de ses fragments. Le deuxième quadripôle joue le rôle, quant à lui, de cellule de collision dans laquelle l'ion précédemment sélectionné va être fragmenté. La(les) transition(s) précurseurs/fragments sont enregistrées au cours du temps et représentées de la même manière qu'un chromatogramme avec l'intensité du signal d'une transition spécifique en ordonné (à la place d'une absorbance UV typiquement).

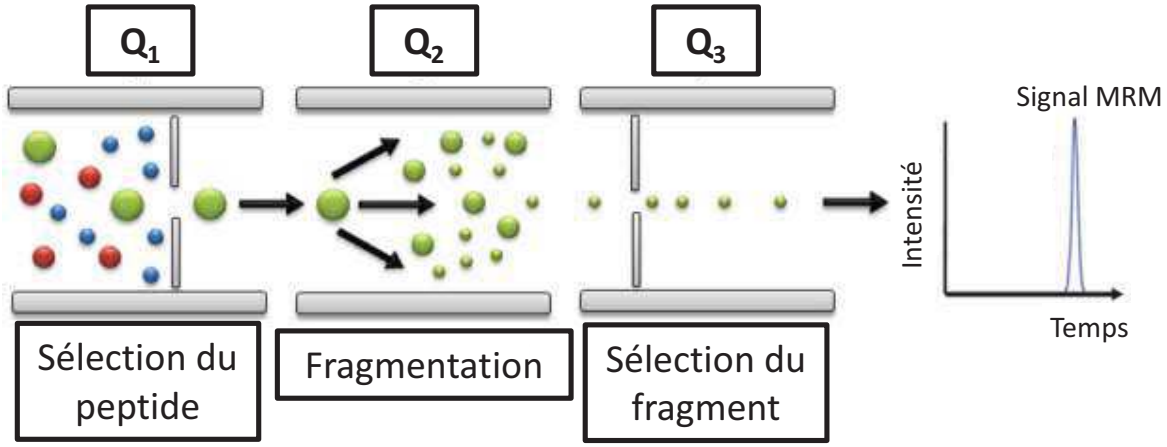


Figure 236 : Représentation schématique d'un triple quadripôle dans une expérience de MRM

Par opposition à d'autres techniques d'analyse par spectrométrie de masse comme le mode SIM/SIR, la MRM ne repose pas sur le scan d'une gamme complète de valeurs m/z. Ceci résulte en une forte sélectivité et un bruit de fond très faible. La sensibilité est également grandement augmentée d'un à deux ordres de grandeurs comparé aux techniques de type « full-scan ». La conséquence directe est une réponse linéaire sur une large gamme dynamique pouvant aller jusqu'à 5 ordres de grandeur. Cela permet de détecter des protéines avec une abondance faible dans des mélanges complexes, point crucial pour les études quantitatives. A titre de comparaison, la gamme dynamique obtenue pour le peptide JMV4854 en MALDI avec le couple marqueur/matrice HCCA/HCCE est de 3-4 ordres de grandeur.

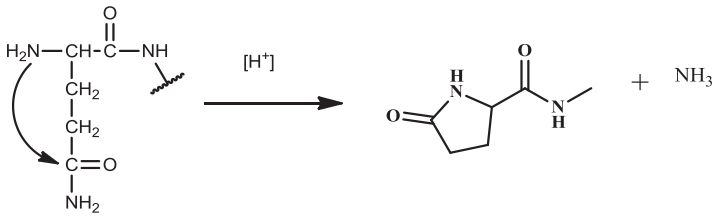
Un autre instrument sur lequel il est possible d'effectuer de la MRM est le piège à ion linéaire, capable de sélectionner un ion parent ou une protéine cible, de la soumettre à de la CID et d'enregistrer les fragments obtenu dans un chromatogramme.[627]

[626] Lange, V.; Picotti, P.; Domon, B.; Aebersold, R. *Mol. Syst. Biol.* **2008**, *4*, 222
[627] Makawita, S.; Diamandis, E. P. *Clin. Chem.* **2010**, *56*, 212

II.A.3.a. La sélection des peptides cibles

La sélection des peptides qui feront l'objet d'une étude SRM/MRM est primordiale pour le succès de l'expérimentation. Des règles empiriques pour la sélection des peptides ont même été décrites dans deux papiers de 2004 et 2005.[628,629] En principe n'importe quel peptide issu d'une digestion trypsique de protéine pourrait être ciblé. Cependant le nombre de peptides candidats se compte par dizaine et par centaine. En pratique seuls les peptides les plus abondants sont sélectionnés ce qui permet de réduire les temps d'analyse avec de forts signaux spécifiques. Les peptides en question sont sélectionnés grâce à des expériences préalables de détection pour retenir les candidats les plus prometteurs. Les peptides les plus longs produisant un grand nombre de fragments d'intensités similaires sont identifiés avec de bonnes certitudes. Par opposition, les peptides courts et produisant un nombre restreint de fragments prédominants sont obtenus avec des signaux SRM plus intenses. Un point important de la sélection des peptides consiste en l'assurance de la spécificité de ces derniers. Ils doivent permettre d'identifier la protéine cible. Ainsi, pour une quantification sûre de protéines, deux peptides au moins sont généralement suivis. Les expériences SRM peuvent également permettre de suivre des modifications post-traductionnelles de protéines telles que la phosphorylation[630,631], l'ubiquitination[632] ou l'acétylation[633] dans le cas où les transitions pour ces peptides sont connues.

Figure 237 : Transformation en pyroglutamate d'une glutamine en N-terminal



Dans le cadre de la quantification, les modifications chimiques sont une source artificielle d'erreur car une fraction des peptides ciblés sont potentiellement sujets à des modifications irréversibles tels que l'oxydation pour des peptides contenant des résidus tryptophane ou méthionine. Les peptides de type glutamine et asparagine peuvent également être sujets à une acidification pour être transformés en glutamate et aspartate. A noter que la cinétique de conversion de ces acides aminés dépend fortement de la séquence environnante et de l'encombrement

[628] Bronstrup M. *Expert Rev Proteomics,* **2004,** *1*, 503–512
[629] Kirkpatrick D.S., Gerber S.A., Gygi S.P. *Methods,* **2005**, 35, 265–273
[630] Unwin R.D., Griffiths J.R., Leverentz M.K., Grallert A., Hagan I.M., Whetton A.D. *Mol Cell Proteomics*, **2005**, *4*, 1134–1144
[631] Williamson B.L., Marchese J., Morrice N.A. *Mol Cell Proteomics*, **2006**, *5*, 337–346
[632] Mollah S., Wertz I.E., Phung Q., Arnott D., Dixit V.M., Lill J.R. *Rapid Commun Mass Spectrom,* **2007**, *21*, 3357–3364
[633] Griffiths J.R., Unwin R.D., Evans C.A., Leech S.H., Corfe B.M., Whetton A.D. *J Am Soc Mass Spectrom,* **2007**, *18*, 1423–1428

stérique. Par exemple une glutamine suivie par une glycine ou une proline sera plus sujette à l'acidification ; de même qu'une glutamine en N-terminale sera rapidement transformée en pyroglutamate sous conditions acides.[634,635] En dépit de la spécificité et de l'efficacité de la digestion trypsique, des peptides avec « miss cleavage » ou avec coupure à des sites non trypsiques sont parfois observés. Heureusement ceux-ci sont en quantité relative très faible par rapport aux autres. De tels peptides ne sont pas à cibler pour des expériences SRM par le simple fait qu'ils sont en quantité relative faible.

II.A.3.b. La sélection des transitions pour l'étude SRM

La quantification en SRM d'un peptide en SRM requiert la sélection de paramètres spécifiques de m/z pour le premier et troisième quadripôle (i.e : les filtres), ce qui conduit à une forte sensibilité et une détection spécifique du peptide. La combinaison entre le premier et le troisième quadripôle est appelé « transition ». La valeur de m/z pour le premier quadripôle est déterminée par la masse et l'état de charge (monochargé, dichargé etc…) du peptide. Dans le troisième quadripôle la masse d'un ion fragment particulier du peptide et spécifique de sa séquence est sélectionnée. Afin d'obtenir la meilleure sensibilité possible, il est primordial de sélectionner des transitions spécifiques liées aux fragments les plus intenses. En règle générale, les 2 à 4 transitions les plus intenses pour un peptide sont sélectionnées. La sélection de celles-ci peut se faire soit sur la base de données obtenues antérieurement, soit par des expériences préalables de détection sur le quadripôle. Dans le premier cas, il faut faire attention de ne pas utiliser un instrument différent, comme un piège à ion, quand l'expérience de SRM est effectuée sur un triple quadripôle du fait des conditions d'ionisation différentes qui vont affecter l'état de charge du peptide. De la même manière, la distribution relative des fragments varie avec le type d'appareil utilisé et les paramètres opératoires. Par exemple, en comparant le mode d'ionisation par CID dans les pièges à ion avec les cellules de collision des triples quadripôles, les ions de type b et les fragments doublement chargés sont la plupart du temps moins abondants voir totalement absents dans les triples quadripôles.

Dans certains cas, plus de 30 transitions peuvent devoir être suivies si, par exemple, deux états de charge d'un ion précurseur et diverses séries d'ions sont prises en compte. A cet instant, il est possible d'utiliser la SRM programmée.[636] Dans ce cas-là les transitions d'un peptide spécifique sont enregistrées dans une fenêtre temporelle autour de son temps de rétention, ce qui permet d'analyser un grand nombre de transitions. Une des principales contraintes réside dans le fait que l'instrument doit supporter cette méthode pour pouvoir l'appliquer ; les temps de rétentions des

[634] Piszkiewicz D., Landon M., Smith E.L. *Biochem Biophys Res Commun,* **1970**, *40*, 1173–1178
[635] Geiger T., Clarke S. *J Biol Chem*, **1987**, *262*, 785–794
[636] Stahl-Zeng J., Lange V., Ossola R., Eckhardt K., Krek W., Aebersold R., Domon B. *Mol Cell Proteomics*, **2007**, *6*, 1809–1817

peptides doivent également être connus. S'ils ne le sont pas, il est toutefois possible de les obtenir en effectuant des analyses préliminaires.

II.A.3.c. La validation des transitions pour l'étude SRM

La première étape dans la validation des transitions est l'acquisition en parallèle de différentes transitions pour un peptide ciblé. Au temps d'élution du peptide, ces transitions donnent de parfaits pics de « co-élution » s'ils proviennent du même peptide. De cette manière et avec chaque transition additionnelle analysée, cela réduit la probabilité d'une non concordance. Cependant il est possible d'observer des fragments provenant de peptides non ciblés ayant pour conséquence une dérive dans les données de quantification. Il est ainsi très utile d'utiliser d'autres moyens de validation. L'acquisition de spectres MS/MS est une méthode complémentaire de validation. Cela permet de confirmer la présence des peptides ciblés en analysant les spectres de fragmentation. Les expériences de fragmentation sont en général menées sur le triple quadripôle qui doit servir aux analyses SRM/MRM en suivant un protocole appelé « SRM-triggered MS/MS scanning ».[630] L'instrument est alors programmé pour acquérir des spectres complets de fragmentation qu'un signal pour une transition particulière soit détecté ou non. Les spectres obtenus sont alors comparés avec les fragments prédits des peptides pour s'assurer que les pics majeurs concordent (voir Figure 238).

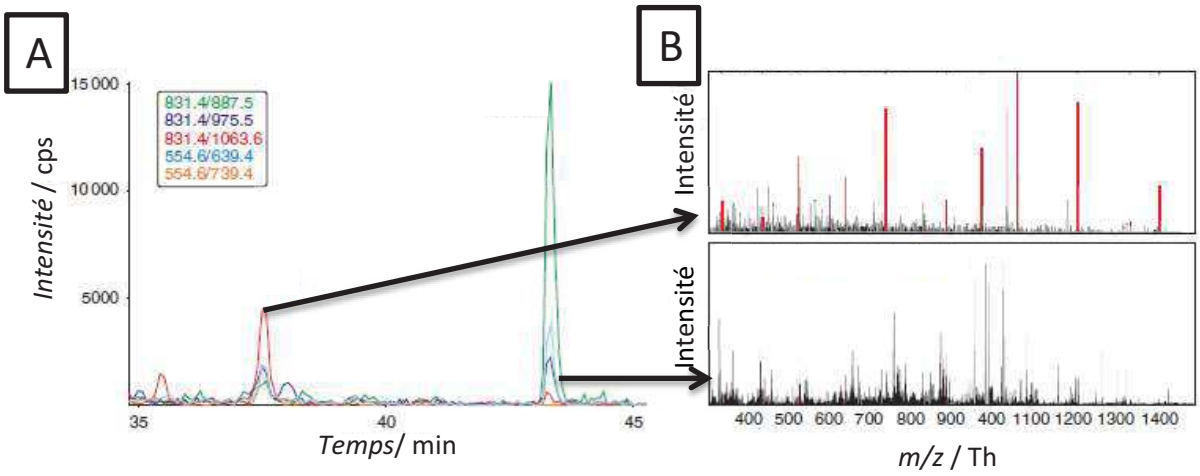


Figure 238 : Illustration de la validation de transitions d'un peptide VFAQFSSFVDSVIAK sélectionnées pour une expérience de MRM par la méthode « SRM-triggered MS/MS scanning »

La figure A montre les « chromatogrammes » de cinq transitions où deux pics avec co-élution de transitions apparaissent à 37,5 et 43,3 minutes. Les spectres MS/MS obtenus sont illustrés en B où les pics correspondant aux ions « y_n » respectifs sont colorés en rouge dans le spectre « Peak 1 ». Malgré cela, les intensités du spectre « Peak 2 » sont plus intenses mais ne correspondent pas au peptide ciblé. Les spectres MS/MS montrent clairement que le peptide d'intérêt de cet exemple élue à 37,5 minutes et qu'avoir recours au « Peak 2 » pour la SRM amènerait à une quantification erronée.

Ceci confirme que les signaux détectés en SRM proviennent bien du peptide ciblé. Le recours aux chromatogrammes SRM au lieu d'un scan complet permet d'augmenter la spécificité et également l'identification de peptides de faible abondance dans des milieux complexes.

II.A.4. L'émergence de l'ICP-MS et de l'ionisation par plasma

La plupart des méthodes quantitatives en protéomique se servent de marquages isotopiques couplés à une ionisation de type ESI ou MALDI. L'ICP-MS, quant à elle, est encore largement décrite comme une méthode pour la détection de métaux faisant d'elle une technique à priori loin du champ d'investigation qu'est la protéomique.

Cependant, plusieurs approchent existent pour tenter de faire reconnaître l'ICP-MS comme plate-forme à part entière dans l'analyse de peptides. Celles-ci se servent d'éléments présents dans les peptides tels que le soufre ou encore le phosphore comme marqueurs élémentaires naturels.[637]

Cette technique ne peut cependant pas caractériser de protéines à cause de la perte d'information structurelle liée à l'utilisation de plasmas à 7 000 K. Néanmoins c'est bien cet inconvénient apparent qui fait la force de l'ICP-MS puisque cela permet de réduire considérablement la complexité d'un échantillon en ne récupérant que l'hétéroélément présent dans l'analyte. Ceci s'inscrit directement dans le domaine de recherche baptisé « Metallomics » en référence aux domaines d'investigations de type « -omics » et récemment centralisé avec un journal dédié.[638] Il se définit comme le champ d'investigation et de caractérisation des espèces métalliques et métalloïdes telles que les métalloprotéines et autres biomolécules contenant des métaux.[639,640]

Le but des différentes approches est toujours de créer un dérivé de peptide détectable en ICP-MS pour se servir de la très haute sensibilité de l'instrumentation et de la robustesse de la matrice pour les appliquer à la quantification des peptides pour peu que la stœchiométrie du marqueur élémentaire au sein du peptide ait été établie. Ces techniques étant en constante progression, l'ICP-MS deviendra un outil particulièrement intéressant et complémentaire aux approches basées sur l'ionisation ESI et MALDI grâce notamment à une large gamme dynamique qui peut aller jusqu'à 9 ordres de grandeur, quand ces deux dernières affichent des gammes de 2 à 3 ordres de grandeur, et une haute sensibilité aux éléments métalliques en particulier.[641,642, 643]

---

[637] A. Sanz-Medel, M. Montes-Bayón, M. del Rosario Fernández de la Campa, J. R. Encinar, J. Bettmer, *Anal. Bioanal. Chem.* **2008**, *390*, 3–16
[638] *Metallomics* **2009**, *1*, 14
[639] B. Wang, W. Feng, Y. Zhao, Z. Chai, *Metallomics* **2013**, *5*, 793
[640] L. H. Møller, C. Gabel-Jensen, H. Franzyk, J. S. Bahnsen, S. Stürup, B. Gammelgaard, *Metallomics* **2014**, *6*, 1639–1647
[641] A. Prange, D. Pröfrock, *J. Anal. At. Spectrom.* **2008**, *23*, 432
[642] M. Wang, W.-Y. Feng, Y.-L. Zhao, Z.-F. Chai, *Mass Spectrom. Rev.* **2010**, *29*, 326–348
[643] C. G. Vogiatzis, G. A. Zachariadis, *Anal. Chim. Acta* **2014**, *819*, 1–14

Les expériences de protéomiques ne sont pas le seul domaine dans lequel l'ICP-MS peut s'affirmer comme technique à part entière. Dans ce cadre-là une approche originale a été développée au DAPP, par E. CORDEAU, qui consiste en l'incorporation au sein de peptides d'un hétéroélément offrant une réponse hautement sensible et spécifique en ICP-MS. Cette incorporation a permis notamment d'effectuer des expériences de saturation à l'équilibre sur le modèle AVP/V_{1A} et de compétition à l'équilibre avec différents peptides compétiteurs.

La technologie de l'ICP-MS est à l'heure actuelle reconnue comme un puissant outil complémentaire à l'utilisation de l'ESI et du MALDI en protéomique. En effet, sa capacité à obtenir des données élémentaires quantitatives est à mettre en parallèle à la capacité de ses deux consœurs à caractériser et identifier les différents composés. Le nombre croissant de publications traitant de l'utilisation de l'ICP-MS en protéomique est un signe de la reconnaissance de son utilité et de sa puissance. Maintenant, le défi est de parvenir à l'optimiser pour l'utiliser à son plein potentiel. L'enjeu majeur qui en découle est, pour la communauté scientifique, d'apprendre à utiliser en synergie ces trois technologies pour résoudre des problèmes pour lesquels à elles seules elles ne pourraient trouver de solutions.

Hétéro éléments naturels utilisés en ICP-MS	Qualités	Inconvénient	Utilisation
Phosphore	Largement répandu dans les protéines grâce aux PTM. Utilisable en tant que marqueur élémentaire si l'ICP-MS est équipé d'une cellule de collision /réaction et avec l'utilisation d'oxygène comme gaz réactif	Faible efficacité d'ionisation (premier potentiel d'ionisation élevé à 10,9 eV, interférences polyatomiques) Suivi d'un seul isotope possible ^{31}P	Mesure du degré de phosphorylation de protéines.
Soufre	Quantification absolue possible de peptides et protéines avec estimation préalable de la stoechiométrie en soufre par analyse ESI ou MALDI. Suppression des interférences polyatomiques avec l'oxygène comme gaz réactif.	Premier potentiel d'ionisation élevé (10,36 eV). Interférences polyatomiques sur les deux isotopes les plus abondants à m/z = 32 et 34 Th.	Quantification de protéines soufrées après séparation par chromatographie d'exclusion
Sélénium	Présent dans la sélénocystéine (constituant des sélénoprotéines) incorporée lors de déficit en soufre et codé par le codon UGA. Marqueur sélectif.	Nombre de protéines séléniées limité.	Quantification de sélénoprotéines
Iode	Répandu dans les hormones thyroïdiennes.	Présent dans très peu de protéines naturellement.	Caractérisation de la présence d'iode dans un échantillon protéique.

Tableau 89 : Résumé des principaux hétéroéléments utilisés en ICP-MS

II.B. Electrophorèse capillaire

I.A.1. Principe de fonctionnement et caractéristiques

L'électrophorèse[644,645] est née au début de 19è siècle avant même la chromatographie. Cette technique a connu un long développement grâce à des scientifiques tels que Kohlrausch, Tiselius et plus tard Everearts. Au début des années 80, Jorgenson fit évoluer le paradigme de l'électrophorèse en exécutant celle-ci dans de très fins capillaires de diamètre inférieur à 100 µm créant ainsi l'électrophorèse capillaire. Depuis, cette technique s'est constamment améliorée pour devenir une technique analytique de routine. Les fabricants d'appareils d'analyse ont développé une instrumentation pour subvenir aux nombreux besoins analytiques des différents laboratoires pendant des années. Après un déclin pendant les années 2000, l'électrophorèse capillaire a regagné de l'intérêt notamment grâce au couplage avec les spectromètres de masse pour amener à une remarquable capacité à caractériser des structures complexes de biomolécules avec une grande sensibilité et une grande vitesse d'analyse. Il existe beaucoup de modes différents d'électrophorèse capillaire qui rendent cette technique de séparation très utile pour une large gamme de composés allant de petits ions, jusqu'à des fragments d'ADN en passant par les peptides et protéines.

En comparaison avec la chromatographie liquide, l'électrophorèse capillaire a un gros avantage : le procédé de séparation prend place dans un environnement simple. Cet environnement peut être constitué de solutions homogènes ou d'un réseau polymérique tamisant et dans un espace de séparation à géométrie simple comme un canal cylindrique. Les équations décrivant complètement le mouvement de matière dans l'espace et le temps peuvent être facilement formulées et résolues par des méthodes mathématiques avancées. La compréhension profonde des principes de base du processus de séparation a permis un développement rapide de l'instrumentation, des simulations sophistiquées et des prédictions de séparation ainsi qu'un développement facilité de nouvelles méthodes de séparation électrophorétiques.

A ce jour, 6 principales méthodes de séparation existent. Il s'agit de :

- « capillary zone electrophoresis » (CZE).
- « capillary isoelectric focusing » (CIEF).
- « capillary gel electrophoresis » (CGE).
- « capillary isotachophoresis » (CITP).
- « micellar electrokinetic capillary chromatography » (MECC).
- « capillary electroosmotic chromatography » (CEC).

[644] Weinberger, R. *Practical capillary electrophoresis*; 2nd ed.; Academic Press: San diego, CA, **2000**.
[645] Primer, A.; H. Lauer, H.; P. Rozing, G. *High Performance Capillary Electrophoresis*, **2010**.

L'attention sera focalisée uniquement sur l'électrophorèse capillaire de zone (CZE) qui est la variante utilisée pour les analyses décrites en Partie B – ***Travaux de recherche***, chapitre 2, au paragraphe III.E p.236. Et afin de bien comprendre l'électrophorèse capillaire il faut s'intéresser aux composantes fondamentales de cette technique analytique à savoir :

1. Le flux électroosmotique, d'une part (symbolisé par μ_{eo} dans la Figure 242). A l'origine de ce flux il y a l'électroosmose (aussi appelée électroendoosmose). C'est un des mécanismes de « pompage » de l'électrophorèse capillaire dû à une charge de surface connue sous le nom de « potentiel zeta » représenté dans la Figure 239. Il vient de l'anionisation de la surface des capillaires de silice conditionnés usuellement avec de la soude 1N. Quelques charges positives sont alors adsorbées à la surface du capillaire et immobiles, même sous l'influence d'un champ électrique. La couche suivante (couche compacte) est globalement cationique, les anions étant repoussés de la surface du capillaire avant d'arriver à la couche diffuse électriquement neutre, le potentiel zeta n'étant plus sensible à cette distance (≈ 100 Å).
2. Le flux électrophorétique, d'autre part (symbolisé par μ_{ep} dans la Figure 242), qui correspond à la migration des molécules analysées.

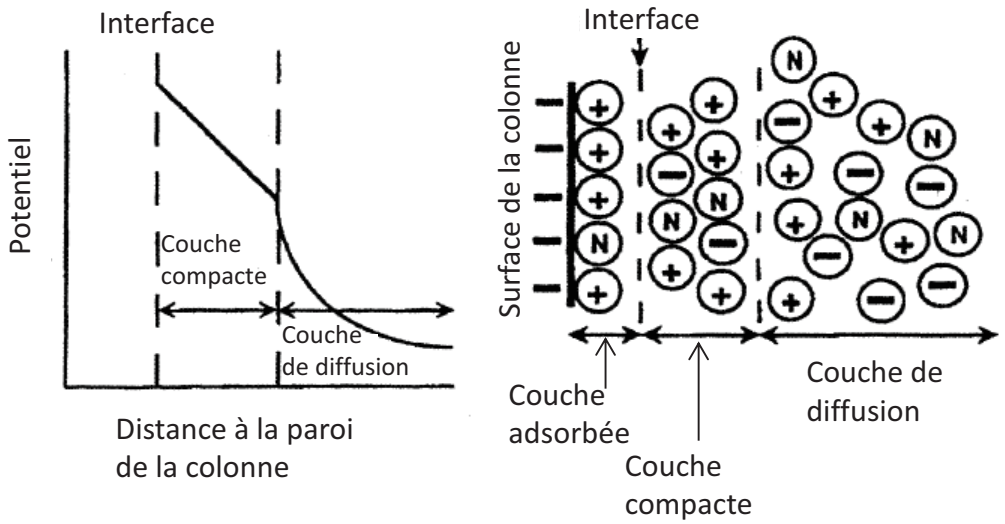


Figure 239 : Représentation du potentiel zeta et de la double couche électrique à la surface d'un capillaire

Le principe de l'électrophorèse capillaire de zone est la migration de composés dans un capillaire en solution dans un tampon aqueux soumis à un champ électrique. C'est pour cela qu'en électrophorèse capillaire on parlera de temps de migration et non de temps de rétention, comme en chromatographie liquide. Une tension est appliquée entre les deux électrodes, et rapporté à la longueur du capillaire, cela permet de calculer le champ électrique qui est une des grandeurs caractéristiques de l'analyse. Sous l'effet de ce champ, il se produit une mise en mouvement d'une

part de la solution d'élution, qu'on appelle « flux électroosmotique », et d'autre part la mise en mouvement des composés à séparer, qu'on appelle « flux électrophorétique ».

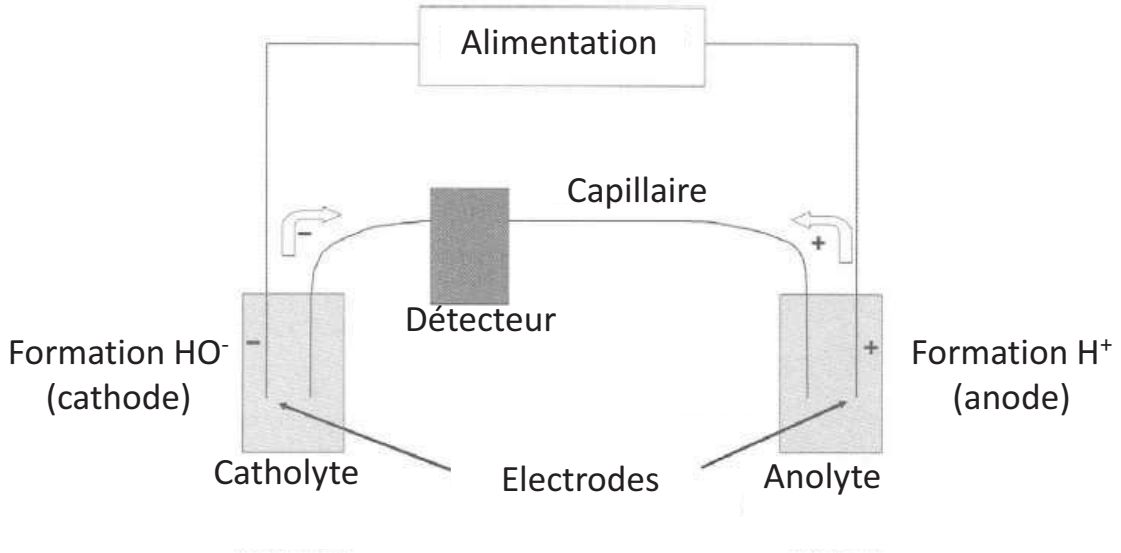


Figure 240 : Représentation d'un circuit d'électrophorèse capillaire. L'anolyte correspond à l'analyte introduit au niveau de l'anode tandis que le catholyte correspond à la sortie du capillaire côté cathode

C'est la combinaison de ces deux flux qui donne une mobilité apparente : $\mu_{app} = \mu_{ep} \pm \mu_{eo}$, où μ_{eo} est la mobilité électroosmotique (aussi appelée mobilité électroendosmotique) et μ_{ep} est la mobilité électrophorétique. L'utilisation de la mobilité électrophorétique en lieu et place du temps de migration permet d'obtenir une plus grande précision car l'impact du flux électroosmotique est exclu du calcul, ce dernier étant davantage sujet à d'importantes variations contrairement à la mobilité et influant directement sur le temps de migration. C'est la raison pour laquelle la mobilité est utilisée en tant que paramètre qualitatif. Concernant les analyses par électrophorèse capillaire de composés, il existe deux grandeurs fondamentales calculables expérimentalement : la vitesse électrophorétique υ_{ep} (en cm/s) et la mobilité électrophorétique μ_{ep} (en cm²/V.s).

Ils sont donnés par les expressions suivantes :

1. $\upsilon_{ep} = \frac{L_d}{t_m}$, où L_d est la longueur du capillaire entre le point d'injection et la fenêtre de détection (voir Figure 241) et t_m, le temps de migration.
2. $\mu_{ep} = \frac{\upsilon_{ep}}{E}$, où E est le champ électrique appliqué au capillaire.

Il est possible d'exprimer le champ électrique de la façon suivante : $E = \frac{V}{L_t}$, où V est la tension appliquée pour obtenir l'expression finale de la mobilité électrophorétique :

$$\mu_{ep} = \frac{L_d/t_m}{V/L_t}$$

Il est important d'après ces expressions de minimiser la différence entre L_t et L_d (voir Figure 241) car le voltage maintenu après la fenêtre de détection est en quelque sorte perdu. En effet, les molécules sont déjà passées devant la fenêtre de détection concluant la séparation dans le capillaire et la séparation grâce à ce voltage est donc déjà effectuée et donc inutile. De plus la mobilité calculée grâce à l'équation 3 est une mobilité relative, il faut alors prendre en compte la mobilité électroosmotique pour avoir la vraie mobilité. Ceci est possible à l'aide d'un marqueur neutre dont le flux électrophorétique sera donc nul.

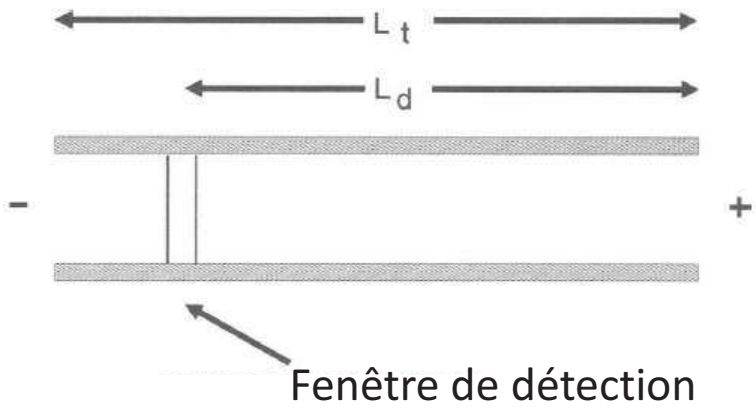


Figure 241 : Différence entre longueur totale d'un capillaire L_t d'EC et la longueur de séparation L_d

Un autre paramètre important pour les analyses par électrophorèse capillaire est le pH de la solution tampon utilisée. Cette dernière doit permettre la migration de la molécule étudiée vers la fenêtre de détection. D'où la nécessité de connaître le point isoélectrique de composés tels que des zwitterions, ce qui est le cas des peptides JMV4854 et JMV4854-d_4 de ce rapport, afin de pouvoir utilisé un tampon adéquat pour une bonne migration des molécules (voir Figure 242).

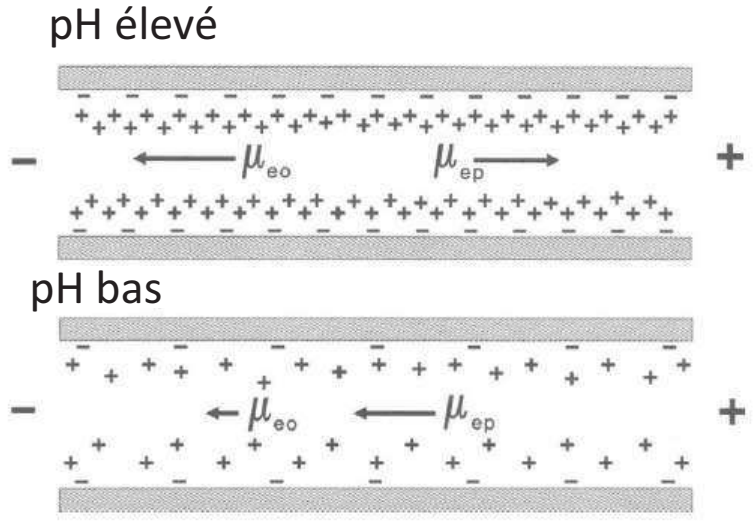


Figure 242 : Représentation de la migration d'un zwitterion en fonction du pH

I.A.2. Quelques applications de l'électrophorèse capillaire

Au cours des dernières décennies, l'électrophorèse capillaire a évoluée de la technique d'analyse en cours de développement dans des laboratoires de recherche à une technique à multiples applications dans de nombreux champs de recherche tels que les analyses cliniques, environnementales, chimiques et biochimiques, en (bio)pharmacie et en sciences médico-légales.

L'un des plus grands avantages de l'électrophorèse capillaire réside dans ses multiples et diverses applications possibles. A l'origine considérée comme une technique d'analyse de macromolécules biologiques, l'EC s'est montrée très utile pour la séparation de composés comme des acides aminés, des drogues chirales, des vitamines, des pesticides, des ions inorganiques, des acides organiques, des colorants, des surfactants, des peptides (cas des molécules MR 6-D_0 et MR 6-D_4) et protéines, des sucres, des oligonucléotides et des fragments d'ADN.

II.C. Pharmacologie

II.C.1. Catégories des sous-unités des protéines G et cascades de signalisation

II.C.1.a. La sous-unité α

La sous-unité G_α est composée de deux domaines variables : un domaine GTPase et un domaine « hélice α ». C'est cette propriété qui a permis de classer les nombreuses isoformes des sous-unités. Il existe environ 20 différentes sous-unités α qu'il est possible de regrouper selon 6 familles principales :

- $G_{\alpha s}$; parfois abrégé G_α regroupe les sous-unités de type stimulation qui vont activer l'adényl-cyclase dans l'optique d'accroître la synthèse de l'AMPc.
- $G_{\alpha i}$; également abrégé G_i regroupe les sous-unités de type inhibition qui inhibent l'action de l'adényl-cyclase.
- $G_{\alpha q/11}$; elle stimule la phospholipase C.
- $G_{\alpha,olf}$; regroupe les sous-unités associées aux récepteurs olfactifs.
- $G_{\alpha t}$ (transducine) ; elle permet la transduction des signaux visuels dans la rétine sous l'action de la rhodopsine une fois cette dernière excitée par la lumière par isomérisation du *cis*-rétinal de la rhodopsine en *trans*-rétinal (voir Figure 243 ci-dessous).

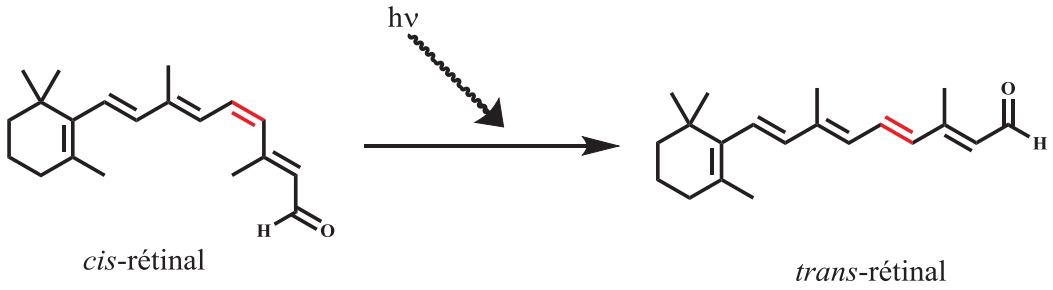


Figure 243 : Isomérisation du rétinal suite à l'absorption d'un photon dans les cellules photosensibles de la rétine. Cela entraîne un « changement conformationnel » de la rhodopsine et la transduction du signal lumineux pour recréer dans l'aire visuelle du cerveau une image.

- $G_{\alpha,12/13}$; elle est impliquée dans la régulation du cytosquelette et de son modelage ainsi que la régulation de la migration cellulaire.
- G_q ; elle permet la stimulation d'une enzyme, la phospholipase C.
- $G_{\alpha12/13}$; regroupe l'ensemble des protéines G dont l'action permet la régulation du cytosquelette, des jonctions cellulaires et d'autres processus liés au mouvement.
- $G_{\alpha15/16}$; regroupe deux protéines G (15 et 16) exprimées dans les cellules hématopoïétiques (i.e : générant toutes les cellules sanguines comme les globules rouges et les cellules de la défense immunitaire) chez la souris et l'homme respectivement. Elles régulent une sous-famille des PLC (PLC-β).[646]

A titre d'exemple, les sous-unités α sont aussi les substrats de l'activité ADP-ribosyl transférase (ADP pour « Adénosine DiPhosphate », voir Figure 244 p.493) des toxines bactériennes cholériques et pertussique (agent de la coqueluche). Ces deux toxines font partie des toxines à mode d'action intracellulaire (toxines AB). Elles sont organisées en deux domaines : le domaine catalytique A qui confère l'activité toxique et le domaine B qui permet la liaison à la cellule. Le mécanisme d'action de ces toxines nécessite en premier lieu une interaction avec la membrane cellulaire. En ce qui concerne la toxine cholérique (AB5), celle-ci va cibler les sous-unités $G_{s\alpha}$ pour les bloquer sous leur forme GTP, empêchant ainsi l'action des RGS. Cela conduit à une rétention de la sous-unité sous forme active qui conduit à une stimulation continue de l'adényl-cyclase et donc à l'augmentation de l'AMPc dans les cellules. La conséquence clinique étant des diarrhées brutales et très abondantes accompagnées de déshydratation. En ce qui concerne la toxine pertussique, celle-ci cible les sous-unités $G_{i\alpha}$ et $G_{o\alpha}$ pour les bloquer sous leur forme GDP entraînant l'absence totale d'inhibition de l'adényl-cyclase et donc l'augmentation de la concentration intracellulaire d'AMPc. La conséquence clinique étant l'apparition de très violentes quintes de toux.

[646] S. Offermanns, M. I. Simon, *J. Biol. Chem.* **1995**, *270*, 15175–15180

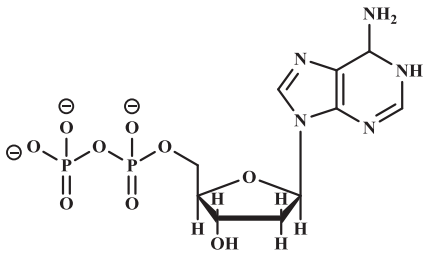


Figure 244 : Structure de l'adénosine diphosphate

II.C.1.b. Le complexe β-γ (Gβ/γ) et une première classe de phospholipase (PLA2)

Les deux sous-unités β et γ sont fortement liées l'une à l'autre, d'où l'utilisation du terme « complexe β-γ ». Celui-ci est libéré de la sous-unité G_α après l'échange GDP-GTP ; il peut alors agir lui-même en tant que molécule signal, on parlera alors de second messager, via l'activation d'autres seconds messager ou en se liant directement à des canaux ioniques.

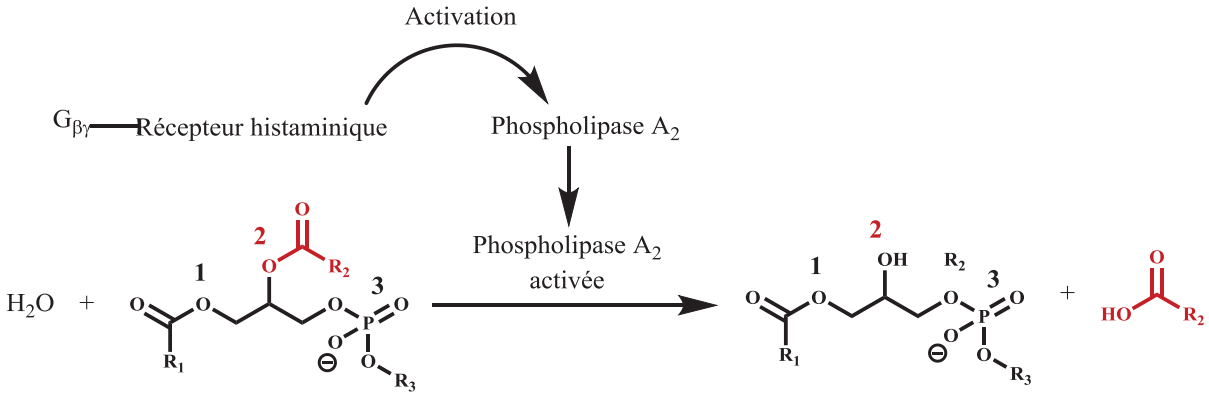


Figure 245 : Exemple d'effet du complexe $G_{\beta\gamma}$ en tant que second messager, dans le cas d'un récepteur histaminique, qui va entraîner l'hydrolyse d'un phosphoglycéride par la phospholipase A_2 activée

A titre d'exemple, dans le cas d'un complexe $G_{\beta\gamma}$ lié à un récepteur histaminique, il peut activer la phospholipase A_2 (PLA_2), une enzyme présente dans les venins d'insectes et de serpents (voir Figure 245 ci-dessus)[647] et également présente au sein d'une majorité de tissus chez les mammifères. Les venins de serpents et d'insectes, comme l'abeille, contiennent une grande quantité de mélittine (voir Figure 246 ci-dessous), un peptide de 26 acides aminés de la séquence suivante : Gly–Ile–Gly–Ala–Val–Leu–Lys–Val–Leu–Thr–Thr–Gly–Leu–Pro–Ala–Leu–Ile–Ser–Trp–Ile–Lys–Arg–Lys–Arg–Gln–Gln–NH_2. Celui-ci joue le rôle d'activateur des phospholipases A_2 pour donner un acide gras et un phosphoglycéride avec un alcool en position 2.

[647] J. P. Nicolas, Y. Lin, G. Lambeau, F. Ghomashchi, M. Lazdunski, M. H. Gelb, *J. Biol. Chem.* **1997**, *272*, 7173–7181

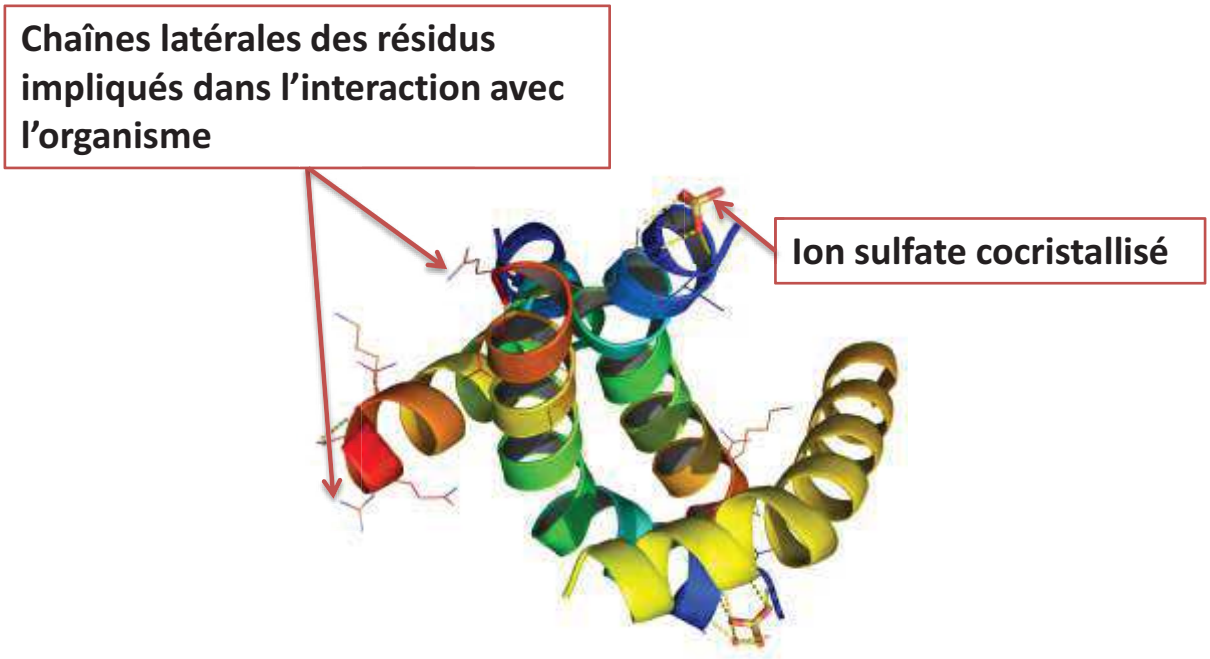


Figure 246 : Structure obtenue par cristallographie de la mélittine sous la forme de l'homotétramère biologiquement actif avec la représentation des chaînes latérales des résidus impliqués dans les interactions avec l'organisme dans lequel est injecté par piqûre le venin d'abeille. Ce polypeptide est un puissant activateur de la PLA2 qui va entraîner une réaction inflammatoire, la rougeur autour de la piqûre d'abeille par exemple

Lorsque l'acide gras libéré de la position 2 du glycérol est l'acide arachidonique, la métabolisation de celui-ci par une autre enzyme (cyclo-oxygénase ou bien lipoxygénase) conduit à la production d'eicosanoïdes. Ces molécules sont des dérivés d'oxydation d'acides gras polyinsaturés à 20 carbones, parmi lesquels des prostaglandines ou encore des leucotriènes, médiateurs de l'inflammation.[648] Ceci expliquant les réactions inflammatoires parfois très violentes qui suivent les morsures de serpent et les piqûres d'insectes.[649]

[648] E. A. Dennis, *J. Biol. Chem.* **1994**, *269*, 13057–13060
[649] A. Argiolas, J. J. Pisano, *J. Biol. Chem.* **1983**, *258*, 13697–13702

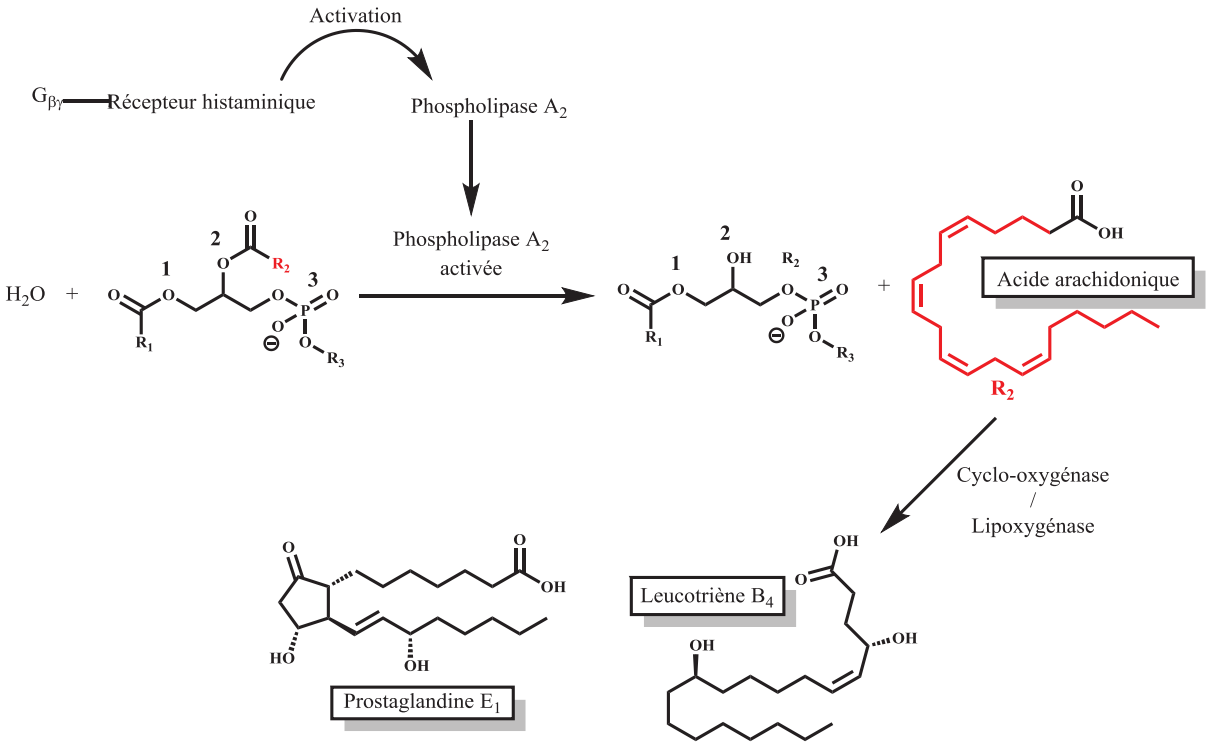


Figure 247 : Exemple d'effet du complexe $G_{\beta\gamma}$ en tant que second messager sur la phospholipase A_2 amenant à la production de molécules médiatrice de la réaction inflammatoire qui suit des morsures d'animaux venimeux ou des piqûres d'insectes.

Autre exemple d'action du complexe $G_{\beta\gamma}$ lorsque celui-ci est lié à un récepteur muscarinique dont le ligand est l'acétylcholine présente dans le milieu extracellulaire (voir Figure 248 p.496). Ce récepteur appartient à la famille des récepteurs métabotropes, qui est une famille de récepteurs ne contenant pas de canaux ioniques contrairement aux récepteurs ionotropes. La conséquence de cette liaison est l'inhibition de l'adényl-cyclase puis la diminution de la concentration en AMPc grâce à l'action de la sous-unité α (voir Figure 11 p.26), et l'activation de la phospholipase C puis l'augmentation de la concentration intracellulaire de deux seconds messagers (diacylglycérol ou DAG et d'inositol triphosphate ou IP_3). Ces derniers sont impliqués dans l'activation ou l'inhibition de plusieurs voies métaboliques ayant pour conséquence l'activation de certains canaux ioniques et peuvent donc jouer sur le potentiel de membrane. Dans le cas de ce récepteur particulier, la liaison de l'agoniste modifie une première fois la conformation du récepteur suivi d'un deuxième changement de conformation suite à l'hydrolyse de GTP en GDP au niveau du canal potassique associé GIRK (pour « G-protein activated Inwardly Rectifying K^+ current »).

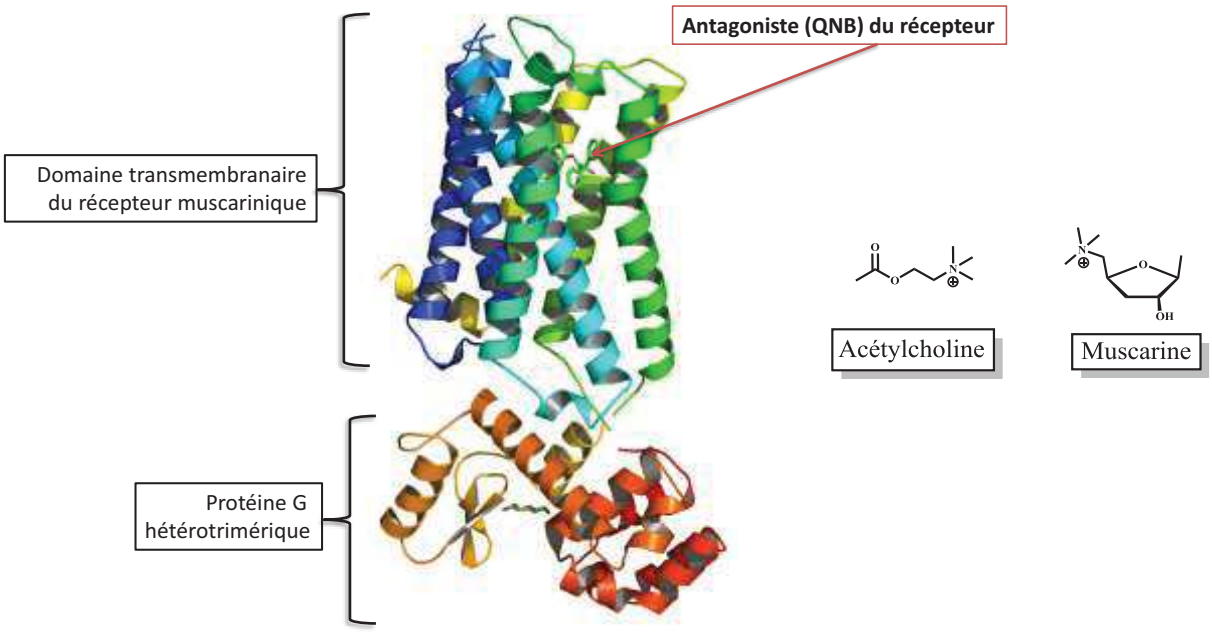


Figure 248 : A gauche, structure obtenue par cristallographie du récepteur muscarinique avec un antagoniste liée au site d'interaction, le QNB (pour « 3-quinuclidinyl-benzilate ») et sa protéine G associée. A droite, l'acétylcholine, agoniste naturel des récepteurs muscariniques et nicotiniques et la muscarine, agoniste utilisé pour différencier les récepteurs nicotiniques et muscariniques ayant une bien plus forte affinité pour ces derniers.

II.C.1.c. Deuxième classe de phospholipase : les phosphodiestérases

Une phosphodiestérase est une enzyme capable de coupe une liaison phosphodiester au niveau de la tête phosphorylée des phospholipides (voir Figure 249 ci-dessous). Ce type d'enzyme regroupe les phosphodiestérases à nucléotide cyclique, les phospholipases C (PLC) et D (PLD), l'autotaxine, les DNases, RNases et les endonucléases de restriction, ces 3 dernières étant capables de couper le squelette phosphodiester de l'ADN et de l'ARN. Les phosphodiestérases à nucléotide cyclique comprennent un groupe d'enzymes capables de dégrader les liaisons phosphodiester en AMPc et GMPc, deux messagers secondaires de la transduction du signal. Les multiples isoformes et sous-types de phosphodiestérases (PDE) ont été isolées à partir de cerveau de rat en utilisant l'électrophorèse avec gel polyacrylamide (SDS-PAGE) au début des années 1970.[650,651] Par la suite, il a été démontré qu'elles étaient inhibée de manière sélective dans le cerveau ainsi que dans d'autres tissus.[652] Dès les années 1970,[653] le potentiel thérapeutique des agents inhibiteurs de phosphodiestérases était avancé et est devenu réalité notamment avec le viagra comme inhibiteur de la PDE5 et le rolipram comme inhibiteur de la PDE4.

[650] P. Uzunov, B. Weiss, *Biochim. Biophys. Acta* **1972**, *284*, 220–226
[651] S. J. Strada, P. Uzunov, B. Weiss, *J. Neurochem.* **1974**, *23*, 1097–1103
[652] R. Fertel, B. Weiss, *Mol. Pharmacol.* **1976**, *12*, 678–687
[653] B. Weiss, W. N. Hait, *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **1977**, *17*, 441–477

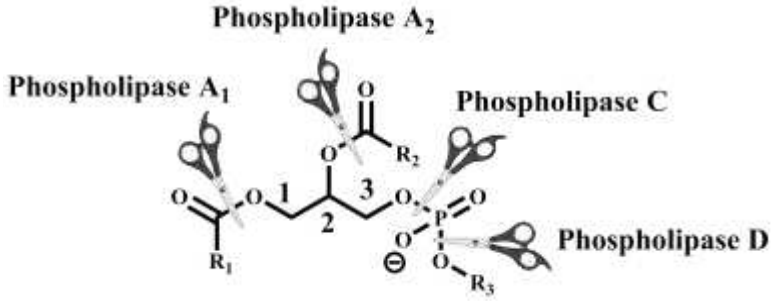


Figure 249 : Sites d'activité enzymatique des différentes classes de phospholipases

La PLC, quant à elle, va conduire à la libération d'un diglycéride et d'un phosphoalcool (voir Figure 250 ci-dessous). *In vivo* la PLC catalyse l'hydrolyse du phosphatidylinositol-4,5-biphosphate (PIP_2), un composé membranaire pour produire un diglycéride et de l'inositol-1,4,5-triphosphate (IP_3). Ce dernier étant un second messager dans la cascade de signalisation de certains RCPG.

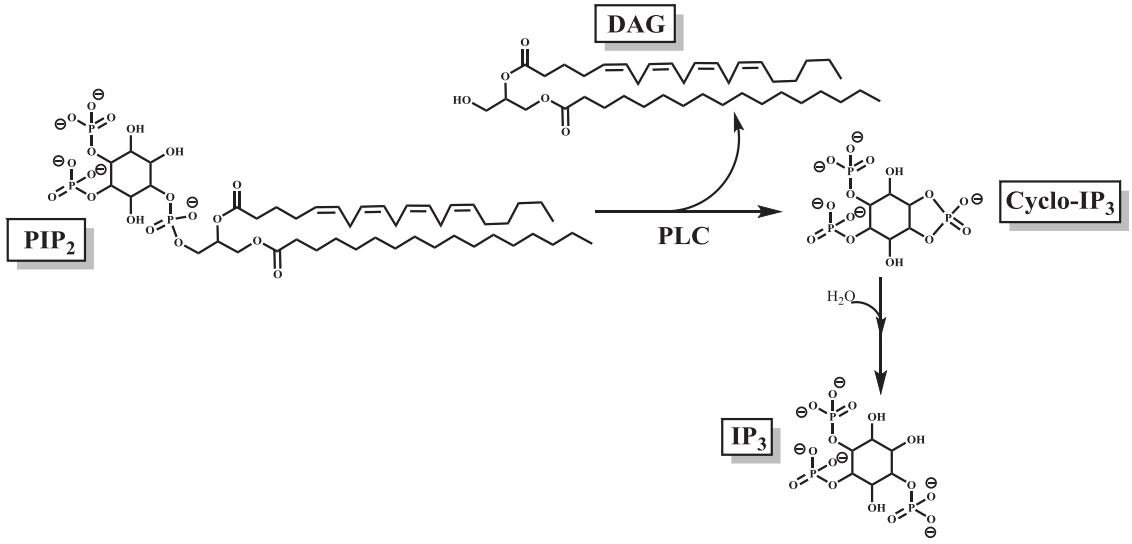


Figure 250 : Exemple de réaction catalysée par la phospholipase C qui aboutit à la formation d'IP_3, un second messager

Il existe quinze types de phospholipases C chez les mammifères classées dans 6 catégories selon leur structure :

- PLC_β : elle est activée par les RCPG et participe à la production d'IP_3, dont l'exemple sera explicité.
- PLC_γ : elle est activée par des récepteurs-enzyme à activité tyrosine kinase.
- PLC_δ : elle est activée par l'IP_3.
- PLC_ε : elle est activée par une petite protéine G (G_{rap}).
- PLC_η[654] : elle est très fortement impliquée dans le développement du cerveau postnatal et dans l'entretien des connexions neuronales.
- PLC_ζ[655] : elle est impliquée dans la spermatogénèse.

[654] K. Kanemaru, M. Nakahara, Y. Nakamura, Y. Hashiguchi, Z. Kouchi, H. Yamaguchi, N. Oshima, H. Kiyonari, K. Fukami, *Gene Expression Patterns* **2010**, *10*, 119–126

Les activateurs de chaque PLC varient entre une sous-unité de protéine G hétérotrimérique, une protéine tyrosine kinase, une petite protéine G, un ion Ca^{2+} ou des phospholipides.[656] Chez les mammifères, les PLC partagent une structure centrale commune tout en différant par d'autres domaines spécifiques pour chaque famille. Le cœur de ces enzymes inclus un « TIM », ou tonneau de triose-phosphate isomérase (TIM pour « triosephosphate isomerase ») qui consiste en une alternance de huit hélices α et huit feuillets β parallèles, un domaine d'homologie à pleckstrine[657], quatre domaines en tandem « main EF »[658] et un domaine de type C2[659]. Le tonneau TIM contient le site actif ainsi que tous les résidus nécessaires à la catalyse et un site de liaison pour Ca2+. La PLC comprend également un site autoinhibiteur qui stoppe l'activité de celle-ci, le lien X-Y (voir Figure 251 ci-dessous). Celui-ci va occulter le site actif de la PLC, la rendant inactive tandis que son retrait permet la réactivation de cette dernière.[660]

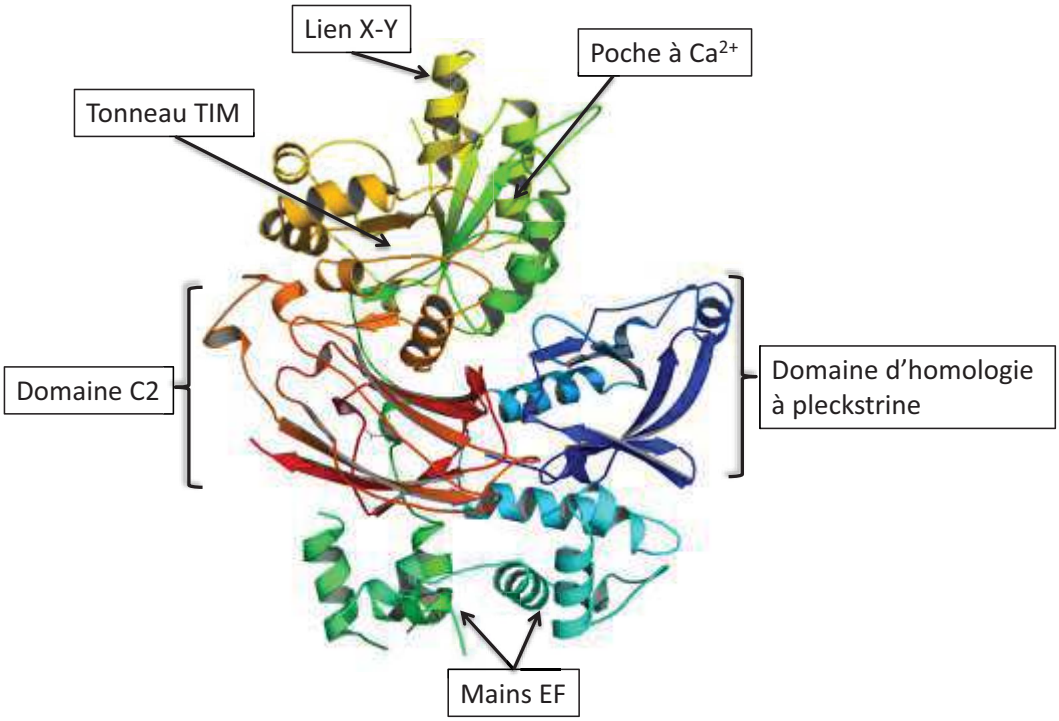


Figure 251 : Structure de la protéine de mammifère PLC-β2 obtenue par cristallisation avec lien X-Y (hélice α), domaine C2 (feuillets β), mains EF (hélices α), tonneau TIM (hélices α) et le domaine d'homologie de pleckstrine (en bleu)

La réaction de catalyse par la PLC s'effectue sur un substrat insoluble à l'interface lipide/eau, les deux produits finaux étant le DAG et l'IP_3, après hydrolyse de l'intermédiaire cyclique Cyclo-IP_3 (voir Figure 250 p.497). Pour cette catalyse acido-basique de PIP_2, deux résidus histidines et un ion

[655] R. Schrimpf, C. Dierks, G. Martinsson, H. Sieme, O. Distl, *PLoS ONE* **2014**, *9*, e109675
[656] G. Kadamur, E. M. Ross, *Annual Review of Physiology* **2013**, *75*, 127–154.
[657] Permet de lier des molécules comme les phosphatidylinositol pour les amener vers un compartiment cellulaire approprié ou pour leur permettre de réagir avec d'autres composants au cours de la transduction du signal.
[658] Permet de lier un ion Ca^{2+}.
[659] Permet à la protéine équipée de ce domaine d'être amenée au contact de la membrane plasmique et de s'y lier.
[660] S. N. Hicks, M. R. Jezyk, S. Gershburg, J. P. Seifert, T. K. Harden, J. Sondek, *Mol. Cell* **2008**, *31*, 383–394

Ca^{2+} sont nécessaires et il a été observé que le site actif à Ca^{2+} est coordinné avec quatre résidus acides dont la mutation ne serait-ce que d'un seul requerrait une concentration en Ca^{2+} beaucoup plus importante.[661]

Cas de la PLC-β

Cette PLC fonctionne selon le mécanisme décrit en Figure 250 p.497. Sa particularité réside dans sa capacité à fixer l'IP_3 sur ses récepteurs pour ensuite induire l'activation des canaux calciques des réservoirs du réticulum endoplasmique. Ceci ayant pour conséquence la sortie de calcium et une augmentation de la concentration cytosolique en ion Ca2+. Lorsque celle-ci est faible, une coopérativité positive est observée avec une augmentation de l'affinité des autres sites pour l'IP_3. A l'inverse, lorsque la concentration en Ca2+ est forte l'affinité des autres sites diminue pour au final donner une régulation en cloche. Cette augmentation rapide est appelée « signal calcique » et fait partie de la transduction du signal à partir des RCPG. Ce signal, à son, tour active diverses protéines dépendante du calcium comme la calmoduline.[662] Ces protéines peuvent ensuite activer des protéines kinases qui vont à leur tour déclencher différents effets cellulaires grâce à des phosphorylations successives. Une autre fonction importante du calcium est la translocation, ou transport, de protéines kinases C à partir du cytoplasme où elles sont inactives jusqu'à la membrane plasmique où elles seront activées par les diglycérides de type DAG issus de l'hydrolyse du PIP_2. A noter que ces mêmes diglycérides peuvent aussi être hydrolysés par une diglycéride lipase qui libèrera de l'acide arachidonique, qui comme vu au paragraphe (II.C.1.b p.II.C.1.b493 avec PLA2), peut conduire à la production de molécules médiatrices de l'inflammation.

Afin d'éviter une carence en calcium intracellulaire, les stocks de ce dernier seront reconstitués grâce à la pompe SERCA pour « Sarco Endoplasmic Reticulum Ca^{2+} pump » qui permet de faire rentrer les ions Ca^{2+} dans la cellule puis dans les stocks de celle-ci par un système de transport actif contre le gradient de concentration et en présence d'ATP. En outre, l'IP_3 peut à nouveau être phosphorylé pour donner l'inositol 1,3,4,5-tétrakisphosphate (IP_4), molécule capable d'agir sur les canaux à calcium de la membrane cellulaire. Cela permet également de faire rentrer du calcium extracellulaire.[663]

II.C.1.d. Troisième classe de phospholipase : les phospholipases A1

Les phospholipase A_1 ont été découvertes au début du XX^{è} siècle en 1903 lors d'expérimentations qui ont montré une altération de la phosphatidylcholine en présence de venin de cobra rouge en produits conduisant à l'hémolyse dans les globules rouges. Il a fallu attendre 1971

[661] M. V. Ellis, *Journal of Biological Chemistry* **1998**, *273*, 11650–11659
[662] Y. Saimi, C. Kung, *Annual Review of Physiology* **2002**, *64*, 289–311
[663] M. Mayrleitner, R. Schäfer, S. Fleischer, *Cell Calcium* **1995**, *17*, 141–153

pour obtenir la PLA_1 sous forme purifiée grâce aux travaux de Scandella et al.[664] Cette enzyme catalyse spécifiquement l'hydrolyse de phospholipides en position 1. On la retrouve dans le plasma de mammifères, le foie de rat ou encore le cerveau de bovins, sans oublier quelques parasites (métazoaires et protozoaires) et bien sûr dans le venin de serpent.

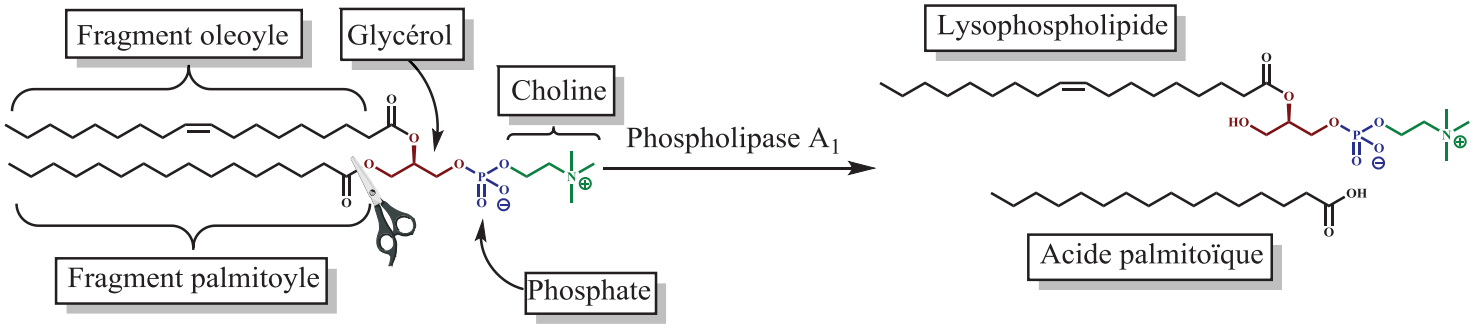


Figure 252 : Action de l'enzyme PLA_1 sur la phosphatidylcholine (phospholipide de gauche) qui produit un lysophospholipide et un acide gras à partir de phospholipides[665]

A l'inverse des connaissances à propos des autres phospholipases, il reste énormément à découvrir à propos de PLA_1 par manque de moyens de purification, de clonage mais également d'expression sans oublier la caractérisation de la protéine. Fort heureusement il a été montré que PLA_1 pouvait être produite dans des cultures de levure S. cerevisiae et A. orysae en augmentant les sources d'azote et de carbone.[666]

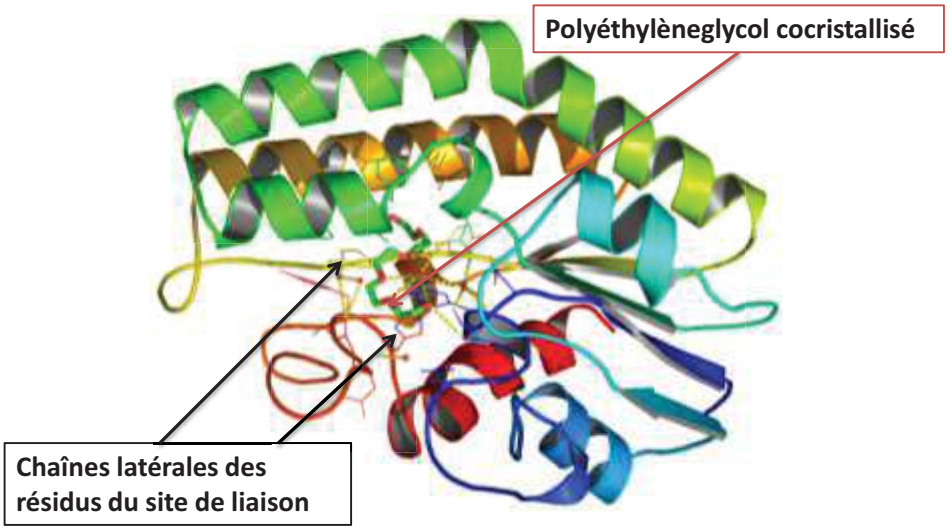


Figure 253 : Structure cristalline de la phospholipase A1 cocristallisée avec du polyéthylèneglycol obtenue en 2001 par Murayama et al. Les chaînes latérales des résidus impliqués dans la liaison au ligand sont représentées en bâtonnets.[667]

[664] C. J. Scandella, A. Kornberg, *Biochemistry* **1971**, *10*, 4447–4456
[665] G. S. Richmond, T. K. Smith, *International Journal of Molecular Sciences* **2011**, *12*, 588–612
[666] Y. Shiba, C. Ono, F. Fukui, I. Watanabe, N. Serizawa, K. Gomi, H. Yoshikawa, *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **2001**, *65*, 94–101
[667] K. Murayama, K. Kano, Y. Matsumoto, D. Sugimori, *Journal of Structural Biology* **2013**, *182*, 192–196

II.C.2. Démonstration de l'équation de Cheng-Prusoff pour une expérience de compétition à l'équilibre entre un ligand et un compétiteur sur un récepteur

Soit l'expression de la vitesse de formation du complexe formé entre le récepteur [R] et le ligand traceur marqué [RL*] : $v_1 = k_1.[R].[L]$et celle de dissociation du complexe [RL*] : $v_2 = k_2.[RL^*]$ (**équation a**), lors de l'introduction du compétiteur et $v_2{}' = k_2.[RL^*]'$ (**équation b**) en l'absence de compétiteur [C].

A l'équilibre lors de l'expérience de compétition, les deux cinétiques v_1 et v_2 sont égales et on retrouve donc :

$$k_1.[R].[L] = k_2.[RL^*]$$

Pour aboutir à :

(1) : $[RL^*] = \frac{k_1.[R].[L]}{k_2} = \frac{[R].[L]}{K_d}$, avec $K_d = \frac{k_2}{k_1}$, la constante de dissociation

Etant donné que [R] est difficile à mesurer expérimentalement, exprimons-le de la manière suivante : **(2a)** : $[R] = [R_T] - [RL^*] - [RC]$, avec [RC] la concentration en complexe compétiteur-ligand

Ce qui nous permet d'obtenir l'expression suivante à partir de **(1)** :

(3a) : $[RL^*] = \frac{([R_T]-[RL^*]-[RC]).[L]}{K_d}$

Or, la constante de dissociation (K_i, dont la nomenclature vient de la démonstration de Cheng-Prusoff dans le cadre d'une compétition avec un inhibiteur « I ») du complexe [RC] peut s'exprimer telle que :

$$K_i = \frac{[R].[C]}{[RC]} \leftrightarrow [RC] = \frac{[R].[C]}{K_i}$$

Nous avons également précédemment vu que [R] pouvait être exprimé à partir de l'expression **(1)**, ce qui nous permet d'obtenir :

$$[RL^*] = \frac{[R].[L]}{K_d} \leftrightarrow [R] = \frac{K_d.[RL]}{[L]}$$

Et enfin :

(4) : $[RC] = \frac{K_d.[RL].[C]}{K_i.[L]}$

En combinant les expressions **(3a)** et **(4)**, nous obtenons l'expression suivante :

$$[RL^*].K_d = [L].([R_T] - [RL^*]) - \frac{K_d.[RL^*].[C]}{K_i}$$

Qui nous amène, en factorisant par [RL*], à :

$$\textbf{(5)} : [RL^*] = \frac{[L].[R_T]}{K_d+[L]+\frac{K_d[C]}{K_i}} = \frac{[L].[R_T]}{K_d.(1+\frac{1}{K_i}[C])+[L]}$$

Or, d'après l'**équation a** de formation du complexe [RL*], on peut formuler l'équation suivante :

$$\textbf{(6a)} : v_2 = k_2.\frac{[L].[R_T]}{K_d.(1+\frac{1}{K_i}[C])+[L]}$$

Reprenons maintenant l'équation **(2a)** dans le cas où aucun compétiteur n'est pas en jeu. Cela nous permet d'obtenir l'équation :

$$\textbf{(2b)} : [R] = [R_T] - [RL^*]$$

Et en effectuant les mêmes précédentes opérations mathématiques, nous arrivons à l'expression :

$$\textbf{(3b)} : [RL^*] = \frac{([R_T]-[RL^*]).[L]}{K_d}$$

Puis à l'équation :

$$\textbf{(5b)} : [RL^*] = \frac{[L].[R_T]}{K_d+[L]}$$

Et enfin à l'équation suivante grâce à l'**équation b** :

$$\textbf{(6b)} : v_2{}' = k_2.\frac{[L].[R_T]}{K_d+[L]}$$

Afin de calculer la constante de dissociation K_i du compétiteur [C], il faut se placer à une concentration pour laquelle 50 % des récepteurs sont occupés par le compétiteur, ce qui peut s'exprimer tel que : $[C] = [C_{50}] = IC_{50}$ car à l'origine, l'étude concernait une compétition d'une enzyme en présence de l'inhibiteur « I », d'où le terme IC_{50} pour « Inhibition concentration at 50 % of inhibited enzyme ». L'équation **(6a)** devient alors :

$$v_2 = k_2.\frac{[L].[R_T]}{K_d.(1+\frac{1}{K_i}IC_{50})+[L]}$$

Or, à 50 % d'occupation du récepteur par le compétiteur, la vitesse de formation du complexe [RL*] sera deux fois plus lente car la moitié des récepteurs sont occupés par le compétiteur [C] et l'autre moitié par le ligand marqué [L*], ce qui fait que la concentration en complexe [RL*] à l'équilibre sera divisée par deux :

$$v_2 = k_2.[RL^*] = k_2.\frac{[RL^*]'}{2} = \frac{v_2{}'}{2}$$

Ce qui nous permet d'obtenir l'égalité suivante :

$$k_2.\frac{[L].[R_T]}{K_d.(1+\frac{1}{K_i}IC_{50})+[L]} = \frac{k_2}{2}.\frac{[L].[R_T]}{K_d+[L]}$$

Après simplification on obtient :

$$\frac{2}{K_d.(1+\frac{1}{K_i}IC_{50})+[L]} = \frac{1}{K_d.+[L]}$$

Et après réarrangement :

$$K_d + [L] = \frac{K_d}{K_i}IC_{50} \leftrightarrow 1 + \frac{[L]}{K_d} = \frac{IC_{50}}{K_i}$$

Pour finalement obtenir l'équation de Cheng-Prusoff :

$$K_i = \frac{IC_{50}}{1+\frac{[L]}{K_d}}$$

II.C.3. Le rouge de phénol et son utilisation en pharmacologie

Le rouge de phénol, connu également sous le nom de phénolsulfonephtaléine ou PSP est un indicateur de pH fréquemment utilisé dans les laboratoires de biologie cellulaire. En effet, grâce à son pK_a évalué à 8 à 20 °C, sa couleur évolue de façon graduelle du jaune en deçà de la valeur de pH 6,8 jusqu'au rouge à 8,2 et au rose fushia au-delà de 8,2.

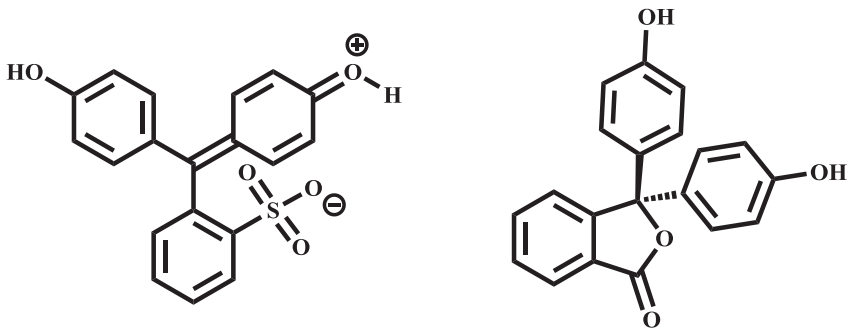


Figure 254 : Structure du rouge de phénol (gauche) et de la phénolphtaléine (droite)

Dans plusieurs sources la structure du rouge de phénol est donnée avec l'atome de soufre faisant partie avec un oxygène adjacent d'un cycle à 5 chaînons de manière similaire à la phénolphtaléine. Cependant, la structure cyclique n'a pas pu être confirmée par cristallographie aux rayons X.[668] Sous forme cristalline et à pH acide, cette molécule existe sous la forme zwiterrionique représentée ci-dessus parfois écrite « $H_2^+PS^-$ » de couleur rouge-orangé. La cétone protonée perd son proton au-delà du pH 1,2 pour devenir jaune et est notée « HPS^- ». Enfin, le phénol est déprotoné au-delà du pH 7,7 pour donner une solution de couleur progressivement rose fushia noté « PS^- ».[669]

[668] K. Yamaguchi, Z. Tamura, M. Maeda, *Analytical Sciences* **1997**, *13*, 521–522
[669] Z. Tamura, M. Maeda, *Yakugaku Zasshi* **1997**, *117*, 764–770

Le PSP était utilisé pour le test à la phénolsulfonphtaléine, aujourd'hui obsolète, qui consistait en l'estimation du flux sanguin au travers des reins. Le test était basé sur le fait que ce composé est excrété presque entièrement par l'urine. Le produit était donc administré en intraveineuse suivi de la collecte de l'urine. La fonction rénale était alors estimée en mesurant par colorimétrie la quantité de phénol excrétée.

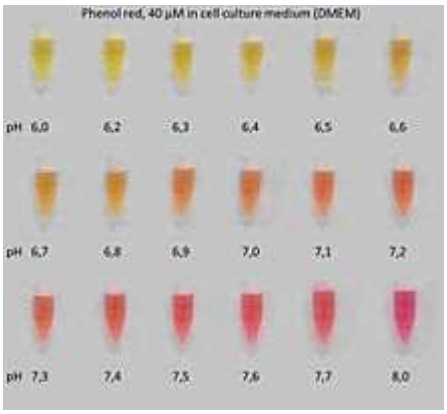


Figure 255 : Evolution de la coloration d'une solution de rouge de phénol en fonction du pH

A l'heure actuelle il est surtout utilisé en culture cellulaire, domaine d'étude au sein duquel la plupart des tissus vivants étudiés croissent à un pH neutre proche de 7, sachant que le pH du sang évolue entre 7,35 et 7,45 à titre d'exemple. Lors de la phase de croissance des cellules, une petite quantité de rouge de phénol est ajouté (15 mg/L environ) au milieu de croissance, lui donnant ainsi une couleur rosée. Pendant cette phase de croissance cellulaire, les déchets produits par des cellules mourantes ou bien une surcroissance d'un contaminant, bactérien par exemple, aura pour conséquence un changement du pH, habituellement orienté vers une baisse de celui-ci et un changement de couleur vers le jaune. C'est un moyen simple pour les biologistes de vérifier la santé de la culture cellulaire et de prévoir le bon moment pour remplacer le milieu de culture cellulaire, c'est-à-dire avant que celui-ci ne devienne totalement jaune.

Un point problématique de cet indicateur coloré est sa capacité à mimer les œstrogènes, ce qui le rend apte à accélérer la croissance de cellules exprimant le récepteur aux œstrogènes.[670] Sa présence dans le milieu de culture affecte le niveau de base de la réponse hormonale et de manière similaire la possibilité des œstrogènes exogènes de stimuler cette réponse au-dessus du seuil de base.

[670] Y. Berthois, J. A. Katzenellenbogen, B. S. Katzenellenbogen, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **1986**, *83*, 2496–2500

Résumé de la thèse :

La dilution isotopique, SID pour « Stable Isotope Dilution », est une méthode largement utilisée pour la quantification de peptides et protéines en spectrométrie de masse, généralement associée aux techniques d'ionisation ambiante. Les travaux de cette thèse sont donc consacrés à l'application de la méthodologie de la dilution isotopique (SID) en spectrométrie de masse par désorption/ionisation laser assistée par une matrice (MALDI) pour la mesure d'interaction récepteur/ligand en pharmacologie. En effet, un nombre important de pathologies mettent en jeu des récepteurs membranaires tels que les récepteurs couplés aux protéines G (RCPG) en interaction avec différents ligands, souvent peptidiques. En particulier, le récepteur V_{1A} est impliqué dans l'activité vasoconstrictrice de l'hormone peptidique AVP (Arginine VasoPressine) et la contraction de cellules musculaires ainsi que dans certains comportements sociaux. Ce récepteur a été choisi comme modèle d'étude nécessitant le marquage par voie chimique du ligand Homo-HO-LVA (pour « Hydroxy Linear Vasopressin Antagonist »), sélectionné pour sa forte affinité envers le récepteur V_{1A} afin d'introduire l'entité permettant le dosage en SID/MALDI. Cette méthodologie est mise en œuvre via la génération d'une liaison covalente de la matrice HCCA (4-hydroxy-α-cyanocinnamic acid), couramment utilisée pour l'analyse peptidique pour obtenir le peptide modifié (JMV4854) par acylation en position N-terminale. Le but est alors de tirer profit de l'utilisation conjointe de ce marquage et de la matrice neutre HCCE (4-hydroxy-α-cyanocinnamate de méthyle) pour la détection spécifique et sensible de composés jusqu'à des concentrations picomolaires. L'étape stratégique de quantification par dilution isotopique nécessite un étalonnage et une validation statistique avant de pouvoir passer à l'application pharmacologique. Celle-ci consiste à mesurer l'affinité du JMV4854 pour le récepteur V_{1A} par des expériences thermodynamiques de mesure de constantes de dissociation (K_d) afin de déterminer par la suite des constantes de dissociation de molécules non marquées via des expériences de compétition. Un second modèle de récepteur, le CCKB-R (cholecystokinine B receptor), a ensuite été étudié pour valider la méthodologie de quantification. Devant le regain d'intérêt des laboratoires pharmaceutiques pour les expériences cinétiques de mesure de constantes de dissociation, il serait intéressant d'y appliquer cette méthodologie. Celle-ci présente un potentiel intéressant en tant qu'alternative aux méthodologies actuellement incontournables que sont la radioactivité et la fluorescence. Un second d'axe d'étude a été initié avec un marquage conçu pour diriger la fragmentation de peptides pour des mesures en spectrométrie de masse en tandem par ionisation Electrospray (ESI-MS/MS). Des modifications par introduction en position N-terminale des peptides d'une charge fixe ont été envisagées. Des études préliminaires (synthèse d'ions préformés par incorporation d'une entité pyridinium) ont montré un comportement prometteur en fragmentation ouvrant de nouvelles perspectives de quantification.

Title : Isotopic dilution in MALDI-ToF mass spectrometry for measurement of interaction between G protein coupled receptors and peptidic ligands

Thesis synopsis :

The SID methodology, for Stable Isotope Dilution, is a widely applied methodology for peptides and proteins analysis in mass spectrometry, usually associated with atmospheric pressure ionisation techniques. This thesis is consequently devoted to the application of SID methodology in matrix assisted laser desorption/ionisation (MALDI) mass spectrometry to quantify receptor/ligand interaction in pharmacology. Indeed, a great number of pathologies involve membrane receptors like G protein coupled receptors (GPCR) in interaction with several ligands, frequently peptides. Particularly, the V_{1A} receptor, is related to vasoconstriction activity of the peptide hormone AVP (arginine vasopressine) and contraction of muscular cells as well as many social behaviors. This receptor was chosen as model, requiring the chemical labelling of the ligand Homo-HO-LVA (Hydroxy Linear Vasopressin Antagonist), selected for its high affinity towards the V_{1A} receptor in order to introduce the entity on which relies the quantification in SID/MALDI. This methodology is applied through the covalent binding of HCCA (4-hydroxy-α-cyanocinnamic acid) matrix, usually encountered in peptide analysis, to obtain the modified peptide (JMV4854) through N-terminal acylation. The objective is to take advantage of the use of both HCCA tagging and HCCE (4-hydroxy-α-cinnamic methyl ester) matrix for the specific and sensitive detection of compounds down to picomolar concentrations. Importantly, quantification with SID requires a calibration protocol and a statistical validation before pharmacological assays. This consists in the measurement of JMV4854 affinity towards V_{1A}-R through thermodynamic experiments in order to quantify the dissociation constant (K_d) and determine afterwards constants for untagged molecules by competitive binding assays. Furthermore, a second receptor model, CCKB-R (cholecystokinine B receptor), was then studied to validate the quantification methodology. Facing the renewed interest in pharmaceutic industry of kinetic experiments for dissociation constant measurement, it would be interesting to apply this new methodology to drug discovery, representing a relevant alternative to current "gold-standard" methodologies such as radioactivity and fluorescence. A second field of research has been initiated with a covalent labelling designed to enhance peptide fragmentation for electrospray-based (ESI-MS/MS) tandem mass spectrometry measurements. Preliminary studies with the synthesis of pre-formed ions like N-terminal substitution with pyridinium entities gave very promising results opening the way of other quantification strategies.

Chimie organique, minérale et industrielle

Mots-clés : Spectrométrie de masse, dilution isotopique, MALDI, pharmacologie, vasopressine, V_{1A}-R, affinité, RCPG, peptide, marquage chimique

Intitulé et adresse de l'U.F.R ou du laboratoire :

Institut des Biomolécules Max Mousseron (IBMM)
UMR 5247 – CNRS, Université de Montpellier
Faculté des sciences, 2 place Eugène Bataillon, cc 01703, 37095 Montpellier cedex 5, France