



HAL
open science

**Analyse d'une protéine biomarqueur d'intoxication par
des agents neurotoxiques : développement
d'immunoabsorbants et de réacteurs enzymatiques,
couplés en ligne à la chromatographie liquide et à la
spectrométrie de masse**

Maud Bonichon

► **To cite this version:**

Maud Bonichon. Analyse d'une protéine biomarqueur d'intoxication par des agents neurotoxiques : développement d'immunoabsorbants et de réacteurs enzymatiques, couplés en ligne à la chromatographie liquide et à la spectrométrie de masse. Chimie-Physique [physics.chem-ph]. Université Pierre et Marie Curie - Paris VI, 2017. Français. NNT : 2017PA066228 . tel-01686150

HAL Id: tel-01686150

<https://theses.hal.science/tel-01686150>

Submitted on 17 Jan 2018

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

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

THESE DE DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ PIERRE ET MARIE CURIE
ED 388

Spécialité chimie analytique, physique et théorique

Présentée par
Maud BONICHON

Pour obtenir le grade de
Docteur de l'Université Pierre et Marie Curie

**Analyse d'une protéine biomarqueur d'intoxication par des agents
neurotoxiques : développement d'immunoabsorbants et de
réacteurs enzymatiques, couplés en ligne à la chromatographie
liquide et à la spectrométrie de masse**

Thèse dirigée par Mme Valérie Pichon (Pr)

Soutenance prévue le 27 septembre 2017 devant le jury composé de :

M^{me} Claire Demesmay , Professeur, Université Claude Bernard Lyon1	Rapporteur
M. Jean-Luc Veuthey , Professeur, Université de Genève, Suisse	Rapporteur
M. Ludovic Bellot-Gurlet , Professeur, UPMC, Paris	Examineur
M. Florian Nachon , Docteur, IRBA, Brétigny	Examineur
M^{me} Valérie Pichon , Professeur, UPMC, Paris	Directrice de thèse

UMR Chimie, Biologie et Innovation 8231 CNRS/ESPCI
Laboratoire Sciences Analytiques, Bioanalytiques et Miniaturisation
Ecole Supérieure de Physique et de Chimie Industrielles de la ville de Paris (ESPCI Paris)
10 rue Vauquelin 75231 Paris Cedex 05

Remerciements

Je tiens, tout d'abord, à exprimer ma gratitude au Professeur Claire Demesmay ainsi qu'au Professeur Jean-Luc Veuthey pour avoir accepté de juger la qualité de mes travaux en tant que rapporteurs. Mes remerciements vont également au Professeur Ludovic Bellot-Gurlet et au Docteur Florian Nachon pour leur implication et pour le temps qu'ils ont consacré à l'examen de ce manuscrit.

Je remercie le Professeur Valérie Pichon pour m'avoir initiée et formée à la recherche. Merci pour son encadrement, sa rigueur et sa disponibilité tout au long de la thèse. Je la remercie pour la confiance et la liberté quelle m'a accordée et je lui suis extrêmement reconnaissante d'avoir pu travailler dans de si bonnes conditions. Je la remercie également de m'avoir permis de présenter mes résultats lors de congrès nationaux et internationaux.

Je souhaite également remercier le Docteur Audrey Combès pour son encadrement et son implication tout au long de ce projet. Merci pour le temps et l'implication que tu m'as consacré alors que j'étais encore jeune débutante en chromatographie.

Je remercie les Dr. Anne Bossée et Charlotte Desoubries, de la DGA NRBC, pour avoir suivi, corrigé et encadré ces travaux de thèse. Merci pour votre implication et pour vos précieux conseils qui ont participé au bon déroulement de ce projet.

Je remercie Saida El Abdellaoui et Mélanie Cohen pour m'avoir aidé à remettre en état des appareils capricieux et le Docteur Jérôme Vial pour ses conseils en chimiométrie. Merci au Docteur Didier Thiebault pour ses discussions animées et à Patrice Legeay pour le partage de ses connaissances en chimie des solutions. Je remercie Patrick Sassiati pour ses conseils et son aide en mécanique, ainsi que pour ses mémorables barbecues.

Je remercie Valentina, qui en tant que stagiaire Erasmus, a contribué au bon déroulement de la fin de ce projet de thèse. Merci pour son aide, son enthousiasme, et son implication.

Je remercie tous les membres du LSABM pour leur accueil et les bons moments partagés. En particulier les doctorants, post-doctorants et stagiaires du laboratoire que j'ai pu rencontrés au cours des ces trois ans. Je remercie tout particulièrement Lorena, Vincent, Sara, Julien, Manel, Joachim, Stéphanie et Porkodi. J'adresse également une pensée amicale à

l'ensemble des membres thésards et non thésards, et à toutes les personnes que j'ai été amené à côtoyer au LSABM pendant ces trois années.

Je veux remercier ma famille et mes amis pour avoir rendu ces trois années de thèse inoubliables. Merci à mes parents, mamie, Aurélia, Claire, à la famille Rigail et à la famille Dubois-Revel, mais surtout à Adrien pour m'avoir soutenue et encouragée tout au long de ce projet. Je remercie également mes amis : Anaïs, Fayçal, Claire et Nadine, pour leur soutien et pour tous les moments de rires partagés.

Enfin, je dédie ce manuscrit à Jacotte et Jacqueline, ainsi qu'à Georges et Gilbert avec qui j'aurais tant souhaité partager cette expérience.

Avertissement au lecteur

Cette thèse est rédigée comme une succession de chapitres, dont certains sont construits sur la structure d'articles (publiés ou soumis) pouvant se lire indépendamment. Ceci peut donc engendrer des changements entre la langue française et anglaise ainsi que quelques redondances entre les différentes rubriques matériels et méthodes ou les introductions.

Tables des matières

LISTE DES PUBLICATIONS ET COMMUNICATIONS	11
LISTE DES ABREVIATIONS	14
INTRODUCTION GENERALE	16
CHAPITRE I - BUTYRYLCHOLINESTERASE, ENZYME BIOMARQUEUR D'EXPOSITION A DES AGENTS NEUROTOXIQUES ORGANOPHOSPHORES....	20
1. Structure et mode de fonctionnement des enzymes	20
1.1. Structure des enzymes.....	20
1.2. Mode de fonctionnement des enzymes	22
1.3. Structure et fonction de la butyrylcholinestérase	23
2. Les agents neurotoxiques organophosphorés.....	25
2.1. Modes d'actions des agents neurotoxiques organophosphorés	25
2.2. Analyse des OPNA dans les échantillons biologiques	29
3. Analyse de la butyrylcholinestérase	31
3.1. Extraction de la butyrylcholinestérase	33
3.2. Digestion de la butyrylcholinestérase	34
4. Analyse des adduits OPNA-BuChE par LC-MS²	37
5. Conclusion.....	40
CHAPITRE II - APPORT DES SUPPORTS A BASE DE BIOMOLECULES IMMOBILISEES POUR L'ANALYSE DE PEPTIDES	44
1. Immunoextraction de molécules ciblées	44
1.1. Les anticorps	44
1.2. Procédure d'immunoextraction.....	47
1.3. Préparation de l'immunoadsorbant	48
1.4. Apport de l'immunoaffinité pour l'extraction de la BuChE du plasma	52

2. Digestion en réacteur enzymatique (IMER).....	59
2.1. Principe	59
2.2. Supports d'immobilisation.....	59
2.3. Méthodes d'immobilisation	61
2.4. Influence des paramètres chimiques et physiques sur la digestion	62
3. Couplage en ligne des supports de protéines immobilisés au système chromatographique.....	63
3.1. Couplage de l'IMER au système chromatographique.....	63
3.2. Couplage de l'immunoadsorbant au système chromatographique	65
3.3. Couplage en ligne de l'immunoadsorbant et de l'IMER à la LC-MS	65
4. Conclusions et perspectives.....	66

CHAPITRE III - DEVELOPPEMENT D'UNE METHODE DE DIGESTION DE LA BUCHE SUR SUPPORTS D'ENZYMES IMMOBILISEES 71

Article 1: Development of immobilized-pepsin reactors coupled to nano liquid chromatography and tandem mass spectrometry for the quantitative analysis of human butyrylcholinesterase 72

1. Introduction	73
2. Experimental.....	76
2.1. Chemicals.....	76
2.2. Apparatus and HPLC-MS analysis	76
2.3. Preparation of pepsin-based IMER	77
2.4. Quantification of pepsin grafted on IMER.....	78
2.5. HuBuChE digestion procedures	78
2.5.1. In-solution digestion.....	78
2.5.2. IMER digestions.....	79
3. Results and discussion.....	79
3.1. Analysis of HuBuChE peptides by nanoLC-MS ²	79
3.2. Development of an optimized HuBuChE digestion on IMER	81
3.2.1. Choice of the support	81
3.2.2. Estimation of pepsin grafting yields on IMER.....	82

3.2.3.	Optimization of the digestion procedure	83
3.3.	Repeatability of IMER digestion	86
3.4.	Effect of the amount of pepsin on digestion yields	88
4.	Conclusions	89
CHAPITRE IV : IMMUNOEXTRACTION COUPLEE A LA DIGESTION EN LIGNE POUR L'ANALYSE DE LA BUCHE PLASMATIQUE		93
1.	Stratégie analytique.....	93
2.	Choix des supports	93
Article 2: Development of immunosorbents coupled on-line to immobilized pepsin reactor and microLC- MS² for analysis of butyrylcholinesterase in human plasma.....		96
1.	Introduction	97
2.	Experimental.....	99
2.1.	Chemicals.....	99
2.2.	MicroLC-MS analysis.....	100
2.3.	Preparation of the immunosorbents	101
2.3.1.	Sepharose-based immunosorbents.....	101
2.3.2.	Epoxy resin-based immunosorbents.....	102
2.3.3.	Quantification of antibodies grafted on sepharose and epoxy resin	102
2.4.	Immunosorbents coupled to UV detection.....	103
2.5.	Preparation of pepsin-based IMER	104
2.6.	Quantification of pepsin grafted on IMER.....	104
2.7.	HuBuChE digestion procedure on IMER.....	105
2.8.	Immunoextraction and digestion steps coupled on-line to microLC-MS ²	105
3.	Results and discussion.....	106
3.1.	Preparation of immunosorbents and evaluation of their grafting yields.....	106
3.1.1.	Sepharose-based immunosorbents.....	106
3.1.2.	Epoxy resin-based immunosorbent	107
3.2.	Immunoextraction of HuBuChE	109

3.3.	On-line coupling of IMER to microLC-MS ²	111
3.3.1.	Analysis of HuBuChE peptides by microLC-MS ²	111
3.3.2.	Digestion of HuBuChE on IMER coupled on-line to microLC-MS ²	114
3.4.	On-line coupling of immunosorbents to IMER and microLC-MS ²	115
3.5.	Optimization of the immunoextraction procedure	117
3.6.	On-line analysis of HuBuChE from plasma.....	118
4.	Conclusions	120

CHAPITRE V : IMMUNOEXTRACTION ET DIGESTION EN LIGNE POUR L'ANALYSE DE BUCHE ADDUITE PAR DES AGENTS NEUROTOXIQUES ORGANOPHOSPHORES..... 124

Article 3: On-line coupling of immunoextraction, digestion and micro liquid chromatography-tandem mass spectrometry for the analysis of sarin and soman-butyrylcholinesterase adducts in human plasma 126

1.	Introduction	127
2.	Experimental.....	129
2.1.	Chemicals.....	129
2.2.	MicroLC-MS analysis.....	130
2.3.	Synthesis of pepsin-based IMER	131
2.4.	Synthesis of sepharose-based immunosorbents	132
2.5.	Purification of HuBuChE and OPNA-HuBuChE adducts from plasma	132
2.5.1.	Immunosorbents and IMER coupled on-line to microLC-MS ²	132
2.5.2.	Procainamide gel	133
2.5.3.	Huprine gel	134
3.	Results and discussion	135
3.1.	Analysis of plasma without OPNA by the on-line coupling of IS and IMER to microLC-MS ²	135
3.2.	Repeatability of the IS mAb2 synthesis	138
3.3.	Analysis of plasma spiked with sarin and soman by the on-line coupling of IS and IMER to microLC-MS ²	139
3.4.	Comparison of the on-line set-up with the procainamide and huprine approaches.....	143

4. Conclusion.....	147
CONCLUSION GENERALE	149
ANNEXES.....	151
LISTE DES TABLEAUX ET FIGURES	161
REFERENCES	165
RESUME.....	184
ABSTRACT	185

Liste des publications et communications

PUBLICATIONS

“Development of immobilized-pepsin microreactors coupled to nano liquid chromatography and tandem mass spectrometry for the quantitative analysis of human butyrylcholinesterase” M.Bonichon, A. Combès, C. Desoubries, A. Bossée, V. Pichon, *Journal of Chromatography A*, 1461 (2016) 84.

“Development of immunosorbents coupled on-line to immobilized pepsin reactor and microLC-MS² for the analysis of butyrylcholinesterase in human plasma” M.Bonichon, A. Combès, C. Desoubries, A. Bossée, V. Pichon, *Journal of Chromatography A*, Article Soumis

“On-line coupling of immunoextraction, digestion and micro liquid chromatography-tandem mass spectrometry for the analysis of sarin and soman-butyrylcholinesterase adducts in human plasma ” M.Bonichon, V. Valbi, A. Combès, C. Desoubries, A. Bossée, V. Pichon, *Journal of Analytical and Bioanalytical Chemistry*, Article Soumis

COMMUNICATIONS ORALES

Symposiums internationaux

M.Bonichon, A. Combès, C. Desoubries, A. Bossée, V. Pichon. “Development of immunosorbents coupled on-line to immobilized pepsin reactor and microLC-MS² for the analysis of chemical weapons in human plasma” ExTech 2017, 9th International Symposium on Advances in Extraction Technologies, Saint Jacques de Compostelle, Espagne, 27-30 juin 2017

M.Bonichon, A. Combès, C. Desoubries, A. Bossée, V. Pichon. “Development and characterization of immunosorbents for the selective extraction of BuChE from human plasma prior to enzymatic microreactor digestion and micro-LC-MS² analysis” HTC-14, 14th

International Symposium on Hyphenated Techniques in Chromatography and Separation Technology, Ghent, Belgique, 27-29 janvier 2016 - Flash Poster.

M.Bonichon, A. Combès, C. Desoubries, A. Bossée, V. Pichon. “Development of enzymatic microreactors coupled with nano-liquid chromatography and mass spectrometry for quantitative analysis of human butyrylcholinesterase” HPLC 2015, International Symposium on High Performances Liquid Phase Separations and related techniques, Genève, Suisse, 21-25 juin 2015 - Flash Poster.

Symposiums nationaux

M.Bonichon, A. Combès, C. Desoubries, A. Bossée, V. Pichon. « Immunoextraction et digestion enzymatique couplées en ligne à la microLC-MS² pour l’analyse d’une protéine, biomarqueur d’exposition aux organophosphorés » Congrès SEP 17 (11^{ème} congrès francophone sur les sciences séparatives), Paris, France, 29 mars 2017.

M.Bonichon, A. Combès, C. Desoubries, A. Bossée, V. Pichon. « Développement de microréacteurs enzymatiques pour l’analyse de BuChE humaine par nanoLC-MS/MS » Journée du Club Ile de France de l’AFSEP, Paris, France, 24 mars 2016.

M.Bonichon, A. Combès, C. Desoubries, A. Bossée, V. Pichon. « Analyse d’un adduit peptidique organophosphoré de la butyrylcholinestérase, biomarqueur de l’intoxication par un agent neurotoxique » Journée d’accueil des doctorants DGA, Paris, France, 14 janvier 2015.

M.Bonichon, A. Combès, C. Desoubries, A. Bossée, V. Pichon. « Analyse d’un adduit peptidique organophosphoré de la butyrylcholinestérase, biomarqueur de l’intoxication par un agent neurotoxique » Journée des doctorants de l’ED 388, Paris, France, 28 mai 2015.

Autres conférences :

V. Pichon, **M.Bonichon**, E. Fazel. « Miniaturized and selective monoliths coupled on line to nanoLC for the determination of target analytes at the trace level in complex samples”,

HTC-14, 14th International Symposium on Hyphenated Techniques in Chromatography and Separation Technology, Ghent, Belgique, 27-29 janvier 2016.

M. Bonichon, A. Combès, V. Pichon, “Development of enzymatic microreactors for the on-line analysis of a target protein in LC and nanoLC-MS”, ExTech 2016, 18th International Symposium on Advances in Extraction Technologies (ExTech'2016) combined with the 22nd International Symposium on Separation Science, Torun, Pologne, 3-6 juillet 2016.

COMMUNICATIONS PAR AFFICHE

M. Bonichon, A. Combès, C. Desoubries, A. Bossée, V. Pichon. "Development and characterization of immunosorbents for the selective extraction of BuChE from human plasma prior to enzymatic microreactor digestion and microLC-MS² analysis." ISC 2016, 31st International Symposium on Chromatography, Cork, Irlande, 29 Août 2016.

M. Bonichon, A. Combès, C. Desoubries, A. Bossée, V. Pichon. “Development and characterization of immunosorbents for the selective extraction of BuChE from human plasma prior to enzymatic microreactor digestion and microLC-MS² analysis” HTC-14, 14th International Symposium on Hyphenated Techniques in Chromatography and Separation Technology, Ghent, Belgique, 27-29 janvier 2016 - *Prix Poster*

M. Bonichon, A. Combès, C. Desoubries, A. Bossée, V. Pichon. “Development of enzymatic microreactors coupled with nano-liquid chromatography and mass spectrometry for quantitative analysis of human butyrylcholinesterase” HPLC 2015, International Symposium on High Performances Liquid Phase Separations and related techniques, Genève, Suisse, 21-25 juin 2015 - *Prix Poster*

LISTE DES ABREVIATIONS

A : Alanine

Ac : Anticorps (Ab)

AChE : Acétylcholinestérase

ACN : Acétonitrile

A.F : Acide formique

BuChE : Butyrylcholinestérase

ChE : Cholinestérases

CIE : Chromatogramme d'ions extraits

Da : Dalton

E : Acide glutamique

E.I : Etalon interne

ESI : Electrospray

EtP : Phosphonate d'éthyle

ExP: Phosphoryle d'éthyle

F : Phenylalanine

G : Glycine

GB : Sarin

GD : Soman

GE : Ethyl sarin

GF : Cyclosarin

GC : Chromatographie en phase gazeuse

HF-LPME : Microextraction liquide assistée par fibre creuse

HPLC : Chromatographie liquide haute performance

HuBuChE : Butyrylcholinestérase humaine /Human Butyrylcholinesterase

IgG : Immunoglobuline G

IMER : Réacteur enzymatique /IMmobilized Enzyme Reactor

IMS : Immunomagnetic separation

IS : Immunoabsorbant

LC : Chromatographie en phase liquide

LOD : Limite de détection (LDD)

LOQ : Limite de quantification (LDQ)

MALDI : Désorption-ionisation laser assistée par matrice
MeP : Acide methylphosphonique
MIP : Polymère à empreintes moléculaires
MRM : Multiple reaction monitoring
MS : Spectrométrie de masse
MS/MS : Spectrométrie de masse en tandem
m/z : Masse sur charge
N.C : Non communiqué,
OP : Organophosphoré
OPNA : Agent neurotoxique organophosphoré /OrganoPhosphorus Nerve Agent
P-BuChE : BuChE phosphorylée
pm: Phase mobile
PrP : Phosphonate de propyle
Rpm : Rotation par minute
RV : VX Russe
RSD : Coefficient de variation /Relative Standard Deviation
S : Sérine
SIM : Single Ion Monitoring
SBSE : Stir Bar Sorptive Extraction
SPE : Extraction sur phase solide /Solid Phase Extraction
SPME : Microextraction sur phase solide /Solid-Phase MicroExtraction
S/N : Signal sur bruit (S/B)

INTRODUCTION GENERALE

Utilisés depuis la seconde guerre mondiale, les agents chimiques de guerre tels que le gaz moutarde ou les agents neurotoxiques organophosphorés (OPNA) sont encore de nos jours un danger pour les populations civiles et militaires. La preuve d'attaques chimiques peut être apportée par l'étude d'échantillons environnementaux et biologiques. Lorsqu'ils pénètrent dans le corps, les OPNA se fixent sur le site actif de l'acétylcholinestérase (AChE), protéine impliquée dans la transmission de l'influx nerveux. L'activité de la protéine est alors inhibée, ce qui entraîne la paralysie des systèmes nerveux central, respiratoire et cardiaque. Or, la fixation des OPNA conduit à la formation d'adduits avec l'acétylcholinestérase, qui sont stables pendant plusieurs jours. Par conséquent, ces adduits peuvent servir de biomarqueurs d'exposition à ces agents. Les composés organophosphorés peuvent également se lier à la butyrylcholinestérase (BuChE), une protéine plasmatique homologue à l'AChE. Si son inhibition est bénigne, la butyrylcholinestérase est 10 fois plus concentrée et plus accessible que l'AChE car localisée dans le plasma, ce qui la rend plus intéressante comme biomarqueur d'exposition aux OPNA.

La séparation des protéines, autrefois établie par électrophorèse en gel bidimensionnelle, a trouvé un nouvel essor avec l'utilisation de la chromatographie en phase liquide qui, en plus d'être automatisable, peut être plus facilement couplée en ligne à la spectrométrie de masse via une source d'ionisation de type *electrospray*. De par sa sensibilité et par sa spécificité, la spectrométrie de masse est l'outil de choix pour la caractérisation de biomarqueurs tels que les adduits OPNA-BuChE. Il n'est cependant pas nécessaire de détecter la protéine entière puisque les composés organophosphorés se fixent à la BuChE sur une séquence d'acides aminés spécifique et localisée au niveau du site actif. Une étape préalable de digestion enzymatique de la BuChE est donc fréquemment employée afin de générer puis de détecter les adduits peptidiques. Il s'avère néanmoins problématique de procéder à la digestion enzymatique de l'ensemble des protéines plasmatiques afin d'analyser l'adduit ciblé puisque la butyrylcholinestérase est présente dans le sang à de très faibles concentrations par rapport aux protéines majoritaires. Dans ce cas, le signal en LC-MS du peptide cible serait fortement perturbé par les peptides issus de la digestion des protéines majoritaires du plasma. Les faibles concentrations d'adduits OPNA-BuChE ont entraîné le développement de méthodes sensibles, faisant appel à des étapes de traitement d'échantillon sélectives. Différentes approches ont été proposées pour permettre d'extraire la BuChE du plasma mais

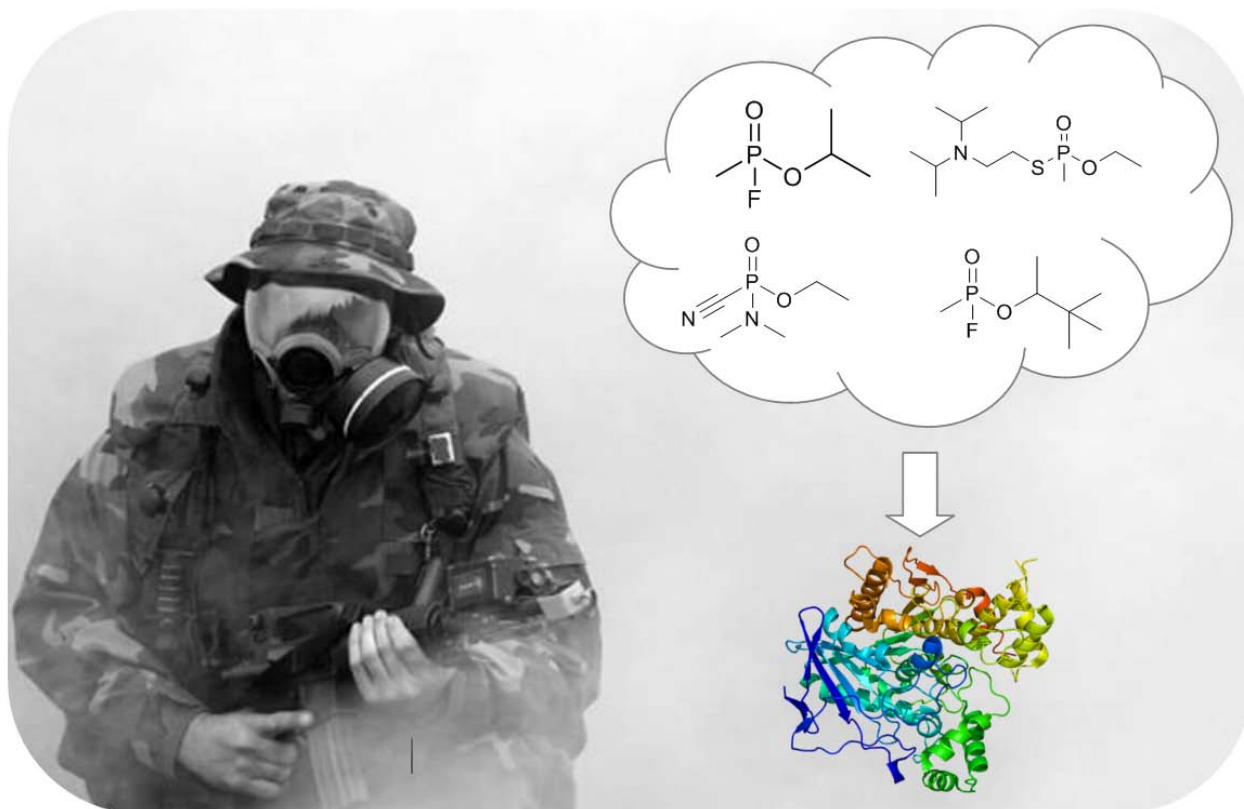
ces techniques comportent de nombreuses étapes et ne permettent pas d'isoler efficacement la BuChE avant sa digestion, ce qui rend alors la quantification des adduits peu robuste. La méthode la plus prometteuse décrite à ce jour utilise l'immunoaffinité pour piéger sélectivement la BuChE présente dans le plasma via l'utilisation d'anticorps spécifiques immobilisés sur un support. Néanmoins, cette méthode implique de préparer un nouveau support pour traiter chaque échantillon car la digestion de la BuChE se fait principalement en présence des anticorps qui sont alors digérés. Cela engendre une méthode de préparation longue et coûteuse et des résultats uniquement discutés d'un point de vue qualitatif puisque les taux de fixation de la BuChE sur les anticorps ou les rendements de digestion par les protéases n'ont jamais été étudiés.

L'objectif de cette thèse est d'élaborer une approche totalement automatisable, limitant la consommation en réactifs, basée sur l'immunoaffinité avec un support réutilisable et combinée à une étape de digestion enzymatique sur support solide et de repiégeage des peptides, ces différentes étapes étant couplées en ligne à l'analyse par chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse. Cette approche doit permettre de gagner en temps d'analyse, en sélectivité et en sensibilité mais aussi en fiabilité de la méthode en limitant le nombre d'interventions sur l'échantillon.

PARTIE BIBLIOGRAPHIQUE

CHAPITRE I

BUTYRYLCHOLINESTERASE, ENZYME BIOMARQUEUR D'EXPOSITION A DES AGENTS NEUROTOXIQUES ORGANOPHOSPHORÉS



Chapitre I - Butyrylcholinesterase, enzyme biomarqueur d'exposition à des agents neurotoxiques organophosphorés

1. Structure et mode de fonctionnement des enzymes

Les enzymes sont des protéines permettant de catalyser des réactions biochimiques dans les organismes vivants. Il existe plus de 3500 enzymes différentes, jouant chacune un rôle important dans les processus physiologiques tels que la digestion, la transmission nerveuse ou encore la synthèse d'hormones.

1.1. Structure des enzymes

Les enzymes, comme l'ensemble des protéines, sont formées de longues chaînes d'acides aminés. Chez l'Homme, il existe vingt acides aminés qui présentent chacun des propriétés différentes en fonction de la nature de leur chaîne latérale R. Ils peuvent être hydrophobes, polaires, acides ou basiques, comme illustré en Annexe 1. D'usage, un code à une ou trois lettres permet de les désigner.

Les acides aminés peuvent être liés entre eux par une liaison peptidique qui conduit à la formation de peptides (assemblage de moins de 50 acides aminés) et de protéines (assemblage de plus de 100 acides aminés) [1]. La liaison peptidique résulte de la liaison entre un groupement α -carbonyle d'un premier acide aminé avec le groupement -amine d'un second acide aminé, ceci entraînant une déshydratation (Figure 1)

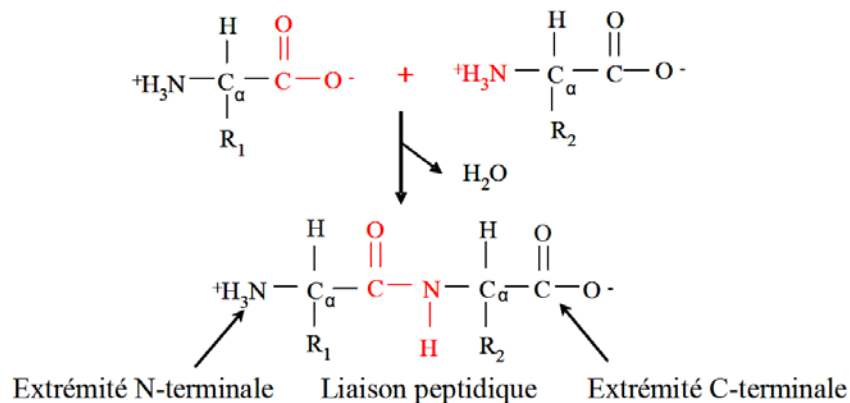


Figure 1. Formation d'une liaison peptidique entre deux acides aminés [1].

L'assemblage d'acides aminés par liaisons peptidiques constitue la structure primaire de la protéine, appelée également séquence d'acides aminés. Par convention, elle s'écrit de la partie N-terminale vers la partie C-terminale. La séquence d'acides aminés va définir la structure tridimensionnelle de la protéine et déterminer sa fonction. Il existe trois niveaux de structures tridimensionnelles qui correspondent à différents niveaux de repliement de la protéine. La structure dite secondaire correspond au repliement des chaînes peptidiques pour former deux types de structures appelées hélice ou feuillet β . L'assemblage de ces deux structures secondaires permet l'obtenir la structure globale de la protéine appelée structure tertiaire (Figure 2). Pour les protéines comportant plus d'une chaîne polypeptidique, l'interaction des différentes chaînes sous forme tertiaire peut induire la formation d'une structure dite quaternaire.

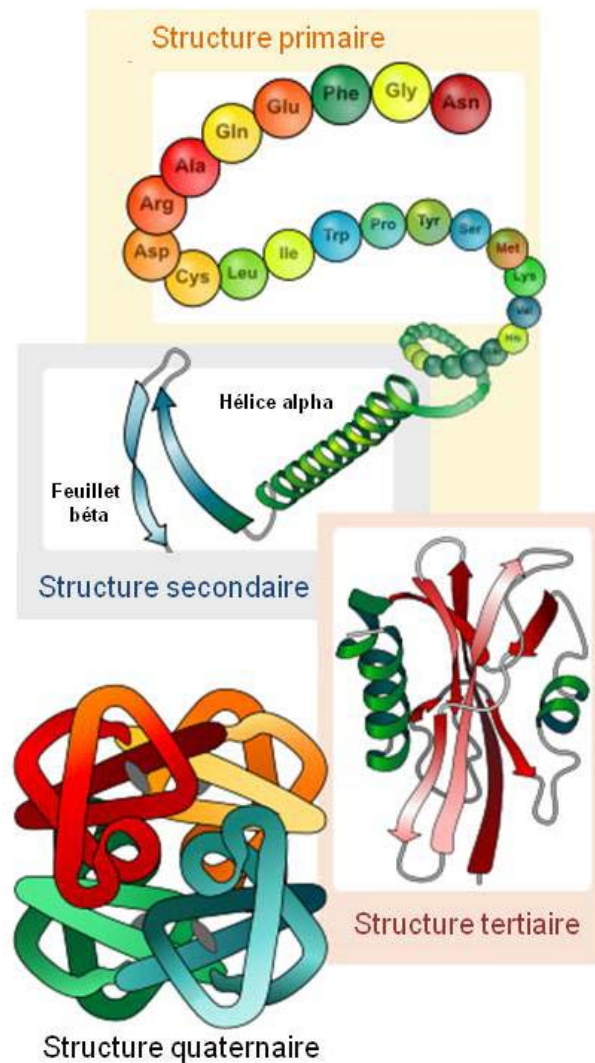


Figure 2 : Représentation des structures primaires, secondaires, tertiaires et quaternaires

La structure tertiaire va être responsable pour les enzymes, de la formation de cavités appelées sites actifs dans lesquels vont se dérouler les réactions enzymatiques.

1.2. Mode de fonctionnement des enzymes

Les enzymes sont répertoriées selon le type de réaction qu'elles catalysent. On en distingue ainsi plusieurs classes, telles que les transférases, les oxydoréductases, les lyases, les ligases, les isomérases et les hydrolases. Chaque enzyme possède un site actif ayant une géométrie complémentaire à un ou plusieurs substrats spécifiques. Les substrats se fixent sur le site actif en formant un complexe enzyme-substrat et sont ensuite convertis en un ou plusieurs produits comme illustré Figure 3 [2]. A la fin de la réaction, l'enzyme est régénérée et peut interagir avec une nouvelle molécule de substrat.

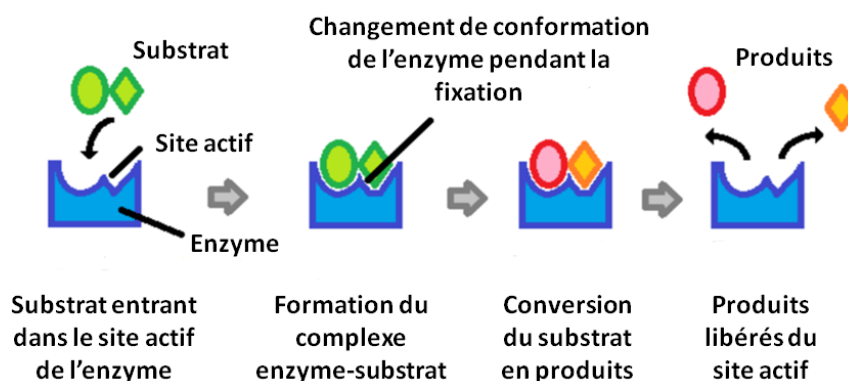


Figure 3. Procédure de catalyse enzymatique. Adapté de [2].

La plupart des enzymes peuvent être dénaturées, c'est-à-dire perdre leurs structures tertiaire et secondaire en présence de molécules extérieures (acides, sels, solvants organiques) ou par un changement de température. Cela va avoir une influence sur l'activité enzymatique, puisque celle-ci est déterminée par la structure tridimensionnelle de l'enzyme. L'activité enzymatique, exprimée en unités (U), se définit comme la quantité d'enzymes nécessaire pour la catalyse d'une micromole de substrat par minute. Elle peut être affectée par deux types de modificateurs chimiques : des molécules activatrices qui augmentent l'activité et des molécules inhibitrices qui la diminuent.

1.3. Structure et fonction de la butyrylcholinestérase

L'acétylcholinestérase (AChE) et la butyrylcholinestérase (BuChE) sont des enzymes de la famille des hydrolases, et plus particulièrement des cholinestérases (ChE) qui permettent notamment de catalyser l'hydrolyse du neurotransmetteur acétylcholine en choline et en acide acétique, comme illustré Figure 4.

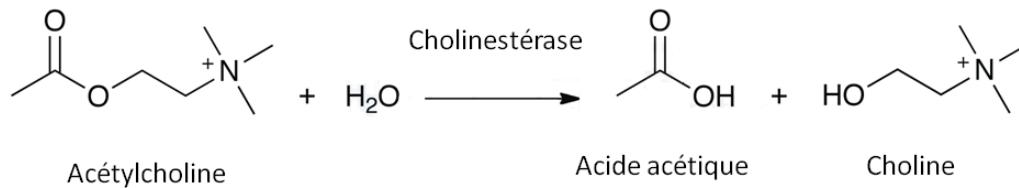


Figure 4. Réaction d'hydrolyse de l'acétylcholine par les cholinestérases.

L'activité de ces enzymes peut être inhibée par les carbamates ou par les composés organophosphorés tels que certains pesticides ou les agents neurotoxiques organophosphorés (OPNA). Par leur très forte affinité pour ceux-ci, les cholinestérases ont fréquemment été utilisées en tant que biomarqueurs d'OPNA. L'utilisation de la BuChE en tant que biomarqueur d'intoxication par des OPNA est devenue plus fréquente que celle de l'AChE du fait de sa présence dans le plasma, qui facilite son extraction, et par sa concentration 10 fois supérieure à celle de l'AChE, localisée dans les globules rouges. Synthétisée par le foie, elle est sécrétée dans le plasma et se retrouve dans les intestins, le cœur, les reins et les poumons. Elle est très similaire à l'acétylcholinestérase avec laquelle elle partage 52% de sa séquence d'acides aminés [3]. Pour la plupart des espèces, le monomère est composé de 574 acides aminés et de trois ponts disulfures aidant à la structure globulaire tridimensionnelle du monomère, dont la séquence d'acides aminés est présentée Figure 5. La BuChE est présente sous différentes formes dans le plasma : monomérique, dimérique ou tétramérique. La forme monomérique peut former un dimère par ponts disulfures entre les cystéines en position 571 [4]. La forme tétramérique est la plus répandue et représente 90% de l'activité de la BuChE dans le plasma. Elle se compose de quatre monomères identiques stabilisés par des interactions hydrophobes au niveau des acides aminés aromatiques dans la région C terminal formant une masse moléculaire totale de 340 kDa (Figure 6) [5]. La BuChE est également une glycoprotéine, glycosylée sur 9 asparagines, les sucres comptant pour 24 % de la masse de la protéine [5]. La masse moléculaire de la chaîne polypeptidique est de 65,1 kDa tandis que

celle de sa forme glycosylée est évaluée à 85 kDa. L'hétérogénéité de la glycosylation de la BuChE, due à son grand nombre de sites de glycosylation, participe à son repliement et à sa stabilité, mais n'affecte pas ses propriétés catalytiques.

1 ED DIIATKNGK VRGMNLTVFG GTVTAFLGIP YAQPPLGRLR FKKPQSLTKW SDIWNATKYA
63 NSCCQNIDQS FPGFHGSEMW NPNTDLSEDC LYLNWVWIPAP KPKNATVLIW IYGGGFQTGT
123 SSLHVVYDGKF LARVERVIVV SMNYRVGALG FLALPGNPEA PGNMGLFDQQ LALQWVQKNI
183 AAFGGNPKSV TLFGE¹⁹⁸SAGAA SVSLHLLSPG SHSLFTRAIL QSGSFNAPWA VTSLYEARNR
243 TLNLAKLTGC SRENETEIIK CLRNKDPQEI LLNEAFVVPY GTPLSVNFGP TVDGDFLTDM
303 PDILLELGQF KKTQILVGVN KDEGTAFVLY GAPGFSKDNN SIITRKEFQE GLKIFFPGVS
363 EFGKESILFH YTDWVDDQRP ENYREALGDV VGDYNFICPA LEFTKKFSEW GNNAFFYYFE
423 HRSSKLPWPE WMGVMHGYEI EFVFGPLER RDNYTKAEEI LRSIVKRWA NFAKYGNPNE
483 TQNNSTSWPV FKSTEQKYLT LNTESTRIMT KLRAQQCRFW TSFFPKVLEM TGNIDEAEWE
543 WKAGFHRWNN YMMDWKNQFN DYTSKKESCV GL

Figure 5. Structure primaire de la butyrylcholinestérase humaine.

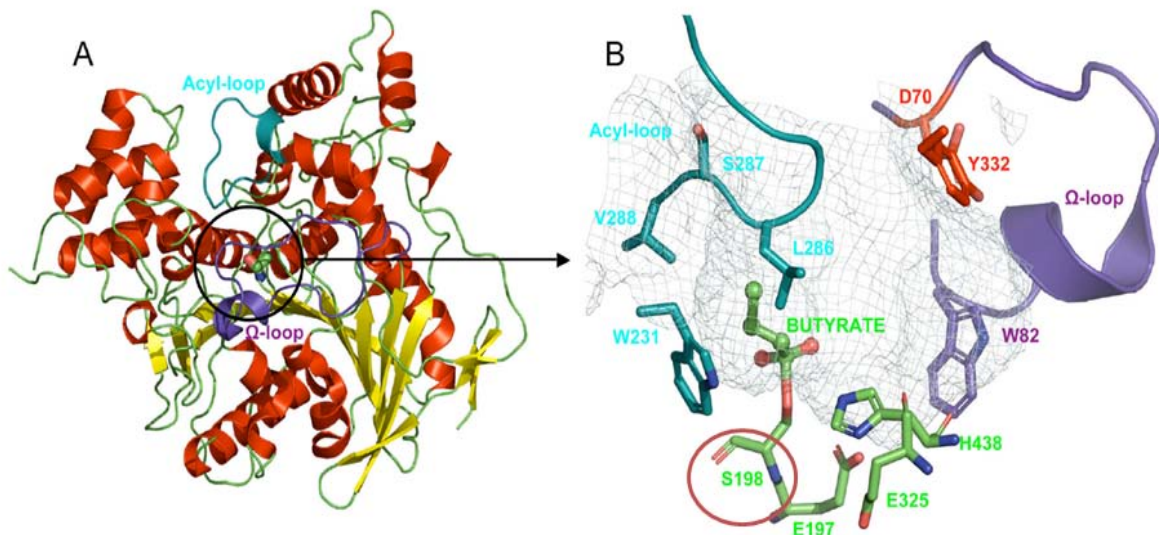


Figure 6. Structure tétramérique de la BuChE (A) et vue détaillée de son site actif (B). Adapté de [5].

La séquence d'acides aminés du site actif de la butyrylcholinestérase a été déterminée en 1986, par Oksana Lockridge et Bert N. La Du, à l'aide du [³H]diisopropylfluorophosphate

[6]. Le site actif de la BuChE comporte notamment une sérine en position 198 (Figure 5 et Figure 6) sur laquelle vont venir se lier les agents neurotoxiques organophosphorés [7].

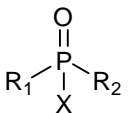
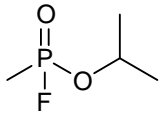
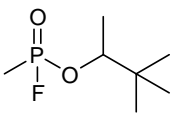
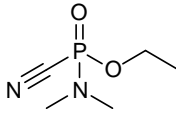
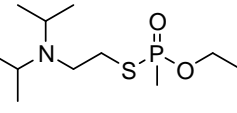
2. Les agents neurotoxiques organophosphorés

2.1. Modes d'actions des agents neurotoxiques organophosphorés

Parmi les différents agents chimiques de guerre, présentés en Annexe 2, les agents neurotoxiques organophosphorés (OPNA) sont les plus toxiques et les plus meurtriers [8]. L'apparition des agents neurotoxiques remonte à la fin des années 1930, avec la synthèse des premiers agents neurotoxiques, le tabun et le sarin, suivie par celle du soman et du cyclosarin. Par la suite, des chimistes britanniques développèrent dans les années 50 des agents de la série V, composés plus létaux que leurs précurseurs. Depuis, les OPNA ont été largement utilisés en tant qu'arme chimique contre des populations civiles ou militaires. L'utilisation de gaz sarin a été reportée lors de la guerre Iran-Irak en 1988 [9] ou encore lors des attentats de mars 1995, dans les métros de Tokyo, par le groupe terroriste Aum Shinrikyo qui firent 12 morts et 5500 empoisonnements [10]. L'utilisation du sarin a également été observée en Syrie dans la région de la Ghouta en août 2013, causant la mort de 1400 personnes [11] et plus récemment en avril 2017 à Khan Cheikhoun, une localité du nord-ouest de la Syrie, avec un bilan de plus de 95 morts et 541 blessés [12]. Le VX a été également utilisée le 13 février 2017 dans l'aéroport de Kuala Lumpur (Malaisie), pour l'assassinat de Kim Jong-nam, demi-frère du dirigeant coréen Kim Jong-Un [13].

Ces attaques ont souligné l'importance de mettre en place des méthodes d'analyses sensibles et spécifiques pour la détection d'OPNA chez l'homme afin d'apporter la preuve d'une exposition et de proposer des traitements médicaux appropriés. Les agents neurotoxiques sont généralement incolores et/ou inodores et peuvent être facilement absorbés par le système respiratoire, la peau et le tube digestif sans causer la moindre irritation susceptible de signaler leur présence. Cependant, même une exposition à court terme peut être fatale. Il existe plus d'une centaine d'agents neurotoxiques répartis en deux catégories: les agents G tels que le sarin (GB), le soman (GD), le tabun (GA) et le cyclosarin (GF), qui sont des composés volatils agissant principalement par inhalation et les agents V, comme le VX, composés semi-volatils très toxiques agissant par voie cutanée. Leur structure générale est présentée Tableau 1, ainsi que celle des quatre OPNA les plus courants.

Table 1. Les 4 principaux OPNA [8].

OPNA	Agents G			Agent V
Structure générale	Sarin	Soman	Tabun	VX
				

Les OPNA sont généralement des composés chiraux à 2 ou 4 énantiomères ayant différents potentiels inhibitifs et toxicité *in vivo*. Certains agents G, en particulier le tabun et le sarin, ne persistent dans l'environnement que pendant de brèves périodes. Les agents V présentent un plus grand danger puisqu'ils persistent longtemps dans l'environnement et sont extrêmement puissants (seulement quelques milligrammes peuvent entraîner la mort). Dans le sang, la demi-vie d'élimination des agents G est relativement courte (1 h) comparée à celles des agents V qui peuvent persister plusieurs heures sous forme native dans le plasma après une exposition cutanée [8].

Bien qu'ils puissent se fixer sur plusieurs protéines appartenant à la famille des sérines estérases (acétylcholinestérase et butyrylcholinestérase) ou encore à l'albumine, la toxicité aigüe des composés organophosphorés provient de leur action rapide sur l'acétylcholinestérase [14]. Lorsque les composés organophosphorés se fixent par liaison covalente sur la fonction hydroxyle du résidu sérine du site actif de l'AChE, l'activité enzymatique est inhibée. L'AChE n'est plus en mesure d'hydrolyser l'acétylcholine, ce qui entraîne son accumulation au niveau des récepteurs synaptiques, qui sont alors saturés [15]. Les symptômes cliniques apparaissent dès 50% d'inhibition de l'activité de l'AChE et incluent des myosis, des convulsions, des difficultés respiratoires et une hypersalivation [16]. Des niveaux d'inhibitions supérieurs à 90% entraînent une intoxication sévère pouvant mener à la mort du patient en quelques minutes. Le contrôle régulier de l'activité des cholinestérases dans le sang des individus régulièrement en contact avec des neurotoxiques peut permettre une détection précoce avant que les symptômes n'apparaissent. En cas d'intoxication sévère, la prise de traitements tels que l'atropine permet de décroître l'accumulation d'acétylcholine au niveau des récepteurs synaptiques par un effet de compétition tandis que des réactivateurs à base d'oximes permettent de réactiver l'acétylcholinestérase [17, 18].

Les OPNA sont des molécules volatiles et dégradables qui peuvent subir deux étapes d'hydrolyses dans le milieu physiologique pour former des acides d'alkyl méthylphosphoniques dont une partie est hydrolysée en acide méthylphosphonique par voie rénale. Ils peuvent également se lier irréversiblement aux serines estérase telles que l'AChE, la BuChE ou encore à l'albumine et à d'autres protéines minoritaires présentes dans le sang et les tissus humains. Les principales évolutions des agents nerveux *in vivo* sont résumées.

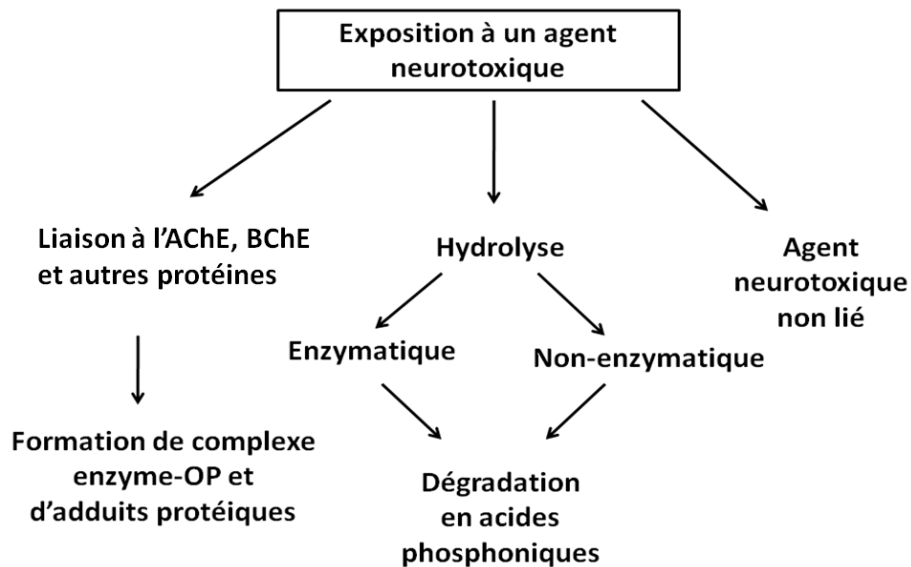


Figure 7. Evolution des agents neurotoxiques après exposition.

Une difficulté rencontrée pour l'identification de l'OPNA à partir des adduits formés avec les cholinestérases provient d'un processus appelé vieillissement [18]. Lors de ce processus, les cholinestérases subissent spontanément une déalkylation au niveau de la liaison alkyl-oxygène (liaison P-N pour le tabun), ce qui entraîne la perte du groupement caractéristique de l'OPNA. L'identification de l'OPNA est alors impossible puisque les masses d'adduit-OPNA ne sont plus spécifiques du composé organophosphoré. De plus, la liaison covalente établie entre la BuChE et la forme vieillie de l'OPNA fixé devient irréversible (Figure 8) [8]. Les complexes peuvent également subir un phénomène de réactivation spontanée par une déphosphylation menant au rétablissement des fonctions de l'enzyme. Cependant ce phénomène est lent et très peu fréquent.

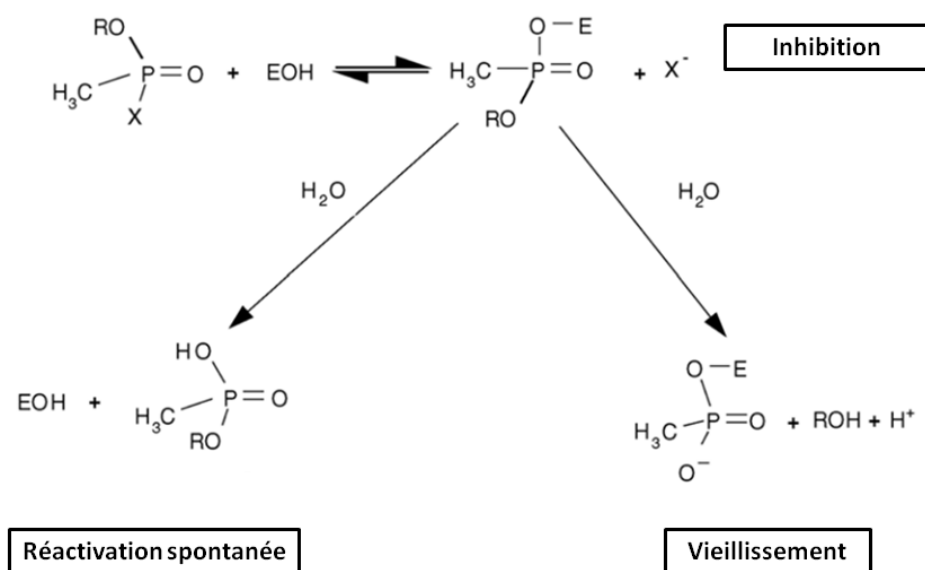


Figure 8. Processus de vieillissement et de réactivation spontanée de l'adduit. EOH se rapporte à l'AChE ou la BuChE native. Adapté de [8].

La liaison OPNA-ChE étant irréversible après vieillissement, seule la synthèse de nouvelles enzymes peut restaurer l'activité initiale [17]. Les cinétiques de vieillissement et de réactivation de l'adduit OPNA-ChE sont dépendantes de l'agent et de l'enzyme. En effet, le vieillissement des adduits dépend des ramifications de la chaîne carbonée sur la liaison o-alkyl phosphoester ou encore de la température et du pH [19]. Les demi-temps de vieillissement et de réactivation des agents les plus communs sont récapitulés dans le Tableau 2 [8].

Table 2. Demi-vies de vieillissement et de réactivation spontanée (en heure) de l'AChE et la BuChE humaines inhibées par des agents neurotoxiques. Issu de [8].

Inhibiteur	AChE		BuChE	
	$t_{1/2}$ vieillissement	$t_{1/2}$ réactivation	$t_{1/2}$ vieillissement	$t_{1/2}$ réactivation
Soman	0,04	-	□0,01	-
Tabun	19,0	-	7	-
Sarin	3,0	-	12	69
Cyclosarin	7,0	-	2,2	20
VX	36,5	-	77	63

Les composés organophosphorés peuvent donc être présents sous différentes formes dans le corps humain après exposition. Cela permet l'utilisation de nombreuses méthodes de détection d'intoxication aux OPNA, présentées dans la section suivante.

2.2. Analyse des OPNA dans les échantillons biologiques

Il existe actuellement cinq approches analytiques pouvant être utilisées pour la détection des composés organophosphorés neurotoxiques.

- **Mesure de l'inhibition des cholinestérases**

La mesure de l'activité enzymatique de l'AChE et de la BuChE dans le sang et le plasma est une approche simple, abordable et rapide pour déterminer l'exposition à des OPNA. Inspirées du test colorimétrique d'Ellman [20], ces tests mesurent la libération de thiocholine issu de la butyrylthiocholine et de l'acétylthiocholine grâce à un réactif colorimétrique (5,5'-dithio-bis acide nitrobenzoïque) ce qui permet des mesures sensibles de l'activité de l'AChE ou de la BuChE dans le plasma [8, 21, 22]. La réaction entre la thiocholine et le réactif colorimétrique produit le 2-thio-*p*-nitro-benzoïque, de couleur jaune, dont l'absorbance est mesurée à 412 nm. L'augmentation de l'absorbance est alors convertie en μ moles de butyrylthiocholine hydrolysée par minute, ce qui permet la mesure de l'activité [20]. Cependant, le test nécessite de connaître l'activité enzymatique avant exposition, ce qui est parfois difficile du fait des variations d'activités enzymatiques intra et interindividuelles dues à l'âge ou l'état de santé. Elles peuvent varier de 6 à 8% pour une même personne et jusqu'à 22% entre plusieurs individus [10, 23]. De plus, la méthode ne permet pas de déterminer quel composé OPNA est présent et est aussi limitée concernant le diagnostic de faibles niveaux d'exposition puisque des niveaux d'inhibitions d'enzymes inférieurs à 20% ne montrent pas de signes cliniques et sont rarement détectables. La diminution de l'activité enzymatique des cholinestérases ne permet par ailleurs pas de prouver la présence d'agents neurotoxiques puisqu'il existe d'autres inhibiteurs de la cholinestérase (ex : carbamates, aspirine) [8].

- **OPNA non métabolisés**

Les OPNA sont des molécules volatiles et dégradables. Néanmoins, la détection de ces composés dans le sang peut se faire par l'utilisation de la chromatographie en phase gazeuse [24] ou liquide [25] couplée à la spectrométrie de masse en tandem et à haute résolution après traitement préalable de l'échantillon par SPE [26], SPME [27] ou précipitation des protéines puis extraction liquide-liquide (chloroforme ou acétate d'éthyle) [24]. Bien que très spécifique et sensible (limite de détection ~1 nmol/L), la vérification rétrospective d'exposition est impossible. En effet, la méthode requiert des analyses rapides puisque les composés organophosphorés ne restent libres que quelques heures dans le sang de par leur forte affinité pour la BuChE et l'AChE en plus de leur faible temps de vie [28, 29].

- **Métabolites d'OPNA**

Comme énoncé, précédemment, les agents neurotoxiques s'hydrolysent très rapidement dans le sang. Ces produits de dégradation sont, contrairement à leurs molécules parents, plutôt polaires et très peu volatils [30]. Ainsi, une méthode d'analyse repose sur la mesure des métabolites d'OPNA dans le sang et les urines en se basant principalement sur l'hydrolyse des composés OPNA en acides méthylphosphoniques détectables dans le sang et les urines par LC-MS² [31, 32], GC/MS après dérivation [33], ou encore par CE/MS. L'étape critique est le traitement d'échantillon puisqu'il est très difficile d'extraire ces produits de dégradation très polaires de matrices aqueuses mais également l'étape de dérivation lors de l'analyse par GC-MS qui est longue et fastidieuse. La SPE C₁₈ [34], SPME et la HF-LPME [30] ont été utilisées pour les étapes d'extraction et les dérivations sont effectuées par silylation, méthylation ou encore par pentafluorobenzoylation. Cette approche ne permet de détecter les métabolites que jusqu'à 72 h après l'exposition et présente dans certains cas des résultats faussés par la présence de métabolites non exclusivement issus de composés organophosphorés [35].

- **Réactivation par ion fluorure**

Une autre méthode est basée sur la réactivation des cholinestérases adduites par l'utilisation d'ions fluorure. Le traitement de l'enzyme par les ions fluorure permet de régénérer l'enzyme en libérant le fragment organophosphoré sous forme d'ion phosphofluoré

[36]. L'analyse de ce dernier par GC-MS permet l'identification de l'OPNA [37]. Cependant, la réactivation au fluor n'est pas applicable aux adduits vieillis, et ne permet donc pas de mesurer les adduits OPNA vieillis, ni les niveaux de BuChE endogènes, ce qui empêche d'évaluer l'ampleur du niveau d'inhibition de la BuChE [18]. En outre, les méthodes de réactivation au fluor sont limitées par la dénaturation et la réactivation spontanée de l'enzyme.

- **Détection des adduits OPNA-ChE par LC-MS**

La détection d'adduits est actuellement la méthode la plus prometteuse. En effet, les composés organophosphorés forment des adduits très stables avec la BuChE et l'AChE, qui peuvent être détectés jusqu'à 16 jours, contrairement à l'analyse directe des OPNA ou de leurs métabolites [10]. Dans la majorité des protocoles, une fois que la BuChE a été purifiée, elle est digérée en fragments peptidiques via des enzymes protéolytiques (pepsine, trypsine, chymotrypsine) et le peptide du site actif comportant l'OPNA est identifié par spectrométrie de masse. Doorn *et al* ont été les premiers, en 2001, à détecter la présence des adduits à partir de BuChE issue de sérum équin inhibée *in vitro* avec de l'isomalathion par MALDI-TOF [38]. Une approche similaire utilisant de l'AChE recombinante humaine inhibée avec divers OPs a été publiée la même année [39]. Cependant, la BuChE étant plus abondante dans le plasma que l'AChE, l'analyse des adduits OPNA-BuChE s'est vite révélée plus avantageuse. Un an plus tard, une autre méthode était décrite impliquant l'utilisation de la chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse (LC-MS) pour analyser *in vitro* et *in vivo* les adduits OPNA-BuChE et suggérant qu'une même approche pourrait être applicable aux pesticides OPs et aux carbamates [29]. S'inspirant de ces premiers travaux, plusieurs études focalisées sur la BuChE et utilisant des approches similaires ont été publiées [9, 40]. Les principales limitations de ces études proviennent de la difficulté à purifier efficacement la BuChE du plasma et de l'étape de digestion longue et peu efficace, qui rendent l'analyse des adduits OPNA-BuChE peu sensibles. Elles seront discutées dans la section suivante.

3. Analyse de la butyrylcholinestérase

La butyrylcholinestérase est une protéine présente dans le sang, et plus particulièrement dans le plasma, la partie liquide du sang constituée de 90% d'eau et de 10% de solutés tels que les sels minéraux, les protéines, les nutriments ou encore les hormones.

Grâce à l'abondance et à l'hétérogénéité des protéines présentes dans le plasma, ce milieu est extrêmement riche en informations pour le diagnostic clinique, mais en pratique l'analyse des protéines demeure très complexe [1]. Plus de 300 protéines ont déjà été répertoriées en tant que protéines du plasma et sont présentes sur une très large gamme de concentrations. Comme présenté Figure 9 [41], 22 protéines représentent 99% de la masse totale de protéines dans le plasma. L'albumine représente à elle seule 55% des protéines plasmatiques avec une concentration de 40 mg.mL^{-1} . La butyrylcholinestérase étant présente à une concentration de $4 \times 10^{-3} \text{ mg.mL}^{-1}$ [40], son analyse doit faire appel à une étape de traitement de l'échantillon afin de l'isoler des protéines majoritaires.

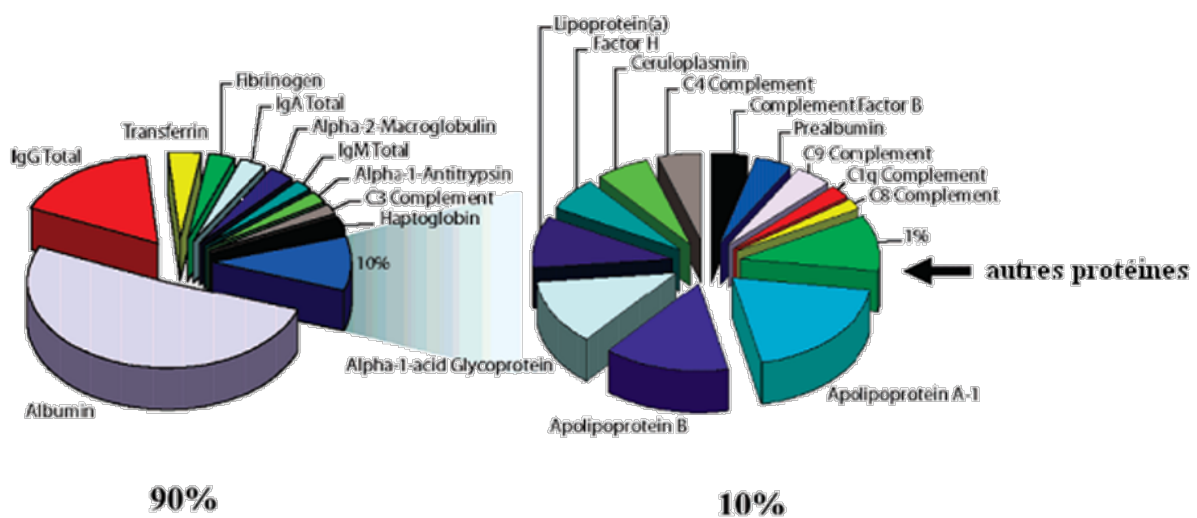


Figure 9. Représentation de la gamme dynamique de concentration de protéines dans le plasma humain. Issu de [41].

En effet, le traitement d'échantillon permet de concentrer et d'enrichir les analytes tout en réduisant la quantité de composés interférents [42]. Cette étape est le plus souvent réalisée par extraction sur phase solide (SPE) et est fondée sur un mécanisme de reconnaissance, plus ou moins spécifique selon les supports, entre la protéine et ceux-ci. Elle permet de séparer les molécules ou protéines sur la base de leur fonction biologique ou de leur propriété physico-chimique.

3.1. Extraction de la butyrylcholinestérase

Les méthodes d'analyse des adduits de BuChE humaine permettant de prouver l'exposition aux organophosphorés se sont longtemps inspirées de méthodes de purification de cette protéine à grande échelle pour l'obtention d'étalon, permettant de traiter jusqu'à 100 litres de plasma humain. Cette approche consiste, après une étape de dialyse ou de précipitation des protéines de plus haut poids moléculaire, en la purification du surnageant par chromatographie sur un gel de procainamide (dont la structure est présentée Figure 10) puis par chromatographie par échange d'ions ou électrophorèse sur gel [43–46]. Des quantités moindres de plasma (environ 1 mL) ont ensuite été traitées par des approches similaires sur des dispositifs de dimensions réduites pour isoler la BuChE-OPNA en vue d'une l'analyse LC-MS² des adduits après une étape de digestion de la protéine [7, 47–49]. Cependant, cette approche conduit à la digestion de trop nombreuses protéines co-extraites avec la BuChE faussant alors l'identification des adduits.

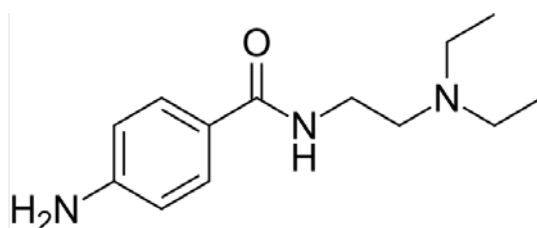


Figure 10. Structure chimique de la procainamide

Plus récemment, une méthode d'extraction basée sur l'affinité entre la BuChE et l'huprine, molécule inhibitrice des cholinestérases (Figure 11) a été développée par Brazzolotto *et al* [50]. L'huprine a été greffée sur de la sépharose activée NHS via un bras espaceur (acide 6-aminohexanoïque) et insérée dans une cartouche, ce qui a permis la purification de BuChE recombinante. D'après des études non publiées de Lockridge *et al.* [51], les supports à base d'huprine auraient une plus grande capacité et une plus forte affinité pour la BuChE que les gels de procainamide. Ils permettraient d'obtenir en une seule étape de purification de plasma humain, une BuChE pure entre 54% et 90%, contre 3% à 8% pure pour la BuChE purifiée par gel de procainamide. Cependant, une étape supplémentaire de purification par chromatographie d'exclusion est nécessaire pour éliminer les protéines contaminantes et les sels utilisés lors de l'étape d'élution.

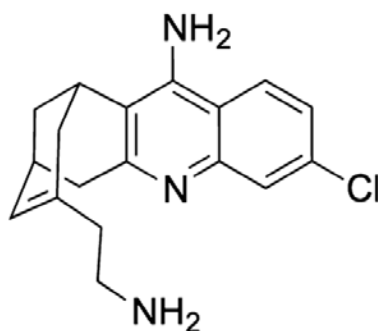


Figure 11. Structure chimique de l'huprine.

Des méthodes de piégeage de la BuChE mettant en œuvre l'utilisation d'anticorps anti-BuChE greffés de façon covalente sur un support magnétique ou de sépharose, ont été respectivement développées par Sporty *et al.* [10] et Schopfer *et al.* [52]. Ces méthodes, beaucoup plus sélectives et performantes que les méthodes d'extraction de la BuChE par supports d'huprine ou de sépharose, présentent cependant certains inconvénients, notamment en termes de réutilisation et de répétabilité. Ces méthodes seront abordées plus en détail dans le chapitre II.

3.2. Digestion de la butyrylcholinestérase

Comme déjà évoqué, la digestion de l'adduit OPNA-BuChE est une étape clé pour la détection, l'identification et la quantification du composé fixé à la BuChE. Lors d'une exposition à des composés organophosphorés, c'est sur la sérine 198 présente dans le site actif que se fixent les OPNA par liaison covalente [7]. Ainsi, le peptide contenant la sérine 198 va être recherché par spectrométrie de masse après digestion de la BuChE. La digestion peut être effectuée en solution par des protéases, de façon à fragmenter la protéine en peptides. Ces enzymes, comme toutes les protéines sont très sensibles à la température, au pH et à la force ionique ce qui implique d'adapter les conditions de digestion à l'enzyme utilisée. La digestion de la butyrylcholinestérase peut être effectuée par différentes enzymes telles que la trypsine [14], la chymotrypsine [53] ou la pepsine [54]. Ainsi, la séquence de site actif contenant la sérine 198 va être différente selon les sites de coupures de l'enzyme, comme présenté Figure 12 pour le clivage à la chymotrypsine et à la pepsine [42].

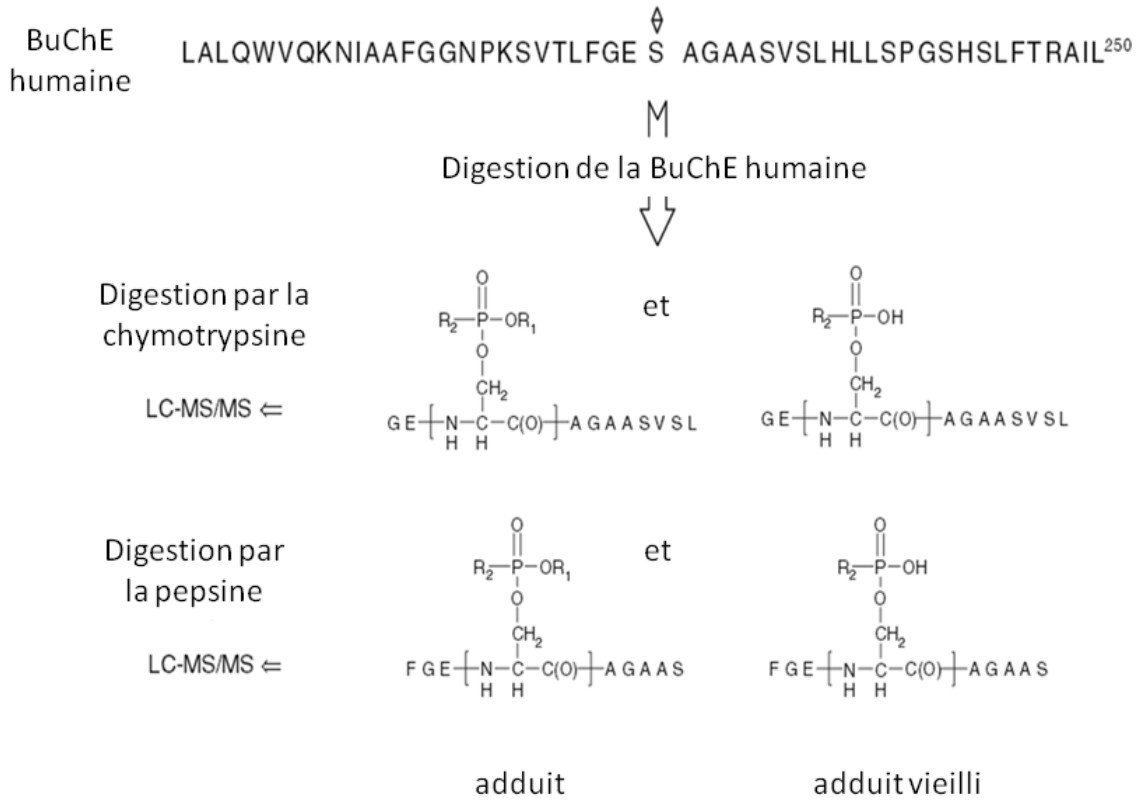


Figure 12. Peptides obtenus après clivage enzymatique de la BuChE par deux protéases, la chymotrypsine et la pepsine. Issu de [42].

En effet, le clivage de la BuChE humaine par la trypsine génère le peptide ¹⁹¹SVTLFGESAGAASVSLHLLSPGSHSLFTR²¹⁹ [14] tandis que la chymotrypsine et la pepsine génèrent respectivement un dodécapeptide et un nonapeptide. La trypsine, active à pH légèrement basique (pH 7-8) et en milieu salin, hydrolyse de manière très spécifique la protéine après les acides aminés lysine et arginine, du côté C terminal. La pepsine, active à milieu acide (pH 1-3) coupe préférentiellement au niveau des acides aminés aromatiques phénylalanine, tyrosine, tryptophane et leucine [1]. Bien qu'ayant des sites de coupures peu spécifiques, la comparaison des digestions en solution de la BuChE par chaque enzyme après traitement sur gel de procainamide a permis de mettre en évidence des taux de digestion par la pepsine supérieurs à ceux des autres enzymes [48]. Par ailleurs, la BuChE possède de nombreux ponts disulfures dans sa structure, ce qui a pour conséquence de rigidifier la protéine. En conséquence, un protocole de réduction-alkylation est parfois appliqué pour rompre les ponts disulfures et faciliter l'accès aux sites de coupures lors de la digestion en solution [48]. Différentes conditions de digestion en solution de la BuChE par la pepsine ont été reportées dans la littérature (Tableau 3). Les températures et durées de digestion sont

communes à toutes les expériences mais les ratios enzyme/substrat varient de 1/10 à 15/1. Des rapports E/S élevés (conditions A, B, D) conduisent à une digestion plus complète des protéines en fragmentant la quasi-totalité des sites de coupures théoriques attendus mais peuvent conduire à une autodigestion partielle de l'enzyme. Afin d'éviter ce phénomène, des ratios E/S compris entre 1/100 et 1/5 sont généralement appliqués (conditions C et E) [55]. Globalement, aucune de ces équipes ne fournit d'information sur les taux de digestion de la BuChE en solution, ni sur la répétabilité de cette étape. De plus, la digestion de la BuChE en solution reste longue et ne semble pas avoir été optimisée.

Table 3. Exemple de conditions de digestion de la BuChE en solution par la pepsine décrites dans la littérature

Conditions	A [15]	B [29]	C [29]	D [54]	E [56]
Quantité de BuChE	0,0264 nmol	0,211 nmol	0,211 nmol	0,27 nmol	58,8 nmol
Quantité de Pepsine	0,231 nmol	3,11 nmol	0,0311 nmol	2,88 nmol	6,93 nmol
Ratio Enzyme/Substrat	9/1	15/1	1/7	10/1	1/10
Température de digestion	37°C	37°C	37°C	37°C	37°C
Durée de la digestion	2h	2h	2h	2h	2h

L'étape de digestion peut être réalisée en percolant la BuChE purifiée sur un réacteur enzymatique appelé IMER (IMmobilized Enzyme Reactor), préalablement préparé par immobilisation covalente d'une protéase sur un support [57]. Cette méthode, très peu décrite pour la digestion de la BuChE, est un point fort pour la diminution des durées de digestion et pour la réutilisation de la protéase. La synthèse et l'utilisation de tels supports seront discutées en détail dans le chapitre II.

4. Analyse des adduits OPNA-BuChE par LC-MS²

La chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse (LC-MS) est devenue un outil important pour la biosurveillance d'adduits OPNA-BuChE [9, 48]. En effet, l'adduit formé par la fixation de l'OPNA sur la sérine 198 du site actif de la BuChE est très stable dans le sang, ce qui permet de détecter la présence d'OPNA jusqu'à plusieurs mois après l'exposition. Dans le cas d'une digestion à la pepsine, la BuChE adduite produit le peptide FGE¹⁹⁸OPNAAGAAS, comportant l'OPNA lié à la sérine 198. Ce peptide de neuf acides aminés, appelé nonapeptide, va ainsi permettre d'identifier et de quantifier les composés organophosphorés sous formes adduites grâce à l'utilisation de la chromatographie en phase liquide couplée à la spectrométrie de masse en tandem [48]. La séparation du nonapeptide intact ou adduit par les différents OPNA est réalisée en chromatographie de phase inverse, à l'aide d'une colonne apolaire de type C18. Celle-ci permet de séparer et d'éluer les peptides par ordre de polarité croissante avant leur détection par spectrométrie de masse.

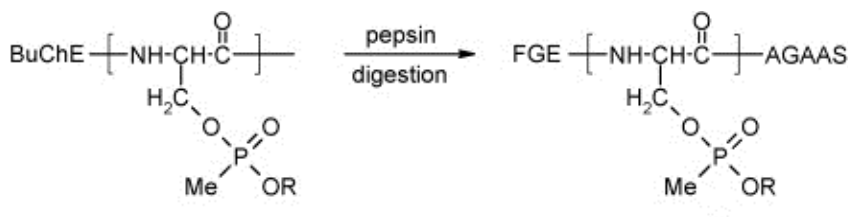


Figure 13. Digestion de l'adduit OPNA-BuChE par la pepsine menant à un nonapeptide contenant l'OPNA.

Le spectromètre de masse se compose de trois parties. La source d'ionisation permet de vaporiser et d'ioniser les molécules tandis que l'analyseur permet de séparer les ions en fonction de leur rapport masse sur charge (m/z) grâce à l'action d'un champ électrique et/ou magnétique. Finalement, le détecteur permet de transformer les ions ainsi formés en signal électrique. Plusieurs sources d'ionisation peuvent être utilisées, mais l'électronébulisation, également appelée ionisation par *electrospray* (ESI), est généralement préférée pour l'ionisation de grosses molécules telles que les peptides. En effet, ce type d'ionisation douce est peu énergétique, ce qui va permettre de transformer les ions présents à l'état liquide en ions en phase gazeuse sans risques de fragmentation. A l'issue du processus d'ionisation, les ions sont majoritairement présents sous forme monochargée, mais des espèces multichargées ou des adduits peuvent également être observés. Une fois les ions formés, ils sont transférés

vers l'analyseur. De nombreux analyseurs sont disponibles tels que le piège à ions, l'analyseur à temps de vol, l'analyseur à résonance cyclotronique ionique à transformée de Fourier ou encore le quadripôle. Il est possible d'associer plusieurs analyseurs en série pour fragmenter les ions dans l'analyseur, on parle alors de spectrométrie de masse en tandem (MS/MS ou MS²). L'association de trois quadripôles en séries permet de former un triple quadripôle détaillé Figure 14.

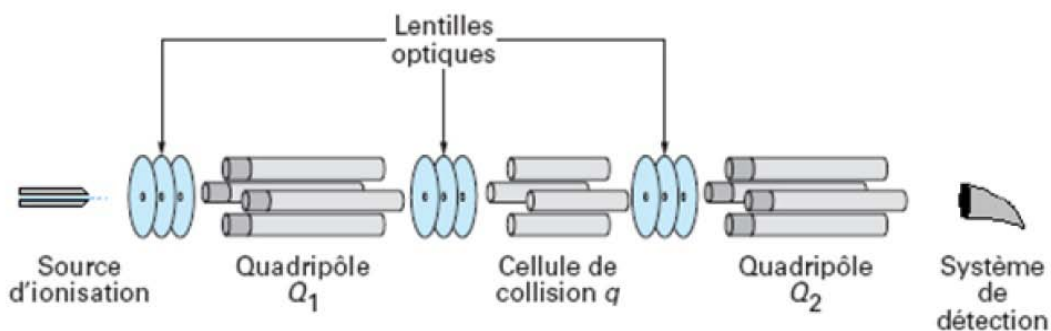


Figure 14. Schéma d'un spectromètre de masse triple quadripôle.

La spectrométrie de masse en tandem permet notamment de quantifier et de déterminer la séquence en acides aminés d'un peptide, grâce à l'analyse de ses ions fragments (ions fils). Les ions parents sont sélectionnés par un premier quadripôle (Q₁) en fonction de leurs rapports m/z, fragmentés dans une cellule de collision (q) par un gaz inerte puis les ions fils sont analysés dans un second quadripôle (Q₂) pour donner les spectres de collision de chaque ion parent. Plusieurs modes de détection peuvent être utilisés en mode MS/MS. Le mode Product Ion permet de détecter tous les ions fragments issus de l'ion parent tandis que le mode MRM (Multiple Reaction Monitoring) permet de détecter un ion fragment provenant d'un ion précurseur. Ce dernier mode apporte un gain en sélectivité et en sensibilité en diminuant le bruit de fond et peut être utilisé pour la quantification de molécules à l'état de trace dans des échantillons complexes. Typiquement, l'ion produit le plus intense est utilisé pour quantifier tandis que les second et troisième signaux les plus intenses sont utilisés en tant qu'ions qualitatifs pour confirmer l'identité de l'analyte. Les fragments principaux obtenus en spectrométrie de masse en tandem proviennent du clivage de la chaîne peptidique principale au niveau des liaisons C α -C, C-N ou N-C α . Ce clivage va donner six types de fragments désignés respectivement par a_n, b_n et c_n si la charge positive est portée par l'extrémité N-terminal et respectivement x_n, y_n, et z_n si la charge est portée par l'extrémité C-terminal. La nomenclature des fragmentations peptidiques est représentée Figure 15.

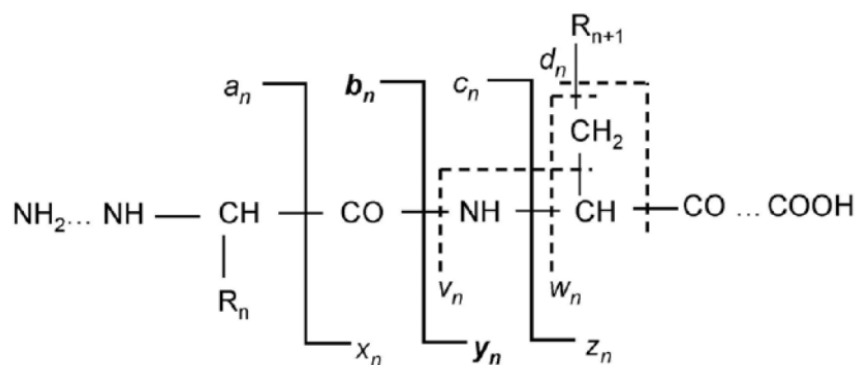


Figure 15. Nomenclature des fragments peptidiques. Issu de [1].

Les fragments d_n , w_n et z_n sont observés dans le cas de fragmentations à hautes énergies. La majorité des fragments obtenus sont de type y_n et b_n . Dans le cas de l'identification de l'adduit OPNA-FGESAGAAS, il a été montré qu'au contact du gaz de collision, le nonapeptide se rompt au niveau des liaisons amides et des chaînes latérales du squelette peptidique, ce qui produit les fragmentations présentées Figure 16.

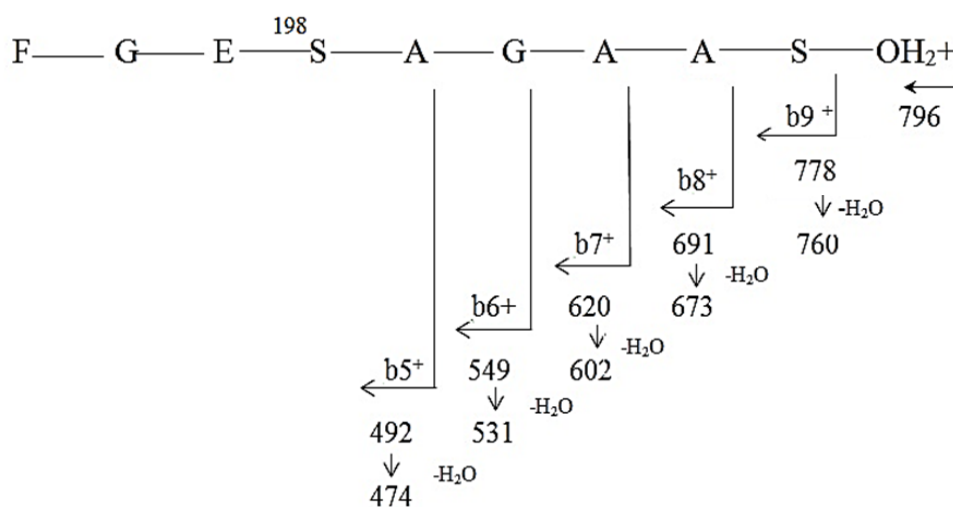
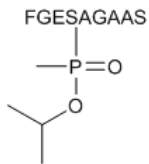
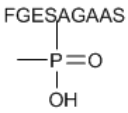
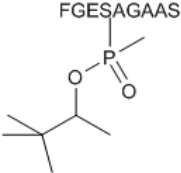
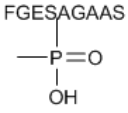
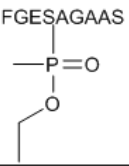
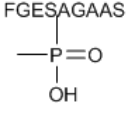
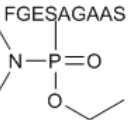
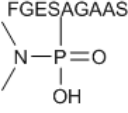


Figure 16. Schéma de fragmentation du nonapeptide FGESAGAAS au niveau des liaisons amides (sans OP). Le nombre en indice de b correspond au nombre d'acide aminés contenus dans le fragment.

L'identification de l'OP fixé à la BuChE est effectuée en se basant sur la variation de masse du nonapeptide. Quand le composé organophosphoré se fixe sur le nonapeptide de $m/z = 795.3$, la masse du nonapeptide est modifiée par celle du composé OP. La masse théorique de l'adduit OP-nonapeptide est ainsi recherchée par spectrométrie de masse puis le

pic correspondant est fragmenté en mode MRM, ce qui permet de détecter les transitions entre la masse théorique de l'adduit et les fragments caractéristiques après perte de l'OPNA (m/z 778, m/z 673, m/z 602...). Les masses correspondantes aux adduits formés entre le nonapeptide et quatre OPNA intacts et vieillis (sarin, soman, VX et tabun) sont répertoriées dans le Tableau 4.

Table 4. Structure et masses $[M+H]^+$ des 4 adduits organophosphorés les plus courants et de leur forme vieilli. Issu de [42].

OP lié au nonapeptide	Forme non vieilli	$[M+H]^+$ (m/z)	Forme vieilli	$[M+H]^+$ (m/z)
Sarin		916,4		874,3
Soman		958,3		874,3
VX		902,3		874,3
Tabun		931,3		903,3

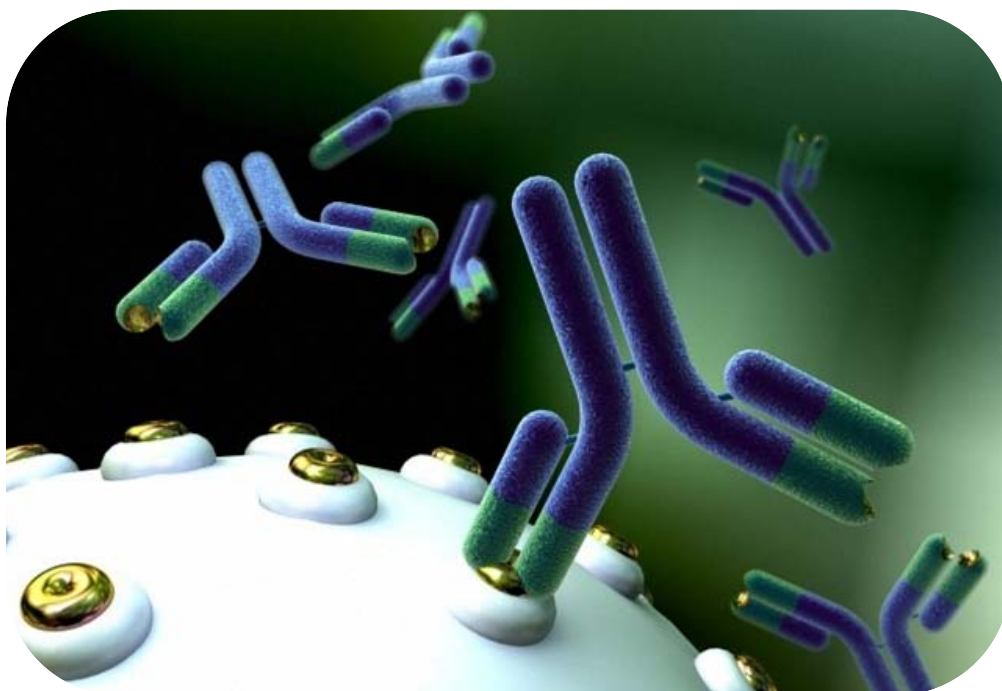
5. Conclusion

Les méthodes d'analyse des OPNA sous forme d'adduits OPNA-BuChE semblent être le meilleur choix pour détecter leur présence dans le sang. En effet, la forte affinité des OPNA pour la BuChE entraîne une grande stabilité des adduits, ce qui permet l'analyse rétrospective des OPNA durant plusieurs mois. Cependant les méthodes d'analyses actuelles sont longues (plusieurs heures), principalement à cause de la digestion en solution et des nombreuses étapes utilisées pour la purification de la BuChE du plasma par des supports à base de

procainamide. Ces supports sont peu sélectifs, ce qui entraîne la présence de protéines contaminantes après l'étape de purification. Un des points clé qui sera abordé dans le chapitre suivant, sera donc l'utilisation de supports d'affinité plus performants à base d'anticorps, permettant de piéger sélectivement la BuChE du plasma. De la même manière, sera abordée la préparation de supports d'enzymes immobilisées, qui permettent d'éviter tout phénomène d'autodigestion et de réduire le temps de digestion.

CHAPITRE II

APPORT DES SUPPORTS A BASE DE BIOMOLECULES IMMOBILISEES POUR L'ANALYSE DE PEPTIDES



Chapitre II - Apport des supports à base de biomolécules immobilisées pour l'analyse de peptides

1. Immunoextraction de molécules ciblées

L'extraction sur phase solide (SPE) utilisant des supports d'affinité est une procédure mettant en jeu l'affinité spécifique de ligands pour une molécule d'intérêt. Dans le cas de l'immunoextraction, les ligands immobilisés sur le support solide sont des anticorps.

1.1. Les anticorps

Egalement appelés immunoglobulines (Ig), les anticorps sont des protéines produites par l'organisme en réponse à des antigènes tels que des agents infectieux ou des substances étrangères. Ils sont produits par les lymphocytes B, et peuvent être différenciés en 5 classes : les IgA, IgD, IgE, IgG et IgM. Les premiers anticorps produits suite à la présence d'un agent étranger sont les IgM, tandis que les IgG sont produits après plusieurs expositions. Les IgG représentent 70 à 75 % des anticorps présents dans le sang. Ce sont les anticorps les plus utilisés à des fins analytiques, notamment pour le développement des immunoabsorbants via leur immobilisation sur un support solide. Schématiquement représentés par un Y, ils possèdent une masse moléculaire d'environ 150 kDa et sont constitués de deux chaînes lourdes (C_H , 50 kDa) reliées entre elles par des ponts disulfures ainsi que deux chaînes légères (C_L , 25 kDa) reliées aux chaînes lourdes par des ponts disulfures (Figure 17)[58].

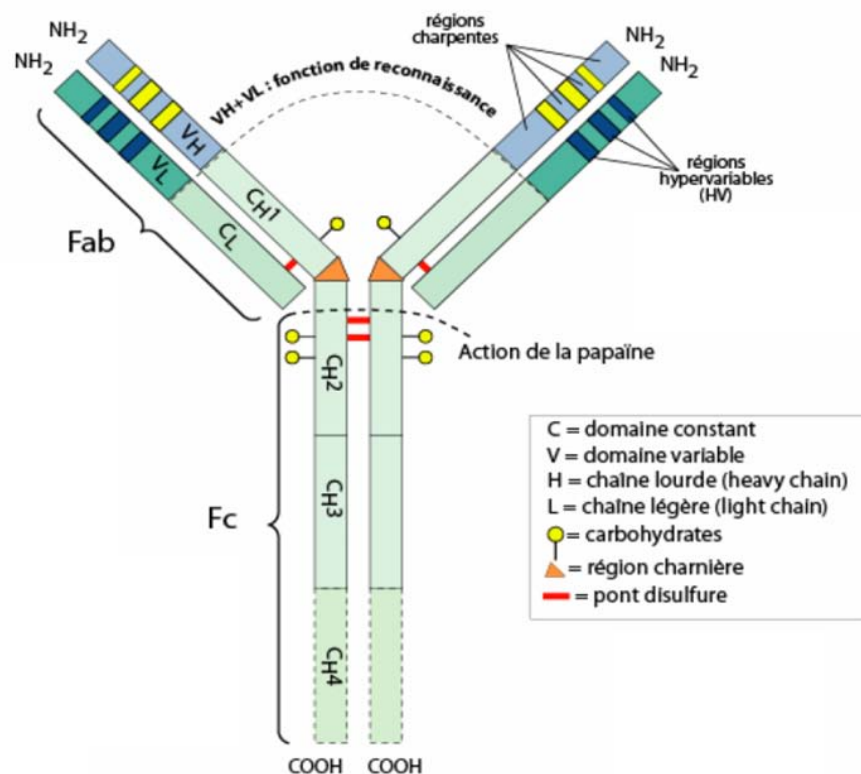


Figure 17 : Représentation schématique d'une molécule d'IgG. Issu de [58].

Les chaînes lourdes et légères possèdent une partie constante à leurs extrémités carboxy-terminales et une partie variable (V_L et V_H) en position amino-terminale. Une partie de la région constante des chaînes lourdes forme la région Fc à laquelle se fixent d'autres protéines (récepteurs) en présence d'antigènes pour induire la réponse immunitaire. La partie variable de l'anticorps, nommée Fab, correspond à des petites régions hypervariables qui constituent les sites de fixation de l'antigène, appelée épitope. L'interaction antigène-anticorps se fait par des liaisons non covalentes de type liaisons hydrogène, forces de Van der Waals, interactions électrostatiques et hydrophobes. Pour que les forces d'interactions soient efficaces, la structure du site de reconnaissance de l'anticorps doit être adaptée à celle de l'antigène. Aussi, toute modification de la structure tridimensionnelle des molécules impliquées entraîne une baisse globale de l'énergie d'interaction.

Il existe deux grandes catégories d'anticorps, les anticorps monoclonaux et polyclonaux, dont le mode de production est présenté Figure 18 [59]. Les anticorps polyclonaux sont les anticorps produits lors d'une réponse immunitaire classique. Ils peuvent être produits volontairement, suite à la réaction immunitaire d'un antigène injecté dans un animal utilisé pour les expérimentations (souris, lapin, chèvre, etc.). Un mois après l'injection,

des échantillons de sang sont collectés et testés pour détecter la présence d'anticorps spécifiques de la molécule cible. L'antigène est injecté dans l'animal à plusieurs reprises durant plusieurs semaines, jusqu'à l'obtention de la concentration d'anticorps souhaitée [60]. Les anticorps polyclonaux étant produits par des clones cellulaires différents, ils peuvent se lier à différents épitopes de l'antigène, avec des forces d'interaction différentes [61]. Il est ainsi estimé que seuls 5 à 10% des anticorps polyclonaux sont spécifiques de la molécule cible [62].

Les anticorps monoclonaux sont obtenus par une lignée de cellules hybrides appelées hybridomes, résultant de la fusion entre des lymphocytes et une cellule tumorale myélomateuse [63]. Bien que laborieux à produire, les hybridomes sont relativement faciles à entretenir pour la production d'anticorps et permettent l'obtention d'anticorps ayant tous la même spécificité pour l'analyte cible [64]. En dépit d'un coût de production plus élevé, l'utilisation d'anticorps monoclonaux est préférée à celle des anticorps polyclonaux puisque ces premiers présentent une très faible variabilité, ce qui permet une production uniforme et répétable des supports d'immunoaffinité.

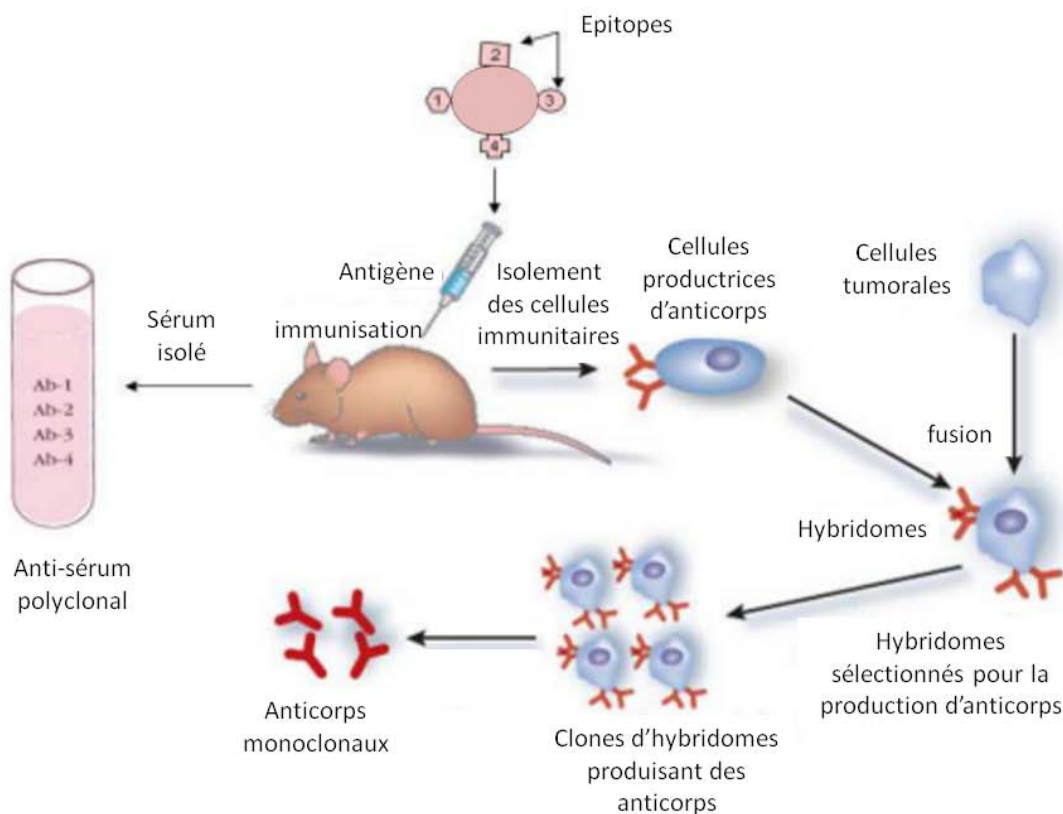


Figure 18. Vue d'ensemble de la production d'anticorps [59].

1.2. Procédure d'immunoextraction

Une fois les anticorps produits, ils peuvent être immobilisés pour conduire à un support d'immunoextraction, appelé immunoadsorbant (IS). Généralement, les immunoadsorbants sont préparés dans des cartouches en immobilisant les anticorps sur des particules maintenues entre deux frittés, de manière à effectuer la procédure d'immunoextraction décrite Figure 19. L'immunoextraction repose sur le partage des solutés entre une phase stationnaire, l'immunoadsorbant, et une phase aqueuse, l'échantillon. Comme pour tout procédé d'extraction sur phase solide, le succès de l'extraction repose sur l'affinité et la spécificité de l'anticorps pour la protéine cible induite par la complémentarité spatiale et fonctionnelle du site de reconnaissance de l'anticorps vis-à-vis de l'antigène. Ainsi, l'utilisation d'anticorps doit permettre d'isoler de manière très sélective la protéine d'intérêt des protéines interférentes majoritaires et donc de limiter les effets de matrice lors de l'ionisation dans la source du spectromètre de masse. L'immunoextraction se déroule en quatre étapes : le conditionnement, la percolation, le lavage et l'élution [65].

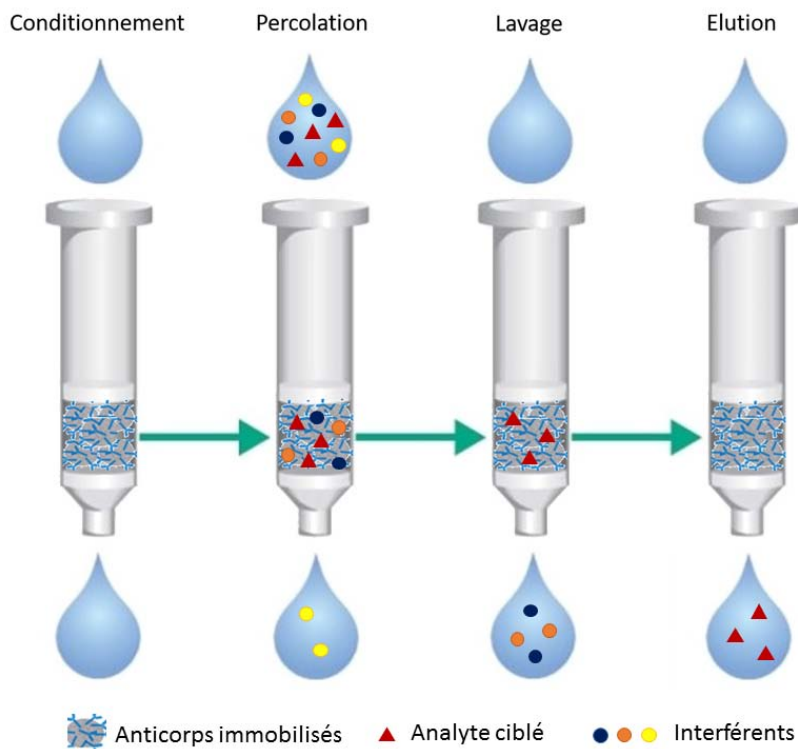


Figure 19. Procédure d'immunoextraction sur cartouche.

Lors de la percolation de l'échantillon biologique tel que le plasma ou l'urine, les molécules d'intérêt sont retenues sur les anticorps grâce à leur forte spécificité. Cette percolation doit être réalisée dans des milieux tamponnés ou de l'eau pure favorisant l'interaction antigène-anticorps et la stabilité des anticorps. Les composés interférents non retenus ou faiblement retenus sur le support ou les anticorps sont éliminés par une étape de lavage. Celle-ci est le plus souvent effectuée par une solution saline afin de réduire l'intensité des liaisons non spécifiques tout en évitant l'élution de l'analyte. Pour éliminer les composés très hydrophobes interagissant de façon non spécifique avec le support ou les anticorps, l'utilisation de détergent ou de modificateur organique est souvent appliquée [66–69]. La dernière étape consiste à désorber les composés cibles par un faible volume d'éluant. L'éluant permet de rompre l'interaction antigène-anticorps et de libérer la protéine de l'immunoabsorbant. Elle nécessite une modification drastique des conditions telles qu'une diminution de pH ou une modification de force ionique par l'ajout d'agent chaotropes à des concentrations comprises entre 1,5 et 8 mol.L⁻¹ [65]. Les ions chaotropes tels que les ions iodures, chlorures, perchlorate ou thiocyanate induisent une dénaturation partielle des protéines conduisant à une rupture de la liaison antigène-anticorps. Les solutions acides utilisées sont généralement de l'acide chlorhydrique, formique ou acétique, dont le pH est compris entre 2 et 3. Du chlorure de sodium peut également être ajouté pour augmenter la force ionique de la solution et diminuer la force de l'interaction entre l'anticorps et l'antigène. Le solvant d'élution ne doit cependant pas induire de dénaturation irréversible de l'anticorps ou perturber la liaison de l'anticorps à son support, de manière à pouvoir réutiliser le support. Idéalement, les immunoabsorbants ne devraient pas être réutilisés afin d'éliminer tout risque de contamination, cependant un lavage adapté des ISs permet leur réutilisation. Cela implique aussi, après chaque immunoextraction, une étape de régénération du support avant le stockage des immunoabsorbants dans un tampon salin (PBS : Phosphate Buffer Saline) contenant un faible pourcentage d'agent antimicrobien (azoture de sodium) [70].

1.3. Préparation de l'immunoabsorbant

Les immunoabsorbants, présents sous différents formats (cartouches, précolonnes, capillaires) peuvent être préparés en immobilisant les anticorps sur différents types de supports.

- *Supports d'immobilisation*

Le choix du support d'immobilisation repose sur plusieurs critères. Il doit être chimiquement inerte, mécaniquement stable et être hydrophile pour ne pas développer d'interactions non spécifiques en milieu aqueux. Il doit également être facilement fonctionnalisable par des groupements permettant l'immobilisation des anticorps [65].

Les supports poreux (également appelés résine ou gel) présentent des tailles de particules comprises entre 50 et 150 μm et sont parmi les plus utilisés pour le greffage d'anticorps [4, 52, 59, 60, 71, 72]. Parmi eux, les polysaccharides naturels tels que les gels d'agarose renferment de nombreuses fonctions hydroxyles propices à l'immobilisation d'anticorps mais ne sont stables qu'entre pH 4 et 9. La sépharose, qui est un gel d'agarose hautement ramifié, permet de travailler sur une plus large gamme de pH allant de 2 à 14. Elle présente une bonne stabilité chimique, ainsi qu'une surface hydrophile, qui limite les interactions non spécifiques. Les supports à bases de sépharose n'étant stables mécaniquement qu'à de faibles pressions, le couplage de l'IS avec la chromatographie liquide doit être réalisé en intégrant une précolonne de piégeage en amont de la colonne analytique [65].

La silice est également utilisée [69, 73, 74]. C'est un support très résistant à la pression, disponible dans une grande variété de groupements fonctionnels, de tailles de pores et de particules. L'inconvénient majeur de la silice est sa gamme d'utilisation, restreinte en termes de pH (2-8). Des études menées au LSABM sur l'utilisation de deux types de supports à base de silice activée glutaraldéhyde et de sépharose activée CNBr ont montré la présence d'interactions non spécifiques sur la silice pour des composés chargés négativement, non observées sur les supports de sépharose [1]. Par ailleurs, l'utilisation de solutions de faible pH pour l'étape d'éluion des protéines de l'immunoabsorbant implique que le support doive être compatible avec des conditions acides. Or la silice est peu stable à pH acide, contrairement à la sépharose. Ainsi, les supports de sépharose semblent être plus appropriés pour l'immobilisation des anticorps.

En alternative aux supports à base de particules décrits précédemment, des supports monolithiques ont été utilisés pour le greffage de biomolécules [75–78]. Les monolithes sont des matériaux poreux, présentant une structure continue, sous la forme d'un seul bloc. Leur grande porosité leur confère une perméabilité élevée, ainsi qu'une faible perte de charge. Il existe deux grandes catégories de monolithes : les monolithes inorganiques tels que les

monolithes à base de silice ou les monolithes organiques, à base de polyacrylamide, de polyméthacrylate ou de poly(styrène-divinyl-benzène). Dans la littérature, la majorité des applications recensent l'utilisation de monolithes organiques à base de méthacrylate au format disque [79–81] ou précolonne [82–84], les monolithes de silice étant moins fréquemment utilisés du fait de leur faible stabilité à pH acide [85]. Ces derniers génèrent cependant moins d'interactions non spécifiques.

Les particules magnétiques ont également été largement utilisées et présentent des propriétés très différentes des résines poreuses [10, 17, 18, 86–89]. Elles sont non poreuses, et de diamètre beaucoup plus faible, compris entre 100 nm et 4 µm. Les particules magnétiques sont produites sous la forme de particules d'oxyde de fer superparamagnétique qui sont revêtues de manière covalente avec des dérivés de silane. Le revêtement rend les billes inertes et fournit les différents groupements chimiques permettant le greffage des ligands d'intérêt. Leur petite taille permet de maintenir une surface spécifique suffisante pour l'immobilisation du ligand malgré l'absence de pores. Typiquement, quelques microlitres de billes immunomagnétiques sont mélangés avec plusieurs centaines de microlitres d'échantillon puis les billes liées à la molécule cible sont isolées du mélange à l'aide d'un aimant pour être analysées. Bien qu'ayant l'avantage de présenter peu d'interactions non-spécifiques, la purification par billes immunomagnétiques est effectuée en solution, ce qui empêche tout couplage direct de l'étape de purification à l'analyse chromatographique.

- *Méthodes d'immobilisation*

Les anticorps peuvent être fixés aux supports décrits précédemment par plusieurs méthodes d'immobilisation telles que le greffage covalent, l'adsorption ou encore l'encapsulation par voie sol-gel.

L'immobilisation covalente des anticorps est l'approche la plus couramment utilisée. Elle se fait par liaison covalente des groupements amine ou carboxylique des anticorps sur des supports activés de silice [90], d'agarose [91–93] mais aussi de polymère synthétique [94, 95] ou de billes magnétiques [96]. Les anticorps sont greffés via leurs groupements amines libres en utilisant des supports activés par des agents d'activation tels que le bromure de cyanogène (CNBr) [91, 93], le N,N-carbonyldiimidazole [90], le N-hydroxysuccinimide (NHS) [97] ou encore des supports fonctionnalisés aldéhyde [95] ou époxyde (Figure 20). L'inconvénient majeur de ce type d'immobilisation est l'orientation aléatoire des anticorps

causée par la présence de plusieurs fonctions amine libres à la surface des anticorps (arginine et lysine), entraînant des difficultés d'accessibilité aux sites de reconnaissance antigéniques. Le greffage par liaison covalente étant très stable, aucun relargage d'anticorps n'est observé au cours du temps, ce qui rend ce type de greffage le plus rentable à long terme.

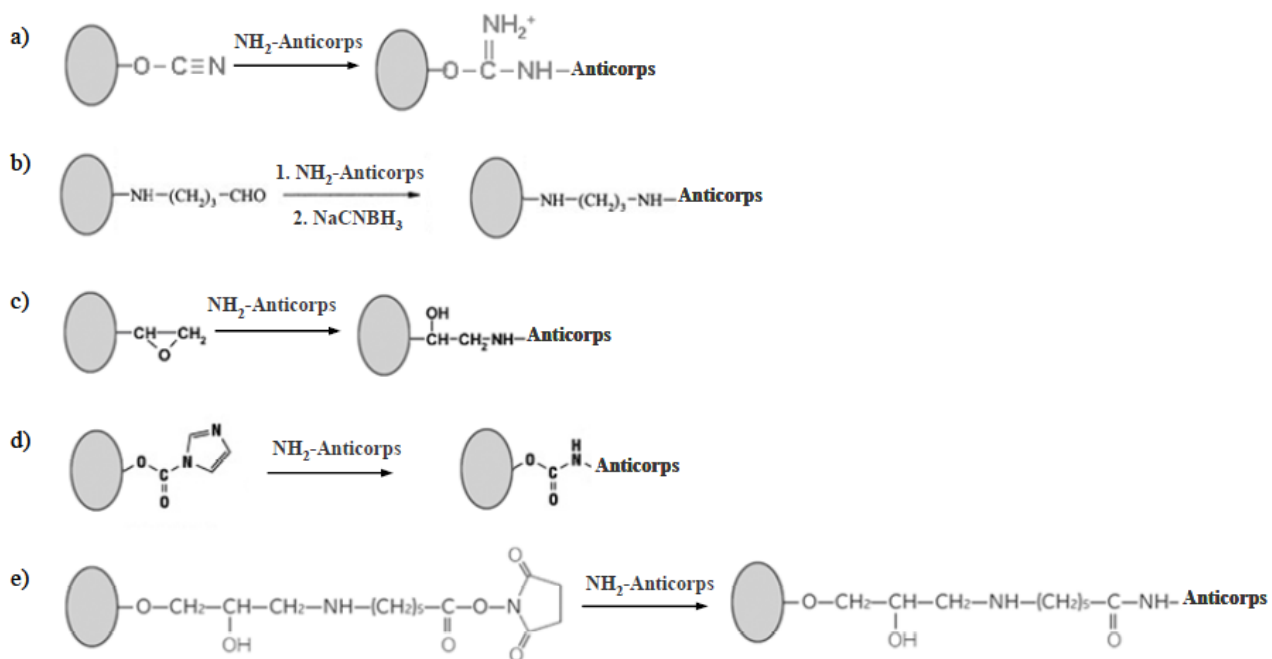


Figure 20. Représentation des réactions de greffage covalent entre un anticorps et un support activé par du CNBr (a), un aldéhyde (b), un époxyde (c), du carbonyldiimidazole (d) et du NHS (e). Issu de [1].

Une autre approche utilise l'immobilisation par adsorption. Celle-ci peut être spécifique ou non spécifique. L'approche non spécifique consiste en l'adsorption du ligand d'affinité sur le support de greffage par force d'interactions faibles (interactions coulombienne, liaison hydrogène ou interactions hydrophobes). L'approche spécifique consiste à immobiliser les anticorps sur le support via un ligand primaire tel que la protéine A [98] ou la protéine G [97, 99], préalablement immobilisé sur le support de greffage. La protéine A est préférée pour le greffage d'IgG d'animaux (chat, chien lapin et cochon) tandis que la protéine G est préférée pour le greffage d'anticorps humain ou de souris. Les anticorps peuvent également être liés à un ligand secondaire tel que la biotine (également connu sous le nom de vitamine H ou B₇) avant d'être fixé à de l'avidine ou de la streptavidine présente sur le support [72]. L'approche spécifique est une approche orientée qui laisse les sites de

reconnaissance antigéniques très accessibles. Cependant, comme l'étape d'éluion de l'antigène se déroule à faible pH (1-3) la liaison entre l'anticorps et ligand primaire peut être rompue. Il est alors nécessaire de greffer une grande quantité initiale d'anticorps pour conserver le plus longtemps possible une capacité élevée malgré la perte progressive des anticorps. Il est également important de noter le manque de fiabilité de l'immunoextraction dans ce cas, puisque si la quantité d'anticorps chute, le rendement d'extraction chute également. Ainsi les extractions seront non reproductibles.

Il est autrement possible de piéger les anticorps par encapsulation dans une matrice à base de silice préparée par un procédé sol-gel [100]. Avec ce procédé, l'anticorps est incorporé directement dans le mélange de polymérisation. Lors de la polymérisation, le support croit autour de l'anticorps et l'encapsule. Ce procédé sol-gel est particulièrement attractif car le support est formé dans un solvant majoritairement aqueux, qui permet donc au piégeage d'être réalisé dans un solvant compatible avec l'anticorps, ce qui n'entraîne pas de dénaturation significative. De plus, ce procédé permet une immobilisation en une seule étape, simple, rapide à mettre en œuvre. Cependant, l'encapsulation présente certains désavantages. Elle nécessite une bonne maîtrise de la dimension des pores du matériau synthétisé de manière à ce que ces derniers soient à la fois assez grands pour minimiser la perte de charge du support mais aussi assez petits pour réduire le relargage d'anticorps au cours de l'utilisation de l'immunoabsorbant. En outre les anticorps étant de poids moléculaire élevé, dans le cas où l'analyte cible se trouve être une protéine, ce type d'immobilisation ne peut que difficilement être envisagé puisque la diffusion de la protéine cible à travers des pores du matériau sera difficile voire impossible [85].

1.4. Apport de l'immunoaffinité pour l'extraction de la BuChE du plasma

En alternative aux supports de procainamide préalablement cités, un support d'immunoextraction a été développé par Sporty *et al.* [10] en 2010 et reprise par de nombreuses équipes [14, 18, 87, 101–108]. Cette méthode est basée sur l'immobilisation non covalente d'anticorps anti-BuChE sur des billes magnétiques activées par de la protéine G ou de la streptavidine [14]. Ces billes sont mises en contact avec le plasma et permettent ainsi le piégeage de la BuChE. Après ces étapes de préparation du support et d'incubation, (généralement 4 h), les billes sont isolées puis mises en contact avec une solution de protéase pendant un temps variant de 30 à 180 minutes (Tableau 5). Cela permet de générer les adduits

peptidiques associés aux OPNA, qui sont ensuite analysés par LC-MS². Cette purification de la BuChE par billes immunomagnétiques est plus spécifique que les approches précédentes et requiert de faibles quantités de plasma. Cependant, hormis les travaux réalisés par Marsillach [101] et Aryal *et al.* [14] qui procèdent à une étape intermédiaire d'éluion de la BuChE des supports d'immunoaffinité (Figure 21), la majorité des protocoles implique d'utiliser pour chaque échantillon un nouveau lot d'anticorps puisqu'ils sont digérés par la protéase [10, 18, 102–104]. De ce fait, l'étape de digestion conduit à des peptides issus de la BuChE, des anticorps, de la protéine G, de la protéase par autodigestion et donc à de nombreux peptides qui pouvant affecter la réponse en spectrométrie de masse des adduits peptidiques ciblés.

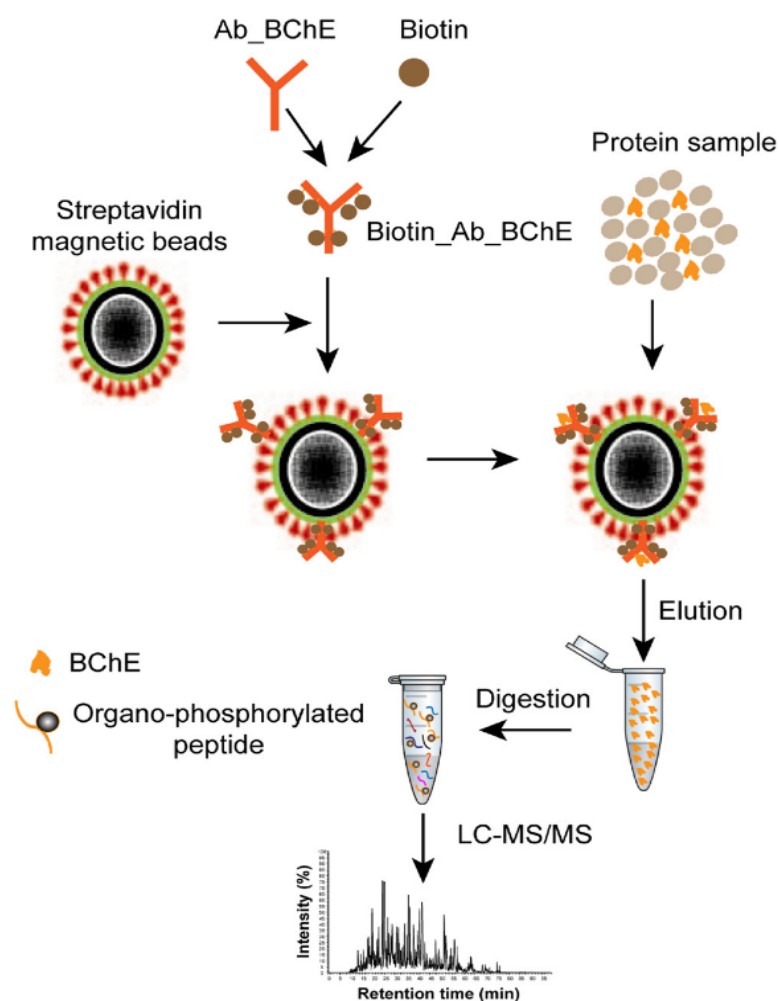


Figure 21 : Illustration schématique de la procédure d'extraction et de digestion de la BuChE avant l'analyse par LC-MS². La BuChE est extraite par un complexe anticorps-biotine fixé à des billes magnétiques de streptavidine et digérée avec de la trypsine. Adapté de [14].

La récupération des protéines avant la digestion semble être le choix le plus judicieux pour réduire la présence de peptides non désirés. Néanmoins, l'ensemble des protocoles comporte une étape de digestion effectuée en solution qui génère malgré tout des peptides issus de l'autodigestion de l'enzyme. De plus, aucune information n'a été donnée concernant la répétabilité de l'immunoextraction, le nombre de réutilisations possibles ou les conditions de fixation et de récupération optimales de la BuChE sur les billes immunomagnétiques. Globalement, le protocole d'immunoextraction ne semble pas avoir été optimisé. Très peu d'équipes fournissent une information sur les taux de fixation [87, 101, 104] et hormis un test SDS-PAGE pour estimer visuellement la purification de la BuChE après immunoextraction [14, 101], aucune valeur n'apparaît dans les publications concernant les taux de récupération de la BuChE après élution du complexe immunomagnétique. Une réutilisation du support immunomagnétique après élution de la protéine a été évoquée sans fournir plus de détail [102]. L'immobilisation des anticorps sur les billes magnétiques étant non covalente, la faible stabilité des anticorps sur le support peut rendre difficile l'obtention d'extractions reproductibles, la dissociation du complexe BuChE-anticorps risquant de fragiliser la liaison bille-anticorps. Par ailleurs, l'étape de récupération et de digestion en solution empêche toute automatisation de l'extraction [102].

Tableau 5 : Liste des conditions d'immunoextraction sur billes magnétiques, de digestion et d'analyse de la BuChE de plasma ou sérum humain.

Echantillon	Anticorps	Support des anticorps	Conditions d'extraction	Taux de fixation (TF) et de récupération (TR) de la BuChE	Digestion	Durée et température de digestion	Analyse : Séparation et détection	Quantification du nonapeptide intact ou adduit	réf
50-500 µL de sérum (non dopé et dopé GB, GF, VX et RVX)	Monoclonal (clone 3E8)	Billes magnétiques, Protéine G (Dynabeads)	100 µL de billes magnétiques (=20 µg Ac) Incubation : 2 h avec rotation*	N.C	Pepsine, (75 µL 2 mg.mL ⁻¹ + 0,6% AF) du complexe OPNA-BuChE-Ac-billes magnétiques	90 min 37°C	Injection : 5µL -Colonne : Aquasil C18 (50 x 1 mm, 3 µm) + précolonne (Aquasil C18 10 x 1 mm) -ρ _m : gradient Eau/ACN (0,1% A.F.), 2,4 min -API 4000 Q Trap, ESI+, (MRM)	-Quantification par droites d'étalonnage (0,8-630 ng.mL ⁻¹) de nonapeptides de synthèse adduits et non adduits → estimation du % de BuChE inhibée	[10] 2010
200 µL de plasma	Monoclonal (3E8)	Billes * magnétiques (Dynabeads)	N.C.	-TF: par mesure de l'activité enzymatique la BuChE dans le plasma (85%) - TR: qualitatif / SDS-PAGE	Chymotrypsine (1µg) après récupération de l'adduit OPNA-BuChE par de l'acide acétique (0,4 mol.L ⁻¹)	120 min 37°C	- Injection : N.C -Colonne : remplie C12 (Jupiter 4µm, Proteo 90A, 30 cm x 75 µm) -ρ _m : Eau/ACN (0,1% A.F) gradient 60 min* -Système nanoAcquity/LTQ-FT	Non	[101] 2011
500 µL de plasma	Polyclonaux de chèvre (N15) biotinylé	Billes magnétiques, streptavidine	50 µL de billes immuno-magnétiques (=10 µg Ac) Incubation : 15 h à 4°C, à faible agitation* + 1h à Tambiante	-TF: N.C -TR: qualitatif / SDS-PAGE	Trypsine après récupération de l'adduit OPNA-BuChE du complexe magnétique (en 2 min par 2 x 40 µL d'ACN (70%) + 0,5% acide acétique	180 min 37°C	Injection : 5µL -Colonne : capillaire (50 µm d.i) remplie avec silice C18 (Jupiter 3 µm) -ρ _m : 300 nL.min ⁻¹ , Eau/ACN (0,1% A.F.), gradient, 150 min -LTQ orbitrap+ Western Blot	Simple rapport des intensités du nonapeptide après traitement aux OPNA /peptide de BuChE avant traitement →niveau de phosphorylation	[14] 2012
500 µL de plasma pour extraire la BuChE puis extraits de sol, d'hamburger et d'eau (VX)	Monoclonal (clone 3E8)	Billes magnétiques Protéine G (Dynabead)	50 µL de billes immuno-magnétiques (=20 µg Ac) Incubation : 2 h à 1400 rpm	N.C	Pepsine du complexe OPNA-BuChE-Ac-billes magnétiques (après fixation de la BuChE de plasma non intoxiqué puis ajout d'extraits contenant du VX)	90 min 37°C	-Injection : 10 µL -Colonne : Aquasil C-18 (50 x 1 mm, 5 µm), 25°C -ρ _m : 75 µL.min ⁻¹ , Eau/ACN (0,1% A.F.), gradient, 2,4 min - Q Trap quadripole linear ion trap, API	- Quantification par droites d'étalonnage de nonapeptides de synthèse adduits VX et non adduits (0,025-4,0 ng/mL)	[103] 2012

Echantillon	Anticorps	Support des anticorps	Conditions d'extraction	Taux de fixation (TF) et de récupération (TR) de la BuChE	Digestion	Durée et température de digestion	Analyse : Séparation et détection	Quantification du nonapeptide intact ou adduit	réf
125 µL de sérum	Monoclonal clone 3E8	Billes magnétiques Protéine G (Dynabead)	50 µL de billes immuno-magnétiques (=20 µg Ac) Incubation : 2 h à 1400 rpm	N.C	Pepsine du complexe OP-BuChE-anticorps-billes magnétiques	30 min 37°C	-Injection : 3 µL -Colonne : Acquity BEH C18, (50 x 2.1 mm, 1.7 µm) -ρ _m : Eau/ACN (0,1% A.F.), gradient, 1,3 min -Triple quadripole, ESI+, SRM	- Quantification par droites d'étalonnage de nonapeptides de synthèse adduits et non adduits → ratio (nonapeptide adduit)/(nonapeptide intact+adduit) → estimation du % de BuChE inhibée	[18] 2013
75µL de plasma, sérum ou sang (VX, GB)	Monoclonal clone 3E8	Billes magnétiques Protéine G (Dynabead)	50 µL de billes immuno-magnétiques (=20 µg Ac) Incubation : 2 h à 1400 rpm	-TF : mesure activité enzymatique la BuChE dans le plasma : 88% (1 extraction), 100% (3 extractions) -TR: N.C	Pepsine (10 µL à 2 mg.mL ⁻¹ + 0,6% AF) du complexe OP-BuChE-anticorps-billes magnétiques	30 min 37°C	-Injection : 10µL -Colonne Aquasil C-18 (1 mm x 50 mm, 3 µm) -ρ _m : Eau/ACN (0,1% A.F.), gradient 2,4 min -Triple quadripole ESI+, MRM	- Quantification par droites d'étalonnage de nonapeptide adduits (GB et VX) et non adduits (1-250 ng/mL)	[104] 2014
500µL de plasma	Monoclonal clone 3E8, 11D8, B2 18-5, B2 12-1, mAb2	Billes magnétiques greffées Protéine G (Dynabead)	100 µL de billes immuno-magnétiques (=20 µg Ac) Incubation : une nuit à Tambiante	-TF : mesure d'activité de la BuChE dans plasma 3E8 : 70 ± 14% 11D8 : 10 ± 6% B2 18-5 : 97 ± 1% B2 12-1 : 96 ± 2% mAb2 : 72 ± 16% -TR: N.C	Non	-	-	-	[87] 2015
125 µL de plasma ou sérum	Monoclonal anti-BuChE clone 3E8	Protéine G sur billes magnétiques (Dynabeads)	50 µL de billes immuno-magnétiques (=10 µg Ac) Incubation : 45 min à 1400 rpm	N.C	Pepsine (10 µL à 2 mg.mL ⁻¹ + 0,6% AF) du complexe OP-BuChE-anticorps-billes magnétiques	30 min 37°C	-Injection : 10 µL -Colonne : Restek Pinnacle DB Biphenyl (50 x 2,1 mm, 1,7 µm), 60°C -ρ _m : 300µL.min ⁻¹ , eau/ACN (0,1% A.F.), gradient, 2,4 min - Triple quadripole ESI+, MRM	- Quantification par droites d'étalonnage (2-250 ng/mL) du nonapeptide non adduit et du nonapeptide avec adduits vieillis (P-BuChE, MeP-BuChE, ExP-BuChE, EtP-BuChE, PrP-BuChE)	[107] 2016

Echantillon	Anticorps	Support des anticorps	Conditions d'extraction	Taux de fixation (TF) et de récupération (TR) de la BuChE	Digestion	Durée et température de digestion	Analyse : Séparation et détection	Quantification du nonapeptide intact ou adduit	réf
125 µL de plasma ou sérum	Monoclonal anti-BuChE clone 3E8	Protéine G sur billes magnétiques (Dynabeads)	50 µL de billes immuno-magnétiques (=20 µg Ac) Incubation : 45 min à 1400 rpm	N.C	Pepsine (10 µL à 2 mg.mL ⁻¹ + 0,6% AF) du complexe OP-BuChE-anticorps-billes magnétiques	30 min 37°C	-Injection : 10 µL -Colonne : Restek Pinnacle DB Biphenyl (50 x 2,1 mm, 1,7 µm, 100Å), 60°C -ρ _m : 100 µL.min ⁻¹ , eau/ACN (0,6% A.F.), gradient, 55 min, - QExactive, (Hybride Quadrupole-Orbitrap), ddMS2/SIM	- Quantification par droites d'étalonnage (2-125 ng/mL) du nonapeptide non adduit et adduit par les OPNA (VX, VR, GB, GE, GF, GD) et OPNA vieillis (P-BuChE, MeP-BuChE, ExP-BuChE, EtP-BuChE, PrP-BuChE)	[108] 2017

* : non spécifié, Ac : anticorps, A.F : acide formique, E.I : étalon interne, EtP : phosphonate d'éthyle, ExP: phosphoryle d'éthyle, GB : Sarin, GD : soman, GE : ethyl sarin, GF : cyclohexyl sarin, IMS : séparation immunomagnétique, MeP: phosphonate de méthyle, N.C : Non communiqué, P-BuChE : BuChE phosphorylée, ρ_m: phase mobile, PrP : phosphonate de propyle, VR : VX russe

Aussi, Schopfer *et al.* [52] ont immobilisé de façon covalente des anticorps monoclonaux anti-BuChE (mAb2 [52] ou B2 18-5 [109]) sur des billes de sépharose activée CNBr. Après mise en contact de 500 μL de plasma avec 40 μL de billes immunomagnétiques pendant une nuit, la BuChE est désorbée des billes par de l'acide acétique (50 μL , 0.4 mol.L⁻¹, pH 2.6) puis digérée en solution par de la pepsine ou conservée pour un test SDS-PAGE [52]. Le test SDS-PAGE permet de montrer la présence du monomère et du dimère de BuChE mais révèle aussi la présence de protéines contaminantes (albumine et immunoglobulines principalement), indiquant que la méthode d'extraction développée n'est pas entièrement sélective, ceci pouvant s'expliquer par l'absence d'optimisation de l'étape de lavage. La mesure de l'activité enzymatique de la BuChE restant dans le plasma après purification a permis d'estimer que 95 à 98% de la BuChE s'était fixée aux anticorps mais aucune information n'est donnée concernant les taux de récupération de la BuChE du plasma après lavage et désorption. La digestion de la BuChE après purification est effectuée en solution à 37 °C pendant 2 heures par 2 μg de pepsine préparée dans 5% d'acide formique. Les peptides sont séparés de l'enzyme et des protéines non digérées par plusieurs étapes de lavage, filtration et centrifugation avant d'être analysés qualitativement par LC-MS².

En dépit de l'utilisation d'anticorps ayant une forte affinité pour la BuChE, ces méthodes d'immunopurification de la BuChE restent basées sur un simple phénomène de partage entre la BuChE de plasma et les anticorps. Néanmoins, le greffage covalent utilisé pour immobiliser les anticorps sur les billes de sépharose est un point fort dans une optique de réutilisation, bien que cet aspect n'ait pas été clairement décrit dans ces travaux. L'étape d'immunoextraction nécessite encore d'être étudiée plus en détail et optimisée en termes de sélectivité (comme le montre la présence de protéines contaminantes sur les tests SDS-PAGE) pour en faire une méthode d'extraction quantitative fiable, pouvant être couplée à l'étape de digestion et à l'analyse par LC-MS². Compte tenu de la complexité des échantillons biologiques, un grand soin devra être porté à l'optimisation du protocole d'immunoextraction afin de séparer efficacement la protéine d'intérêt sans endommager le support immunoabsorbant. Outre l'étape d'extraction, l'analyse d'une protéine par spectrométrie de masse inclut une étape de digestion, qui peut être effectuée en solution ou sur support d'enzymes immobilisées, appelé réacteur enzymatique.

2. Digestion en réacteur enzymatique (IMER)

2.1. Principe

Comme énoncé précédemment, le choix d'un réacteur enzymatique pour la digestion des protéines est plus avantageux qu'une digestion en solution et sera donc préféré pour la digestion de la BuChE. En effet, les supports d'enzymes immobilisés permettent d'augmenter la concentration locale en enzymes grâce à l'immobilisation des enzymes sur un support. Cela permet de réduire le temps de digestion par rapport à la digestion en solution mais surtout de limiter les phénomènes d'autodigestion, ce qui permet la réutilisation des IMER.

2.2. Supports d'immobilisation

Le choix du support d'immobilisation est, comme pour les immunoabsorbants, un élément essentiel pour l'immobilisation des enzymes. Il n'existe pas de support universel pour toutes les enzymes et leurs applications respectives mais de nombreuses caractéristiques sont à prendre en compte pour le choix du support. Il doit être inerte, résistant, mécaniquement stable et ne pas faciliter les adsorptions non spécifiques et les contaminations microbiennes [110]. Les propriétés physiques du support telles que la forme, la porosité, la taille des pores, la charge et la capacité de gonflement sont également importantes puisqu'elles peuvent affecter la cinétique du processus. En effet, le taux de réaction des enzymes immobilisées dépend de l'accessibilité du substrat aux sites actifs, de la concentration en substrat, de l'activité enzymatique et de la diffusion. Les conditions d'utilisation du réacteur vont également être importantes puisque selon l'enzyme utilisée, le support devra être choisi en fonction de sa stabilité dans la gamme de pH optimale de l'enzyme. D'usage, ces supports peuvent être classifiés comme matériaux inorganiques ou organiques.

- *Matériaux organiques (synthétiques et naturels)*

Des matrices à base de polymères naturels tels que la sépharose, le chitosane ou les polysaccharides de fibrine présentent de très bonnes biocompatibilités à pH basique et de bonnes stabilités mécaniques. Les polysaccharides naturels sont non-toxiques et aisément disponibles. Ils présentent une grande diversité et un haut maintien de l'activité enzymatique.

Le chitosane (CTS) est utilisé pour l'immobilisation des enzymes et des cellules. Cependant, il gonfle de manière irrégulière en présence d'eau et est peu stable mécaniquement.

Les polymères synthétiques incluent entre autres le polystyrène et les résines de méthyl méthacrylate-divinyl benzène. Ils ont l'avantage d'être compatibles avec des solutions basiques tout en présentant une bien meilleure stabilité mécanique que les gels. Un support commercial, Poros[®], constitué de particules de polymère organique de polystyrène-divinylbenzène (PS-DVB) a été largement utilisé. Il existe commercialement, directement conditionné en précolonne (30 x 2.1 mm d.i.) greffé avec de la trypsine (Poroszyme Immobilized trypsin cartridge[®]) et plus récemment avec la pepsine (Poroszyme Immobilized pepsin cartridge[®]). Plusieurs études portent sur la mise au point d'une méthode de digestion sur ce support à base de trypsine et dans la plupart des cas sur le développement d'une digestion en ligne couplée à l'analyse par chromatographie liquide et spectrométrie de masse [111–113]. En général, 5 % de méthanol ou d'acétonitrile sont utilisées pour réduire les interactions des peptides hydrophobes sur le support Poroszyme[®]. Cependant, aucun travail n'a porté sur la réelle évaluation des interactions non spécifiques de ce support.

De nombreuses études portent sur l'immobilisation d'enzymes sur des supports tels que l'agarose [114, 115], la sépharose activée N-hydroxysuccinimide (NHS) [116–118] ou la Sépharose activée par du bromure de cyanogène (CNBr) [115, 119]. Certains ont permis la digestion de protéines comme le cytochrome c [117, 118], la myoglobine [117], la BSA [118] ou les métalloprotéases matricielles [116]. Des billes d'agarose greffées par de la trypsine [117, 120] ou de la pepsine [121, 122] destinées à la digestion de protéines sont également disponibles commercialement. D'autres polymères ont été utilisés pour l'immobilisation d'enzymes. Par exemple, de la trypsine a été immobilisée sur des particules poreuses à base de méthacrylate de glycidyle (GMA-EDMA) non modifiées et sur des particules modifiées par différents polymères hydrophiles [123]. L'utilisation d'un support relativement hydrophile permet la réalisation d'un réacteur performant en limitant le développement d'interactions non spécifiques.

- **Matériaux inorganiques**

De nombreux matériaux inorganiques peuvent être utilisés pour l'immobilisation d'enzymes, par exemple, l'alumine, la silice, les zéolites ou encore les silices mésoporeuses. Les supports à base de silice sont très utilisés pour l'immobilisation enzymatique et présentent une forte résistance mécanique ce qui permet leur utilisation sur une large gamme de pressions, un faible coût, et une grande surface spécifique [124, 125]. En outre, la surface du gel de silice peut être facilement modifiée par des procédés chimiques pour fournir une grande diversité de groupements réactifs pour l'immobilisation du ligand. De plus, le gel de silice est chimiquement inerte, il est donc respectueux de l'environnement [126]. Cependant, les groupements silanols de surface peuvent générer de fortes interactions non spécifiques entre la silice et les solutés, et la silice est peu stable à pH acide, ce qui empêche son utilisation pour la synthèse de réacteur à base de pepsine.

2.3. Méthodes d'immobilisation

Les différentes méthodes d'immobilisation décrites précédemment pour les anticorps sont aussi utilisées pour le greffage d'enzymes. En effet, comme pour les anticorps, la liaison covalente entre le support et l'enzyme a lieu majoritairement *via* les fonctions amine primaire de l'enzyme à immobiliser. Une première technique consiste en l'immobilisation non covalente de l'enzyme à travers des méthodes d'adsorption (via des interactions hydrophobes ou électrostatiques) ou d'encapsulation sur un gel (polymère inorganique de type sol-gel). Cependant, dans le cas de l'immobilisation par adsorption, les enzymes peuvent se désorber facilement avec les variations de pH, de température et/ou de force ionique [127] tandis que la méthode par encapsulation peut soit entraîner un relargage de l'enzyme si les mailles sont trop larges soit un ralentissement de la cinétique de l'enzyme si la réticulation est trop importante. Des supports d'immobilisation covalente sont donc préférés afin d'éviter les phénomènes de relargage. La méthode la plus utilisée pour l'immobilisation d'enzyme est le greffage de l'enzyme par liaison covalente sur un support activé. Même si la liaison covalente peut limiter la mobilité conformationnelle de l'enzyme, la très grande stabilité de la liaison entre l'enzyme et le support limite le relargage des enzymes, ce qui présente un grand avantage par rapport à l'adsorption ou l'encapsulation. Les réacteurs enzymatiques ont tout d'abord été développés en format conventionnel (colonnes de diamètre supérieur à 1 mm) en

raison de leur facilité de remplissage par le support immobilisé puis miniaturisés (diamètre <1 mm) [128–131].

2.4. Influence des paramètres chimiques et physiques sur la digestion

L'influence des paramètres chimiques et physiques va à la fois dépendre du support d'immobilisation mais aussi du type d'enzyme utilisée. Pour certaines enzymes, telles que la pepsine ou trypsine, l'augmentation de la température améliore l'efficacité de la digestion [99, 118]. La température de digestion sur trypsine immobilisée la plus utilisée est 37°C [93, 132] tandis que la pepsine présente une activité optimale à 60°C lorsqu'elle est immobilisée sur support monolithique, contre 37°C lorsqu'elle est libre en solution (Figure 22) [133].

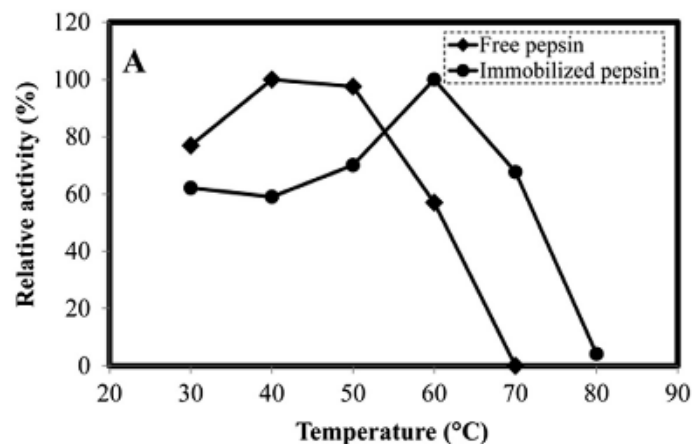


Figure 22. Influence de la température sur l'activité de la pepsine immobilisée ou en solution. Issu de [133].

Le milieu de digestion a également une influence importante. Les digestions trypsiques de protéines se font en milieu tamponné à pH neutre voire légèrement basique et dans le cas de la digestion en solution, du calcium est généralement ajouté au milieu de digestion [134–136]. Il permet d'améliorer l'efficacité de digestion en stabilisant l'enzyme et donc en inhibant le phénomène d'autodigestion [137]. Les digestions par la pepsine sont réalisées en milieu acide avec un pH optimum de digestion de l'ordre de 1-3 tandis que les supports immobilisés présentent des pH optimaux légèrement supérieurs à ceux de la pepsine libre [133]. Concernant les réacteurs de pepsine immobilisée, le pH est contrôlé par des tampons acétate d'ammonium acidifié (pH = 2) [121] ou de l'acide formique seul à pH = 2

[57]. Ainsi, des supports à base de silice ne peuvent pas être utilisés pour le greffage de la pepsine.

L'efficacité de digestion dépend également de la quantité d'enzyme utilisée et du temps de contact entre l'enzyme protéolytique et le substrat. Plus le temps de contact est long et le rapport E/S est élevé, plus la protéine est digérée. La quantité d'enzyme pouvant être utilisée sans risquer l'autodigestion de l'enzyme protéolytique est beaucoup plus grande dans le cas des IMER que pour la digestion en solution. Ainsi, la cinétique de digestion sur IMER est supérieure à celle en solution et ne dure que quelques minutes contre plusieurs heures en solution. Afin d'améliorer l'efficacité de la digestion sur les IMER, la durée de digestion peut être augmentée en diminuant le débit ou en arrêtant le débit (« stop-flow ») de manière à augmenter le temps de contact entre la protéine et l'enzyme. A titre d'exemple, des études menées au LSABM ont montré que la digestion du cytochrome C par de la trypsine peut être réalisée en moins de 30 min sur un IMER constitué de trypsine greffée sur sépharose au lieu de 12 à 16 h en solution [138]. Finalement, la durée de digestion dépend de la nature et de la quantité de protéine à digérer, de la quantité d'enzymes immobilisées et de la facilité d'accès des protéines aux sites actifs des enzymes.

3. Couplage en ligne des supports de protéines immobilisés au système chromatographique

3.1. Couplage de l'IMER au système chromatographique

Une des tendances actuelles dans le domaine de l'analyse consiste à intégrer les différentes étapes de l'analyse (extraction, digestion, séparation et détection) en un seul dispositif automatisable pour réduire les temps de traitement et d'analyse. Concernant la BuChE, un montage réalisé par Carol-Visser *et al.* [57] utilisant un IMER de pepsine commercial (Poroszyme[®] 30 x 2.1 mm d.i.) couplé à la LC-MS² a été développé pour la digestion et l'analyse en ligne de la protéine (Figure 23).

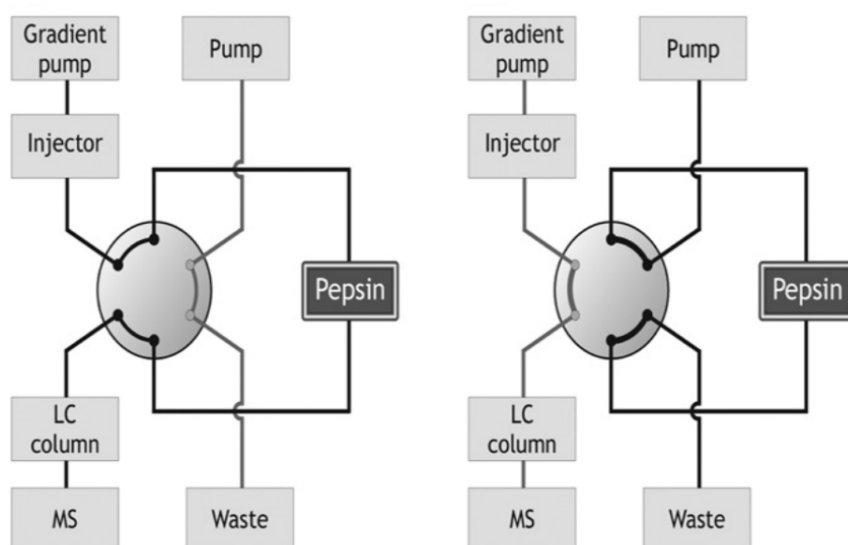


Figure 23 : Représentation schématique du système analytique de digestion pepsique en ligne couplé à la LC-MS/MS (ESI/QTOF). A gauche, injection de l'échantillon vers l'IMER et la colonne. A droite, séparation des peptides sur la colonne et régénération de la cartouche. Issu de [57].

Dans ce montage, 10 μL de BuChE humaine (350 nmol.L^{-1}) intoxiquée par une solution de sarin à $1 \mu\text{g.mL}^{-1}$ ont été injectés dans la précolonne de pepsine Poroszyme[®] et digérés pendant 5 min avant d'être transférés sur la colonne analytique par une phase mobile 100% A (H_2O , 0,2% HCOOH). Les peptides ont ensuite été séparés dans la colonne analytique (Pepmap C18, $150 \times 1 \text{ mm}$) par un gradient eau/acétonitrile ($0 \rightarrow 70\%$ B en 60 min) tandis que la précolonne a été régénérée par 100% de A. L'efficacité de la digestion a juste été déterminée en comparant les intensités de plusieurs pics (spécifiques de la BuChE) issus de la digestion par l'IMER aux intensités des mêmes pics pour la digestion en solution. Aucune information n'a été donnée concernant les conditions de digestions (pH, ratio Enzyme/Substrat, quantité de BuChE digérée...). Dans cette étude, l'aire du peptide a montré une bonne répétabilité avec un coefficient de variation de 10 % tandis que l'air du pic obtenu pour la digestion sur Poroszyme[®] de pepsine correspond à 70 % de celle obtenue après la digestion en solution. Cependant, la quantification de cette méthode de digestion n'est que relative puisqu'aucune information n'a été fournie concernant les valeurs des taux de digestion de la BuChE sur colonne Poroszyme[®], ou encore sur les taux de greffage du réacteur. Les colonnes commerciales ont par ailleurs un cout élevé, d'autant plus que leur durée de vie est limitée à quelques dizaines de digestions [1]. Il paraît donc préférable de

contrôler la synthèse des IMER plutôt que d'utiliser des IMER commerciaux afin de pouvoir choisir le support de greffage adéquat et d'optimiser la quantité d'enzymes immobilisées.

3.2. Couplage de l'immunoadsorbant au système chromatographique

L'intégration d'un immunoadsorbant à une technologie en ligne présente un grand intérêt par la sélectivité de l'extraction due à l'affinité antigène-anticorps. Il existe deux procédures différentes, dépendant du support utilisé pour l'immobilisation de l'anticorps. L'utilisation d'un support résistant à la pression telle que la silice permet de connecter directement l'immunoadsorbant au système analytique. Cette approche a notamment été décrite pour l'immunoextraction de petites molécules ne nécessitant pas d'étape de digestion intermédiaire, les molécules piégées étant directement transférées vers la colonne analytique [65]. Pour les IS ne résistant pas à la pression mais stables sur une plus large gamme de pH, comme ceux issus d'un greffage sur sépharose, le montage doit être composé de deux précolonnes : la première contenant l'IS et la seconde composée de silice greffée C18 ou d'un copolymère apolaire. Dans ce cas, l'échantillon est percolé à faible débit à travers la première précolonne contenant l'IS puis après lavage, les deux colonnes sont couplées en série et les analytes sont désorbés par une solution aqueuse et reconcentrés sur la précolonne de piégeage. De faibles débits sont utilisés sur cette précolonne de faible dimension, ce qui permet de ne générer qu'une faible perte de charge sur la précolonne contenant l'IS. Dans une seconde étape, l'IS est déconnecté et la colonne de piégeage est couplée en ligne avec la colonne analytique ce qui permet de désorber les analytes et de les entraîner vers la colonne analytique et le détecteur. Pour les protéines, l'immunoextraction est suivie d'une étape de digestion en solution. Cependant, cette étape est longue et peut conduire à l'autodigestion de l'enzyme. C'est pourquoi des réacteurs enzymatiques sont préférés pour l'étape de digestion, en plus de leur possibilité de couplage en ligne à l'IS et la LC-MS.

3.3. Couplage en ligne de l'immunoadsorbant et de l'IMER à la LC-MS

La majorité des réacteurs enzymatiques dédiés à l'analyse de protéines sont à base de trypsine. Cependant, il paraît difficile de coupler de tels IMER à un IS puisque la trypsine clive les protéines à un pH basique tandis que l'élution des protéines d'un IS se fait en milieu acide. Une méthode alternative se fonde donc sur l'utilisation d'un IMER de pepsine, clivant les protéines en milieu acide. Dans ce type de montage, présenté Figure 24 [1], la principale

difficulté provient de la bonne compatibilité des solvants entre les différentes étapes. En effet, l'éluion de l'immunoabsorbant se déroule en conditions acides, il est donc primordial de s'assurer que l'enzyme greffée dans l'IMER est active à pH acide, mais surtout que le support de greffage résiste à de faibles pH. Ainsi, les IMER à base de silice sont à proscrire pour tout couplage éventuel avec un immunoabsorbant tandis que des supports à base de sépharose semblent plus adaptés. Néanmoins, la sépharose est peu résistante à la pression ; il est donc nécessaire d'intégrer au montage un support de refocalisation des peptides résistant à la pression avant le transfert des peptides vers la colonne analytique. Le potentiel d'une telle procédure en ligne a été validé au LSABM à travers l'extraction et la digestion de 85 pmol de cytochrome c du plasma sur ce montage, donnant une réponse similaire en LC-MS à celle obtenue par un échantillon purement aqueux [71].

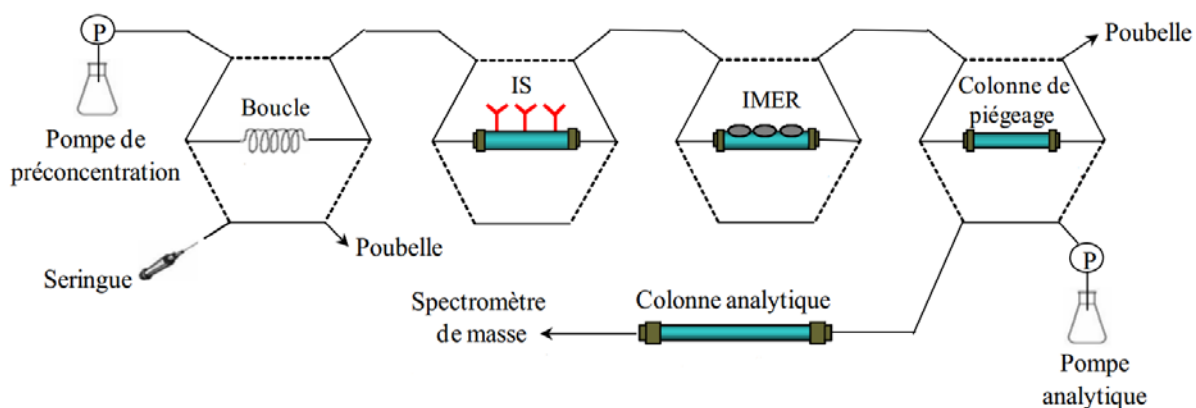


Figure 24. Présentation du montage en ligne en format micro pour l'analyse d'une protéine ciblée après immunoextraction et digestion en ligne. Issu de [1].

4. Conclusions et perspectives

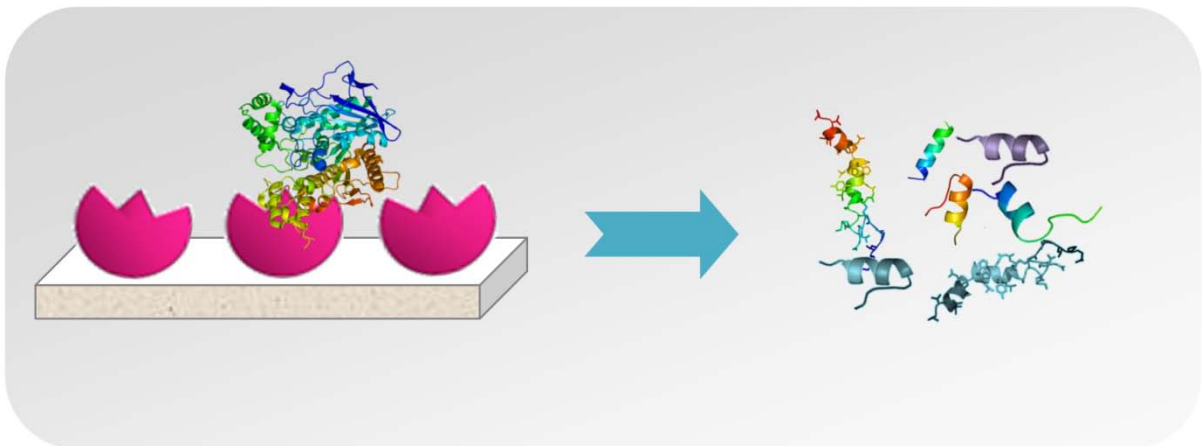
Les aspects à améliorer pour la détection de composés OPNA dans les échantillons biologiques portent surtout sur l'extraction de la BuChE. Malgré la forte sélectivité induite par l'utilisation d'anticorps, les méthodes utilisant l'immunoaffinité sur billes magnétique présentent plusieurs inconvénients, principalement dus à l'étape de digestion qui lui succède. En effet, lors de cette étape, l'ensemble du complexe bille-anticorps-BuChE est digéré, ce qui empêche la réutilisation des anticorps. Par ailleurs, en plus des peptides de BuChE obtenus lors de cette étape, des peptides issus de la digestion des anticorps ainsi que de l'autodigestion des enzymes sont également formés, ce qui va créer des effets de matrice lors de l'étape

d'ionisation en spectrométrie de masse. Un des points clé sera donc l'immobilisation des anticorps sur un support immunoabsorbant, permettant la fixation puis la libération de la molécule cible en temps voulu, ce qui permettra d'isoler la protéine du plasma sans digérer les anticorps. Les anticorps présentant une très grande sélectivité vis-à-vis des analytes cibles, un support d'immunoaffinité sera synthétisé en greffant de façon covalente des anticorps anti-BuChE sur un support de sépharose activée CNBr immobilisé dans une précolonne. Ce support présente l'avantage d'être réutilisable grâce à la forte stabilité de la liaison covalente entre l'anticorps et le support (ce qui permet d'éluer les protéines sans rompre l'interaction anticorps-support), et de pouvoir être couplé en ligne à l'étape de digestion et à la LC-MS. L'utilisation de différents anticorps monoclonaux dirigés contre différents épitopes de la BuChE sera envisagée pour l'étape d'immunoextraction, et chaque étape de l'extraction sera optimisée afin de permettre une analyse quantitative fiable. De la même manière, la fixation de pepsine sur un support à base de sépharose activée CNBr permettra d'éviter tout phénomène d'autodigestion tout en réduisant le temps de digestion. Les étapes d'extraction et de digestion ont été jusqu'alors très qualitatives puisqu'aucun taux de digestion ou de rendement d'extraction de la BuChE n'apparaît dans la littérature. Ainsi, les supports de d'anticorps et d'enzymes immobilisées seront développés et caractérisés en termes de répétabilité, de rendement d'extraction et de digestion. La digestion enzymatique sur supports d'enzymes immobilisées sera étudiée et permettra d'éviter les phénomènes d'autodigestion, de réduire le temps de digestion et de mettre en place une digestion répétable et quantifiable, qui sera ensuite couplée en ligne à l'immunoextraction et à l'analyse LC-MS.

PARTIE EXPERIMENTALE

CHAPITRE III

DEVELOPPEMENT D'UNE METHODE DE DIGESTION DE LA BUCHE SUR SUPPORTS D'ENZYMES IMMOBILISEES



Chapitre III - Développement d'une méthode de digestion de la BuChE sur supports d'enzymes immobilisées

Au cours du chapitre précédent, plusieurs supports et techniques d'immobilisation de protéines ont été décrits et comparés. Nous avons pu constater que la digestion sur réacteurs enzymatiques (IMER) présente un grand intérêt pour réduire la durée de digestion et limiter les phénomènes d'autodigestion, source d'interférences. Par ailleurs, les IMER présentent l'avantage de pouvoir être couplés en ligne à l'analyse LC-MS, ce qui limite les interventions manuelles, et ainsi les contaminations. Très peu d'études portent sur la caractérisation des IMER et sur la répétabilité de la digestion ou de la synthèse.

Ce chapitre présente plusieurs IMER de pepsine qui ont été développés et caractérisés en termes de taux de greffage et de rendement de digestion. Pour cela, une méthode analytique a été développée pour la détection et la quantification du nonapeptide. L'analyse par nanochromatographie a été utilisée pour sa grande sensibilité et pour réduire les coûts de développement de l'analyse, par l'injection de faible quantité d'analyte. La répétabilité des IMER a également été évaluée en termes de répétabilité de taux de greffage et de taux de digestion. Finalement, la digestion de la BuChE sur IMER a été comparée à la digestion en solution afin de sélectionner la méthode permettant la digestion la plus efficace et donc l'obtention d'une plus grande quantité de nonapeptide cible.

Ce chapitre se présente sous la forme d'une publication acceptée : « Development of immobilized-pepsin microreactors coupled to nano liquid chromatography and tandem mass spectrometry for the quantitative analysis of human butyrylcholinesterase », M. Bonichon, A. Combès, C. Desoubries, A. Bossée, V. Pichon, *Journal of Chromatography A*, 1461 (2016) 84.

Article 1: Development of immobilized-pepsin reactors coupled to nano liquid chromatography and tandem mass spectrometry for the quantitative analysis of human butyrylcholinesterase

Maud Bonichon¹, Audrey Combès¹, Charlotte Desoubries², Anne Bossée², Valérie Pichon^{1,3}

¹ Department of Analytical, Bioanalytical Sciences and Miniaturization (LSABM), UMR CNRS-ESPCI Paris, CBI 8231, PSL Research University, ESPCI Paris, 10 rue Vauquelin, Paris, France

² DGA, CBRN Defence, 5 rue Lavoisier, Vert-le-Petit, France

³ UPMC, Sorbonne University, 4 place Jussieu, Paris, France

Abstract

Human butyrylcholinesterase is a serine hydrolase that reacts with organophosphorus compounds (OP) to form stable adducts. These adducts are valuable biomarkers for OP exposure and can be analyzed by liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) after a preliminary digestion step in solution. However, this digestion step is time-consuming and cannot be directly coupled with LC-MS set ups. Therefore, the aim of this work was to develop pepsin-based immobilized enzyme microreactors (IMER) for the rapid digestion of human butyrylcholinesterase (HuBuChE). Various IMER were synthesized by grafting different amounts of pepsin on a CNBr-sepharose gel and the grafting yield was measured by a bicinchoninic acid assay (BCA). A sensitive nanoLC-MS/MS method was developed to evaluate the digestion yields of HuBuChE on IMER which was made possible by a synthetic peptide which was used as a calibrant. The digestion was optimized by studying the impact of different parameters such as the digestion time, the temperature and the amount of pepsin grafted on IMER. This optimization allowed HuBuChE to be digested with-in 20 min without pretreatment and with digestion yields up to 20%. The repeatability of the IMER synthesis and HuBuChE digestion was highlighted with the characterization of 3 similar IMER. Finally, the digestion yields of HuBuChE were higher with IMER when compared to a typical in solution digestion.

1. Introduction

Human butyrylcholinesterase (HuBuChE) is a serine esterase glycoprotein present in plasma and is made up of four 85 kDa subunits [51, 139]. HuBuChE catalyzes the hydrolysis of esters including acetylcholine, aspirin, cocaine or heroin [106]. It can also be used as a biomarker for exposure to organophosphorus compounds (OPs) such as sarin [53, 57, 140, 141], soman [53, 141, 142], tabun [53, 142, 143], or VX [17, 141]. These nerve agents covalently bind to acetylcholinesterase (AChE) and HuBuChE and irreversibly inhibit their activity. Inhibition of AChE activity induces the accumulation of acetylcholine within nerve synapses, leading to paralysis and respiratory dysfunction which can result in death [144, 145]. Because of their high degree of toxicity, these nerve agents can be used as chemical warfare agents [140]. Thus, the retrospective detection of OP exposure after a chemical weapons attack is of the utmost importance. It provides a reliable diagnosis leading to appropriate medical countermeasures, as well as confirming the alleged use of these chemical warfare agents which are prohibited under the terms of the Chemical Weapons Convention [146]. HuBuChE is usually the preferred biomarker of OP exposure over AChE because it can form adducts with a broad range of OPs, is 10 times more abundant than AChE in the plasma (40-80 nM) and can persist in the blood longer than AChE [104]. The binding of OP nerve agents on the 198 serine residue of the HuBuChE active site allows retrospective detection of HuBuChE-OP adducts in blood for as long as 16 days when urinary metabolites are no longer detectable [147].

Protein determination is commonly performed by liquid chromatography coupled to mass spectrometry analysis (LC-MS). However, ionization of intact proteins produces multiply charged ions envelopes, leading to a very complex mass spectra. In order to avoid such problems, the detection of HuBuChE-OP adducts is usually performed after a preliminary digestion step. This digestion produces small peptide fragments that are then analyzed by liquid chromatography tandem mass spectrometry (LC-MS/MS).

The digestion of HuBuChE-OP is typically achieved in solution with trypsin [14], chymotrypsin [53] or pepsin [54, 148], commonly over 2 hours. Generally, to decrease lengthy digestion time of proteins, the enzyme/protein ratio can be increased. However, as the enzyme is free in solution, autolysis can occur thus generating peptides that can interfere during the mass spectrometry analysis. To overcome this drawback, the proteolytic enzyme can be immobilized on a functionalized solid support [149]. The resulting immobilized

enzyme reactors (IMER) allow for an efficient digestion and low digestion time while minimizing sample contamination during handling and avoiding autolysis. In addition, as the stability of the enzyme is enhanced, immobilized enzyme reactors can be reused thus decreasing the cost of the digestion step [149]. IMER have been synthesized on various formats for the digestion of proteins including pre-columns [99, 111, 112, 132, 136, 150], membranes [151, 152], capillaries [128, 153, 154], pipette tips [155], disks [156, 157] and using various supports such as silica particles [158], silica monolith [158, 159], agarose [117, 120, 160, 161], graphene [162], or synthetic polymers such as monolithic polymethacrylate derivatives [155, 163–165] and polystyrene-divinylbenzene (Poroszyme) [21–23,30, 44,45].

Performances of the IMER depend on many factors including the technique used for enzyme immobilization (adsorption, encapsulation or covalent linkage), digestion conditions and the nature of the functionalized immobilization support [167]. The ideal support should be biologically inert, easily activated, homogeneous with high surface area and should favor a good accessibility of the substrate [168]. It should also present good mechanical and chemical stability over a wide range of pH, pressure, temperature and solvent conditions [169, 170]. Finally, this support should be hydrophilic to avoid non-specific hydrophobic interactions with proteins or peptides. A study comparing the performance of IMER made with 3 different precolumn-format supports [160], highlighted the importance of the immobilization support for the efficient digestion of cytochrome C on a trypsin-based IMER. Between CNBr-activated Sepharose (Seph-CNBr), NHS-activated Sepharose and glutaraldehyde-activated silica, Seph-CNBr appeared to be the best immobilization support in terms of capacity and digestion yield [160].

Due to the high specificity of its cleavages, trypsin has been frequently used for the digestion of HuBuChE [14, 148]. Yet, HuBuChE digestions with trypsin require pretreatments (carboxymethylation and deglycosylation) and induce large peptide-OP adducts (29 amino acids) that can excessively fragment in the mass spectrometer ion source and result in an insensitive detection. In the case of HuBuChE digestion by pepsin, pretreatment of the enzyme is not necessary and the digestion leads to smaller peptides including the nonapeptide FGESAGAAS on which OPs bind [148]. Moreover, digestion by pepsin can be directly coupled to a preliminary selective extraction step by immobilized antibodies (immunoextraction) in order to remove other interfering proteins from real plasma thus improving the selectivity and the sensitivity of the whole analytical method. Additionally, the

acid conditions used for pepsin digestion (pH 2.2) has been shown to be compatible with the elution of proteins such as cytochrome C from antibodies [171].

Recently, Carol-Visser et al. developed an on-line set-up that consists of a direct coupling of a sarin-intoxicated HuBuChE digestion using a commercial pepsin-IMER precolumn (Poroszyme® 30 x 2.1 mm i.d.) with LC-MS/MS analysis [57]. Efficiency of the digestion was determined by comparing the intensities of the HuBuChE specific peptide obtained after digestion on IMER to those obtained after a digestion in solution. In this study, intensity of adduct nonapeptide derived from on-line pepsin digestion was about 70% of that obtained after in-solution digestion. However, no information was provided on Poroszyme® column digestion yields or on the grafting yields of pepsin in the reactor. Apart from a study on the development of trypsin-based microreactors related to cytochrome C digestion [160], quantification of digestion yields on IMER have not been evaluated. In addition, rather than using commercial IMER, it appears interesting to control the synthesis of IMER to be able to choose an appropriate grafting support and control the amount of immobilized enzymes.

Although many developments were made on trypsin microreactors [172], few studies deal with the development of pepsin-based IMER. Moreover, none have been specifically developed for HuBuChE digestion despite the ability of pepsin to digest HuBuChE as already mentioned above. Thus, the aim of this study was the development and characterization of laboratory-made pepsin-based IMER for the digestion of HuBuChE. Different supports were prepared by grafting different amounts of pepsin on cyanogen bromide (CNBr)-activated Sepharose and were packed in precolumns (20 x 2 mm i.d.). Digestions on pepsin-based IMER were optimized with the evaluation of several key parameters such as the digestion time, temperature and the amount of pepsin grafted on the IMER. This evaluation was based on the quantification of a specific nonapeptide that was quantified in the digest by nanoLC-MS/MS. The repeatability of the digestion and IMER synthesis were assessed with the preparation of 3 similar microreactors. Finally, digestion yields obtained on IMER were compared to those obtained by digestion in solution.

2. Experimental

2.1. Chemicals

Pepsin from porcine gastric mucosa, sodium hydrogen phosphate (Na_2HPO_4), sodium azide (NaN_3), sodium chloride (NaCl) and cyanogen bromide-activated Sepharose 4B were purchased from Sigma Aldrich (Sigma-Aldrich, Saint-Quentin Fallavier, France). Potassium dihydrogen phosphate (KH_2PO_4), di-sodium hydrogen phosphate dihydrate ($\text{Na}_2\text{HPO}_4(2\text{H}_2\text{O})$), sodium acetate ($\text{CH}_3\text{CO}_2\text{Na}$), acetic acid (CH_3COOH), formic acid (HCOOH), glycine, hydrochloric acid and acetonitrile (ACN) were purchased from VWR (Fontenay-sous-Bois, France). Sodium hydroxide was purchased from Merck (Darmstadt, Germany). HPLC-grade acetonitrile was ordered from Carlo Erba (Val de Reuil, France). High purity water was obtained from a Milli-Q purification system (Millipore, Saint Quentin en Yvelines, France).

Two different sources of HuBuChE, obtained by the purification of human serum, were used: HuBuChE₁ (480 μg of lyophilized HuBuChE, 50 U/mg, B4186) was purchased from Sigma Aldrich and HuBuChE₂ (480 μg of lyophilized HuBuChE with 0.02 mol.L^{-1} ammonium bicarbonate, 160 U/mg, MBS173030) was purchased from MyBioSource (San Diego, California, USA). Synthetic nonapeptide (FGESAGAAS) was obtained from Proteogenix (Schiltigheim, France). BCA protein assay reagents were obtained from Thermo Fisher Scientific.

The phosphate buffer saline solution (PBS, pH 7.4) consisted of 0.01 mol.L^{-1} of both Na_2HPO_4 and KH_2PO_4 and 0.15 mol.L^{-1} of NaCl . The PBS-azide solution is a solution of PBS with 0.1% (w/w) of NaN_3 . HuBuChE solutions (480 mg.L^{-1}) were prepared in PBS-azide. Pepsin solutions were prepared in saline sodium acetate solution ($\text{CH}_3\text{CO}_2\text{Na}$, 0.1 mol.L^{-1} , pH 5.8, NaCl 0.5 mol.L^{-1}).

2.2. Apparatus and HPLC-MS analysis

The digestion was performed using a device composed of two six-port switching valves (Figure S.1, *Annexe 3*), one connected with the injection loop (5 μL) and a preconcentration pump (isocratic pump LC-10AS, Shimadzu, Champs sur Marne, France) and the other to an

IMER precolumn set in an oven (Crococil oven, CIL). Because sepharose is not pressure resistant, the backpressure generated by the system was not over 4 bars.

The nanoLC-MS/MS analytical system is composed of a nano-pump (NCP-3200RS Nano Pump, Dionex, controlled by Chromeleon 6.8 SR11), a 250 nL injection loop, an EASY-Spray PepMap[®] analytical column (C18, 15 cm x 75 μm i.d, 3 μm , 100 \AA) and a triple quadrupole TSQ Quantum Access Max[™] (Thermo Scientific) equipped with an EASY-Spray[™] source (Thermo Scientific). The mobile phase contained a mixture of water and acetonitrile acidified with 0.1% formic acid. The separation of peptides was achieved by increasing the amount of acidified acetonitrile from 2% to 35% from 0 min to 20 min at 300 $\text{nL}\cdot\text{min}^{-1}$. The synthetic nonapeptide was used as a calibrant ($\text{MW}: 795.2 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$) and peptides resulting from HuBuChE digestion were analyzed by nanoLC-MS and nanoLC-MS/MS. Ionization was performed in positive mode with the following source conditions: source voltage was set at 1900 V, capillary temperature at 200°C, tube lens offset at 175 V and skimmer offset at 10 V. The scan time was set to 100 ms and a m/z range [450-2000] was used for scan experiments. In MRM analysis, the collision-induced dissociation (CID) experiments were carried out with a fragmentation voltage of 30 eV. The transitions m/z 796.2 \rightarrow 691.0; 796.2 \rightarrow 673.0 and 796.2 \rightarrow 602.1 corresponding respectively to the b_8 , $b_{8-\text{H}_2\text{O}}$ and $b_{7-\text{H}_2\text{O}}$ fragments of the nonapeptide were followed to quantify the amount of nonapeptide obtained after digestion (Figure 25).

2.3. Preparation of pepsin-based IMER

For pepsin immobilization, different grafting solutions were prepared by diluting various amounts of pepsin ranging from 1 to 8 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ in 0.1 $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ of sodium acetate solution. Pepsin-based IMER were prepared according to a protocol similar to the one developed in our laboratory for trypsin immobilization [160]. Briefly, 1.7 mL of grafting solution at different concentrations of pepsin (1, 4, and 8 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ corresponding to 1.7, 6.8 or 13.6 mg of pepsin) was added to 35 mg of CNBr activated sepharose that had been swollen in 1 mL of $10^{-3} \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ HCl solution. The IMER was washed twice with 1 mL of saline sodium acetate solution. The sorbent was incubated for 16 h at 4°C and 30 mg of sorbent was packed in a 20 x 2 mm i.d precolumn. The remaining uncoupled sites were blocked by percolating a glycine solution at 0.2 $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, (pH 5) through the precolumn for 2 h at room temperature with a flow of 0.4 $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$. The gel was washed 3 times to remove unbound enzymes by

alternating between sodium acetate (pH 5.8 + 0.5 mol.L⁻¹ NaCl) and acid solutions (HCl, pH 3 + 0.5 mol.L⁻¹ NaCl) for 10 min each at 0.4 mL.min⁻¹. Finally, IMER were stored at 4°C in a formic acid solution (pH 3). The IMER grafted with 1.7 mg, 6.8 mg and 13.6 mg of pepsin were respectively named IMER 1.7, IMER 6.8 and IMER 13.6. The repeatability of IMER synthesis was evaluated by making 3 IMER grafted with 6.8 mg of pepsin. These resulting IMER were called IMER 6.8B, IMER 6.8C and IMER 6.8D.

2.4. Quantification of pepsin grafted on IMER

A bicinchoninic acid assay (BCA) was developed to calculate the amount of pepsin immobilized on sepharose. Two calibration curves (6 levels of concentration) were made by adding 10 µL of pepsin at a concentration ranging from 20 µg.mL⁻¹ to 8 mg.mL⁻¹ (depending on the concentration of pepsin used in the coupling solution). Briefly, 10 µL of supernatant was added in 3 microwells of a 96 microplate. Then, 100 µL of working reagent (mix of bicinchoninic acid and Cu²⁺) was added in each microwell. The microplate was incubated at 37°C for 30 min with stirring at 300 rpm. Absorbance was measured at 562 nm with a spectrophotometer (SpectraMax M2, Molecular Devices, St Gregoire, France). Finally, grafting yields were calculated by comparing the amount of pepsin remaining in the supernatant to the initial amount of pepsin in coupling solution.

2.5. HuBuChE digestion procedures

2.5.1. In-solution digestion

Pepsin is a proteolytic enzyme active at an acidic pH (1-3) [173]. Thus, HuBuChE (2.4 µg) was digested in 100 µL of formic acid solution (pH 2.2) by adding pepsin in an enzyme/substrate molar ratio of 10. The digestion was carried out for 2 hours at 37°C as previously described by Jiang et al. [15, 54]. Then, 250 nL of the digest solution was analyzed by nanoLC-MS/MS. Digestion yields were evaluated by comparing the quantity of nonapeptide resulting from pepsin digestion determined with the nonapeptide calibrations curves, to the theoretical quantity of nonapeptide corresponding to a 100% digestion yield.

2.5.2. IMER digestions

Briefly, 2.4 μg of HuBuChE solution was loaded into a 5 μL injection loop and transferred to the IMER with a formic acid solution (pH 2.2) at 50 $\mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$. After the digestion made by a “stop flow”, peptides were recovered with 100 μL of formic acid (50 $\mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$) and analyzed by nanoLC-MS/MS. Evaluation of digestion yields on each IMER was identical to the method used in Section 2.5.1 for in solution digestion. Different parameters such as the temperature, the digestion time and the volume of formic acid used to transfer peptides were investigated to determine the optimal digestion conditions leading to the highest digestion yield of HuBuChE on the IMER.

3. Results and discussion

3.1. Analysis of HuBuChE peptides by nanoLC-MS²

The aim of this study was to develop a rapid and efficient HuBuChE digestion utilizing an IMER prior to the analysis of the nonapeptide. Thus, a separation method based on the use of nanoLC-MS/MS was developed to analyze the nonapeptide and evaluate the HuBuChE digestion yields on each IMER. Nano-chromatography enables a sensitive method while enabling lower costs of development than conventional LC-MS systems by injecting smaller amounts of a standard solution into the analytical system (a few nanoliters instead of microliters). To optimize the nanoLC-MS parameters and to determine the retention time of the nonapeptide on the 75 μm i.d.-column, a synthetic nonapeptide (108 $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$) was injected into the nanoLC-MS system and detected in scan mode. An extracted ion chromatogram was performed and the nonapeptide ($[\text{M}+\text{H}]^+$, $m/z = 796.2$) was observed at a retention time of 10.6 min (Figure 25A). Then, a fragmentation spectrum was carried out to compare its b-fragments to the theoretically expected b-fragments [52, 174]. The three most intense b-fragments (b_8 , $b_{8-\text{H}_2\text{O}}$ and $b_{7-\text{H}_2\text{O}}$) corresponding respectively to the transitions m/z 796.2 \rightarrow 691.0; 796.2 \rightarrow 673.0 and 796.2 \rightarrow 602.1 were chosen for MRM analysis to further identify unambiguously and quantify the amount of nonapeptide resulting from HuBuChE digestion. For this purpose, calibration curves were established for each transition by injecting five different concentrations of the synthetic nonapeptide (6.75, 13.5, 27, 54 and 108 $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$) into the nanoLC-MS/MS system. The injections were repeated 3 times for each concentration level. The variation of the LC retention time was estimated at 2% while an 11% R.S.D. was

obtained for LC peak area. To consider inter-day variations of the nanoLC-MS² signal, nonapeptide calibration curves were reiterated before each digestion procedure. The linear regression equations and coefficients values of the regression curves obtained for the transitions m/z 796.2→691.0; 796.2→673.0 and 796.2→602.1 for this concentration range were respectively equal to $y = 16590 x + 7159.7$, $R^2 = 0.9959$; $y = 16105 x + 6282.8$, $R^2 = 0.9979$; $y = 15796 x + 6035.9$, $R^2 = 0.996$ (Fig. S.2, *Annexe 3*). For the transition m/z 796.2→602.1, the limit of detection (LOD, S/N = 3) and quantification (LOQ, S/N = 10) of the nonapeptide were 0.15 ng.mL^{-1} (38 fg injected) and 0.5 ng.mL^{-1} (125 fg) respectively. For both transitions m/z 796.2→691.0 and 796.2→673.0, the LOD and LOQ values were estimated to 0.16 ng.mL^{-1} (LOD) and 0.5 ng.mL^{-1} (LOQ). These LOD values are 7 to 20 times below the limit of detection reported by Sporty et al. (3 ng.mL^{-1}) [147], Pantazides et al. (1 ng.mL^{-1}) [104] and Carter et al. (0.96 ng.mL^{-1}) [18]. Those values were obtained by injecting $3 \mu\text{L}$ [18] to $10 \mu\text{L}$ [104] of nonapeptide in LC-MS/MS while nanoLC-MS/MS allows a reduction in the injected volume by a factor 12 to 40 (250 nL). Thus, these LOD values demonstrate that the nanoLC-MS/MS method leads to a sensitive analysis while reducing the cost by injecting smaller amounts of standards. To confirm that the nonapeptide resulting from HuBuChE digestion can be detected by nanoLC-MS, HuBuChE₁ (480 μg of lyophilized HuBuChE, 50 U/mg, diluted in 1mL of PBS azide solution), was digested in solution as described in Section 2.5.1 and analyzed by nanoLC-MS in scan mode. An extracted ion chromatogram was performed, confirming the presence of the nonapeptide in the HuBuChE digest at 10.6 min (Figure 25B). The corresponding fragmentation spectrum displayed nonapeptide b-fragments similar to those obtained from the fragmentation of the synthetic nonapeptide (Figure 25A). Thus, a sensitive method was developed to detect the target nonapeptide resulting from a HuBuChE digestion and could thus be applied to the detection of HuBuChE peptides from an IMER digestion.

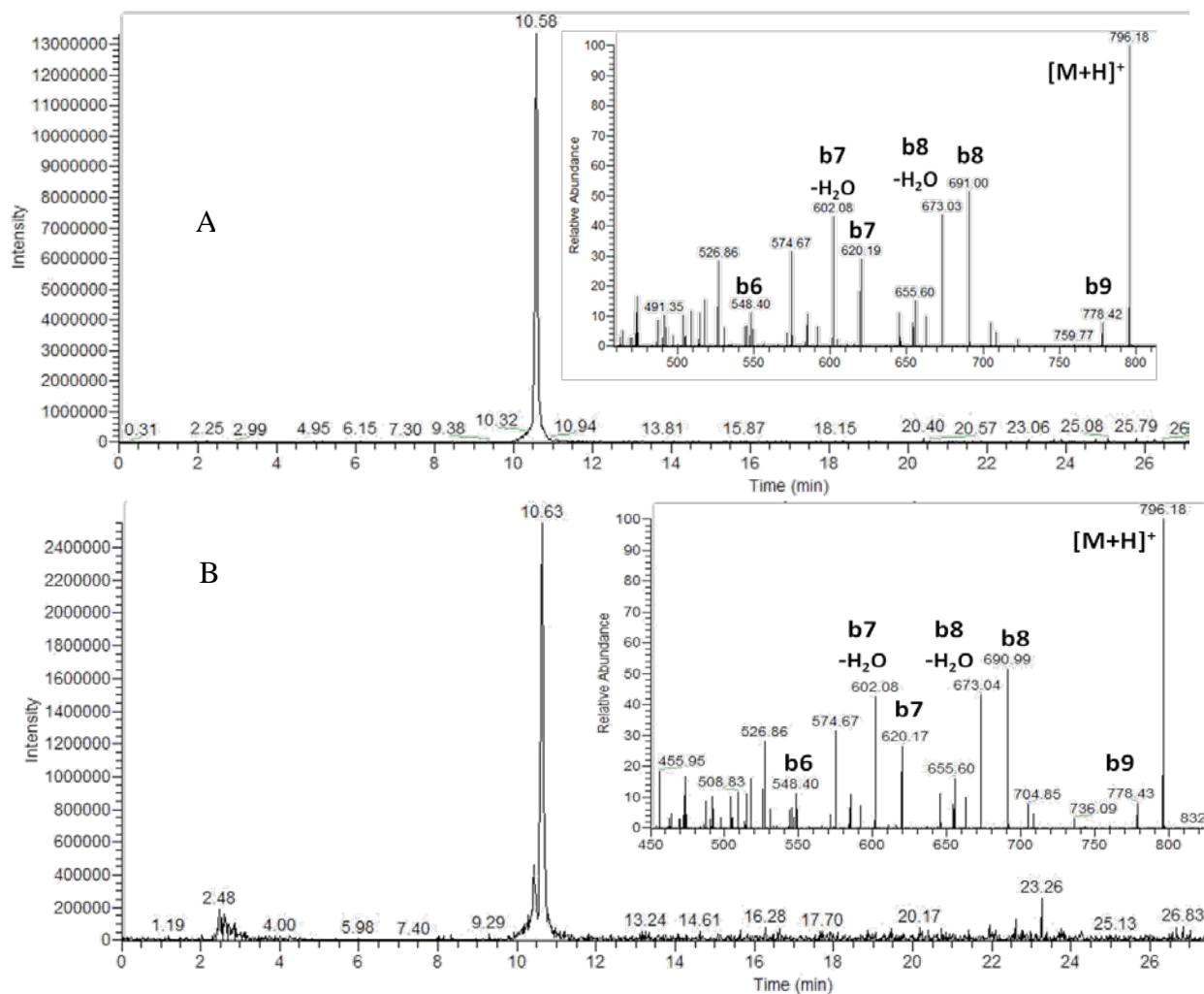


Figure 25. Extracted ion chromatograms and fragmentation spectra of the synthetic nonapeptide FGESAGAAS (m/z 796) (A) and of the nonapeptide resulting from the digestion of HuBuChE in solution (B).

3.2. Development of an optimized HuBuChE digestion on IMER

3.2.1. Choice of the support

As previously described, the choice of the immobilization support is a key parameter controlling the performance of IMER. Because pepsin is active at a low pH (1-3), a support with good chemical stability over this pH range was essential for the preparation of pepsin-based IMER. Sepharose gel is a beaded-form of agarose, a polysaccharide gel. It has been frequently used for protein immobilization including enzymes, and is stable over a large pH range (2-14). Moreover, this hydrophilic support avoids non-specific interactions that could

retain peptides in the IMER and would result in a lack of peptides for nanoLC-MS/MS. It also presents good chemical stability, allowing the reusability of the sorbent. From several sepharose phases (2B, 4B, 6B), Sepharose 4B was chosen for its 700 Å pore size suitable for the digestion of HuBuChE (140 Å). Indeed, as described by Gustavsson and Larsson [167], for a protein of “normal” size (60 Å) the pore diameter should be between three and five times the diameters of the protein to avoid restricted rates of diffusion. A pore size between 300 and 700 Å is usually a good compromise to provide fair diffusion rates and a large surface area. Therefore, three IMER were prepared by grafting 3 different amounts of pepsin on a CNBr-sepharose gel (4B) for the quantification and the optimization of HuBuChE digestion parameters.

3.2.2. Estimation of pepsin grafting yields on IMER

Various amounts of pepsin were introduced in the grafting solution (1.7 mg, 6.8 mg or 13.6 mg) to be immobilized on the CNBr-activated sepharose support (35 mg). The amount of effectively grafted pepsin was evaluated by the BCA assay as described in section 2.4. Figure 26 presents the amount of immobilized pepsin versus the amount of pepsin introduced in the grafting solution. As expected, an increase in the amount of pepsin in the grafting solution leads to a higher quantity of pepsin grafted on sepharose. A linear response was observed between the amounts of pepsin introduced and the pepsin grafted on IMER for amounts of pepsin ranging from 1.7 to 13.6 mg. The highest grafting density of pepsin was evaluated to 88 mg per gram of sepharose. The amount of immobilized pepsin did not reach a plateau, meaning that the capacity of the sepharose was certainly not reached using 1.7 mL of pepsin concentrated at 8 mg.mL⁻¹. However, it was not possible to estimate this capacity because the limit of solubility of pepsin in formic acid is close to this concentration (10 mg.mL⁻¹). The mean grafting yield of pepsin on CNBr-sepharose was evaluated to be 22%, a result close to those previously described for trypsin-IMER made with CNBr sepharose (20%) [160]. As a central point, the grafting of 6.8 mg of pepsin on 35 mg of CNBr sepharose was repeated 3 times and showed good repeatability of the grafting yields (R.S.D 11%). Thus, these values highlighted the repeatability of the grafting process.

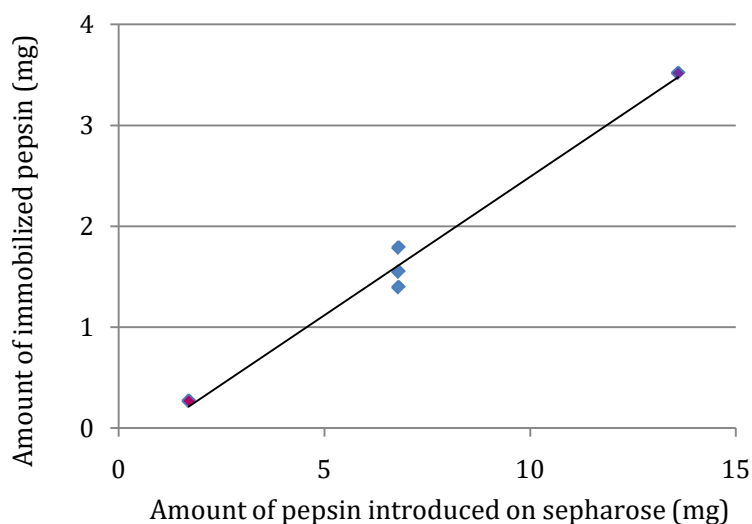


Figure 26. Amount of pepsin immobilized on 35mg of CNBr-activated sepharose grafted by 3 different amounts of pepsin in solution (1.7, 6.8 and 13.6 mg in 1.7 mL of coupling solution).

3.2.3. Optimization of the digestion procedure

According to the conditions of digestion that were applied by Cingoz *et al.* [160] for the digestion of cytochrome C on trypsin based IMER, the first digestion of HuBuChE₁ was made at ambient temperature (27°C) by digesting 5 µL of HuBuChE₁ on IMER 1.7. This IMER was grafted with 1.7 mg of pepsin with the same concentration used for the grafting of trypsin-IMER made by Cingoz *et al.* (1 mg.mL⁻¹). The HuBuChE solution was transferred from a 5 µL loop to the IMER 1.7 with a 30 µL formic acid solution (pH 2.2) at 50 µL.min⁻¹. After digestion by stop flow for 20 minutes, peptides were collected in two fractions of 100 µL of formic acid (pH 2.2) percolated at 50 µL.min⁻¹. Considering the volume of the IMER (37 µL) a volume of 100 µL ensured the total recovery of the peptides produced by HuBuChE digestion. Each 100 µL fraction was analyzed by nanoLC-MS/MS. No peptide was observed in the second fraction, indicating that 100 µL of formic acid was enough to recover the totality of peptides produced by HuBuChE digestion. The amount of nonapeptides recovered in this fraction has allowed evaluating a digestion yield of 14 ± 2% thanks to the nonapeptide calibration curves. This first result demonstrates the ability of the IMER to digest HuBuChE₁ without pretreatment despite the strong glycosylation of HuBuChE. However, to enhance the digestion yields, several parameters were evaluated and optimized.

3.2.3.1. Optimization of the transfer volume

Before optimization of the transfer volume, the first digestion was performed with a 30 μL transfer volume. This volume was estimated taking into account the volume of the loop (5 μL), the volume of connections tubes between the loop and the IMER (4.4 μL) and the volume of IMER (37 μL). The latter volume was evaluated by multiplying the volume of the 20 x 2 mm i.d. precolumn (62.8 μL) by a porosity value of 0.6. It was presumed from these values that the transfer volume should be at least superior to 9.4 μL and should not exceed 46.4 μL to digest the totality of HuBuChE in the solution. The volume of formic acid required to transfer HuBuChE from the loop to the IMER was evaluated with the digestion of 5 μL of HuBuChE₁ on IMER 1.7 using transfer volumes from 20 to 60 μL (20, 30, 40, 50 and 60 μL). HuBuChE₁ was again digested for 20 min (stop flow) at ambient temperature (27°C) and recovered in 100 μL of formic acid (pH 2.2). Each digest was injected 3 times into the nanoLC-MS/MS system. As shown in Figure 27, a transfer volume of 20 μL was not sufficient to push the totality of the HuBuChE solution to the IMER (yield of 6%). As expected, volumes above 50 μL resulted in a significant decrease of the digestion yield (from 12 to 7%) because HuBuChE solution exceeded the void volume of the IMER. Transfer volumes of 30 and 40 μL gave the best results (yields of respectively $14 \pm 2\%$ and $14 \pm 3\%$). A transfer volume of 30 μL , showing more repeatable digestion yields, was used for future HuBuChE digestions on IMER.

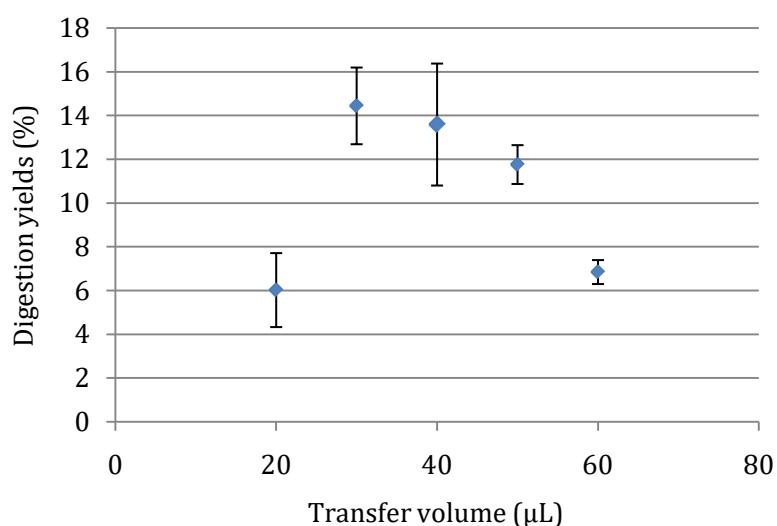


Figure 27. Influence of the transfer volume on the digestion yields of 7.1 pmol of HuBuChE₁ digested during 20 minutes at 27°C on IMER 1.7 prepared with 1.7 mg of pepsin (3 digestions).

3.2.3.2. Optimization of the temperature

Temperature is a key factor controlling the enzyme activity. Thus, optimization of the digestion temperature was evaluated by carrying out 4 digestions of HuBuChE₁ at 22, 27, 32 and 37°C on IMER 6.8. As IMER 6.8 contains an amount of pepsin that is approximately the average of the two extreme pepsin quantities grafted on IMER, this IMER was chosen for the optimization of the temperature. The IMER was set in an oven at the given temperature and 5 µL of HuBuChE solution was transferred to the IMER by 30 µL of formic acid and digested for 20 min. The resulting digest solutions were recovered in 100 µL of formic acid and the digestion yields were evaluated by nanoLC-MS/MS. Considering that in solution pepsin-digestion of HuBuChE generally occurs at 37°C, it was expected that this temperature will lead to the highest digestion yield. Nevertheless, the digestion yields were constant for the lowest tested temperatures and started to decrease from 32°C to drastically decrease at 37°C. Indeed, it was not possible to perform a digestion at 37°C because of the clogging of the IMER which leads to a high pressure when applying the 50 µL.min⁻¹ formic acid flow. This phenomenon can be explained by the inherent properties of the CNBr sepharose support having a gelling point of 37°C. A temperature of 27°C was then chosen for further experiments. The experiment was not reproduced on the others IMER to avoid their deterioration.

3.2.3.3. Optimization of the digestion time

To enhance the efficiency of the digestion, the contact time between the proteolytic enzyme and the protein can be increased by reducing or stopping the flow. It was reported that an efficient digestion of cytochrome C could occur on trypsin based-IMER with the use of a 20 min stop-flow [160]. Stop-flow digestions varying from 5 to 60 min were also performed by Carol *et al.* for the digestion of myoglobin on a trypsin-Poroszyme® column and showed no significant variation of peptides area when applying different digestion times [166]. After the deterioration of IMER 6.8 during the temperature optimization step, it was impossible to perform further digestions on this IMER. Then, to evaluate the best residence time of HuBuChE in the laboratory-made IMER, five digestions were made on a newly IMER prepared with 6.8 mg of pepsin. HuBuChE₁ was transferred to the IMER 6.8B with 30 µL of a formic acid solution at pH = 2.2 and digested at 27°C for 5, 10, 20, 30 and 60 min. The resulting digest solutions were recovered in 100 µL of formic acid (pH 2.2) and injected into

the nanoLC-MS/MS system. As illustrated in Figure 28, it turned out that a residence time of 5 min was sufficient to digest HuBuChE. Nevertheless, the most efficient and repeatable digestions were obtained for a 20 min digestion time with a digestion yield of $13 \pm 1\%$. Unexpectedly, the digestion yields decrease from 30 min to 60 min. This may be due to the occurrence of non-specific digestion of the nonapeptide by pepsin, leading to further cleavage and smaller peptides than those expected. In conclusion, the optimal conditions for HuBuChE digestions on IMER were defined as a transfer volume of $30 \mu\text{L}$, a temperature of 27°C and a digestion time of 20 minutes.

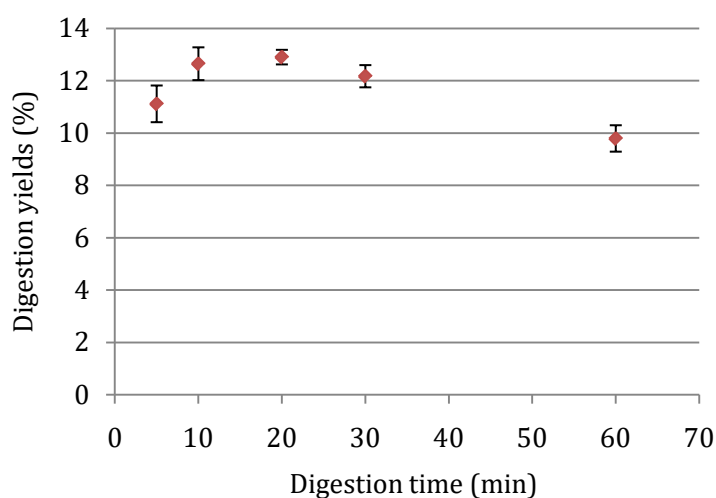


Figure 28. Influence of the digestion time on the digestion yields of 7.1 pmol of HuBuChE₁ digested at 27°C on IMER 6.8B prepared with 6.8 mg of pepsin with a transfer volume of $30 \mu\text{L}$ (3 digestions).

3.3. Repeatability of IMER digestion

As the optimized digestion parameters were fixed, the reproducibility of IMER digestions were evaluated with the comparison of digestion yields obtained using three different IMER prepared by the grafting of 6.8 mg of pepsin on 35 mg CNBr-activated sepharose. The evaluation of pepsin grafting yields on these IMER was already discussed in section 3.2.2 and showed a good repeatability of the grafting process. Three digestions were carried out the same day on each IMER with a new solution of HuBuChE called HuBuChE₂ (480 μg of lyophilized HuBuChE diluted in 1mL of PBS pH 7.4, 160 U/mg). As shown in Figure 29, a digestion yield of $20 \pm 3\%$ was obtained for the digestion of HuBuChE₂ on IMER 6.8 whereas digestion yield on this IMER was previously evaluated to $13 \pm 1\%$ for the digestion of HuBuChE₁ (section 3.2.3.3). This variation could be explained by the different

origins of HuBuChE solutions. Indeed, as described Section 2.1, HuBuChE₁ was purchased from Sigma Aldrich with a specific activity of 50 U/mg, whereas HuBuChE₂ was purchased from Mybiosource with a specific activity of 160 U/mg. In addition, the purification and lyophilization steps used by each supplier are not communicated and could differ. Thus, it seemed crucial to use the same HuBuChE solution to compare the digestion yields of HuBuChE on each IMER and to check the intermediate precision of IMER synthesis. As illustrated in Figure 29, it was difficult to estimate the repeatability of the synthesis by simply comparing the mean digestion yields and standard deviations obtained using the 3 IMER. Consequently, a Cochran test was first used and showed no significant variance between IMER, which enabled us to perform an ANOVA test ($\alpha = 5\%$). The conclusion of this test demonstrated that there is no significant variation between the 3 IMER and the R.S.D. value of the intermediate precision was evaluated at 16%. The variations of the digestion yields resulting from the analytical system were compared to those resulting from the digestion combined with the analytical system. Three digests of HuBuChE₂ digested on IMER 6.8 during 20 min at 27°C were each injected one time for analysis (R.S.D. 13%) while one of these digests was injected 3 times (R.S.D. 10%). Similar R.S.D values were obtained, indicating that the main variations were due to the nanoLC-MS² analysis. Therefore, it was concluded that a repeatable method was developed for the synthesis and the digestion of HuBuChE on IMER.

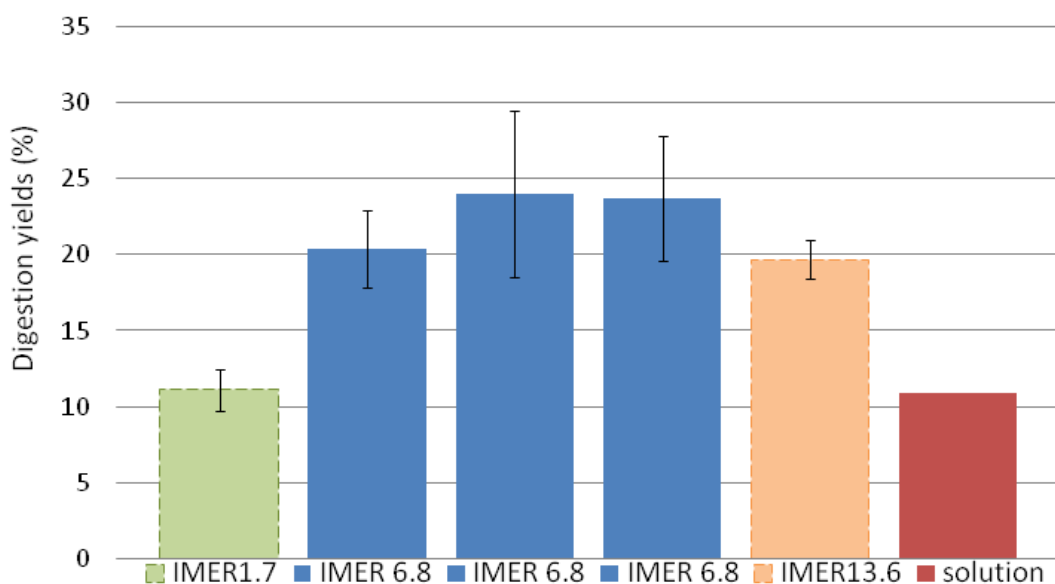


Figure 29. Digestion yields obtained after the digestion of 7.1 pmol of HuBuChE₂ by pepsin in solution (E/S: 10) at 37°C during 2 h (1 digestion) and obtained after the digestion at 27°C of 7.1 pmol of HuBuChE₂ during 20 min on 3 IMERs prepared with 6.8 mg of pepsin and one IMER prepared with 13.6 mg of pepsin (3 digestions each).

3.4. Effect of the amount of pepsin on digestion yields

As depicted sections 3.2.3.1 and 3.2.3.3, digestions of HuBuChE₁ on IMER 1.7 and IMER 6.8 respectively prepared with 1.7 mg and 6.8 mg gave similar digestion yields ($14 \pm 2\%$ and $13 \pm 1\%$). Nevertheless, it seemed interesting to evaluate if a higher amount of pepsin (> 6.8 mg) could lead to higher digestion yields. Consequently, 3 digestions were carried out on IMER 13.6. As illustrated Figure 26 and section 3.2.2., IMER 13.6 contained a higher quantity of immobilized pepsin than IMER 1.7 and IMER 6.8. Considering this information, it could be expected that IMER 13.6 would lead to higher digestion yields of HuBuChE than IMER 6.8 when applying the same conditions of digestion. Hence, digestion yields on IMER 6.8 and IMER 13.6 were compared by digesting 5 μ L of HuBuChE₂ ($n = 3$) according to the optimal digestion conditions (Section 3.2.3.3). As shown in Figure 29, similar digestion yields were obtained for IMER 6.8 and IMER 13.6 (20%), showing that 6.8 mg of pepsin was enough for an efficient digestion of HuBuChE₂ in 20 minutes. It was assumed that beyond a certain threshold, the pepsin density was too high, leading to a low accessibility of the active site of the protease. To confirm the benefit of IMER-digestions over

digestion in solution, 5 μ L of HuBuChE₂ were digested during 20 minutes at 37°C with a ratio E/S of 10 as commonly used in the literature for HuBuChE digestion in solution [15, 54] and described section 2.5.1. A digestion yield of 11% was obtained. It can be concluded that the yields obtained for HuBuChE₂ digestion on IMER in 20 min is 2 times higher than the yield obtained for a 2 hour digestion in solution. Indeed, while E/S of 10 was used for digestion in solution, by immobilizing pepsin we can report E/S > 4000 for IMER digestion. Thus, the use of IMER leads to faster and more efficient digestions of HuBuChE than in solution digestions. As a comparison, Carol-Visser *et al.* estimated that the yield of adduct nonapeptide from a 5 minutes on-line pepsin digestion of HuBuChE on poroszyme pepsin cartridge was approximately 70% of those obtained after 2 hours digestion in solution [57]. Therefore, the optimization of the HuBuChE digestion parameters on IMER enabled us to obtain better results than those described for the use of commercial pepsin-IMER. In conclusion, we have demonstrated the potential of laboratory made pepsin-IMER for fast and efficient HuBuChE digestion compared to in-solution digestion and commercial IMER.

4. Conclusions

A highly sensitive nanoLC-MS/MS method was developed for the analysis and quantification of the HuBuChE nonapeptide which is used as a biomarker of nerve agent intoxication. The sensitivity of the analytical system was demonstrated by the analysis of a synthetic nonapeptide and of a HuBuChE digest. Its limit of quantification was estimated to a few attomoles. HuBuChE digestions were carried out on reusable IMER and without pretreatment despite the strong glycosylation of HuBuChE. The yields of HuBuChE digested on IMER were quantified using the synthetic nonapeptide as calibrant and digestion yields up to 20% were obtained after 20 minutes. The repeatability of IMER synthesis was evaluated with the development of 3 similar IMER that showed similar grafting and digestion yields. Various parameters such as the transfer volume, the temperature and the digestion time were optimized. Finally, HuBuChE digestion yields on IMER were compared to those in solution and proved their superiority in term of digestion yields and digestion times.

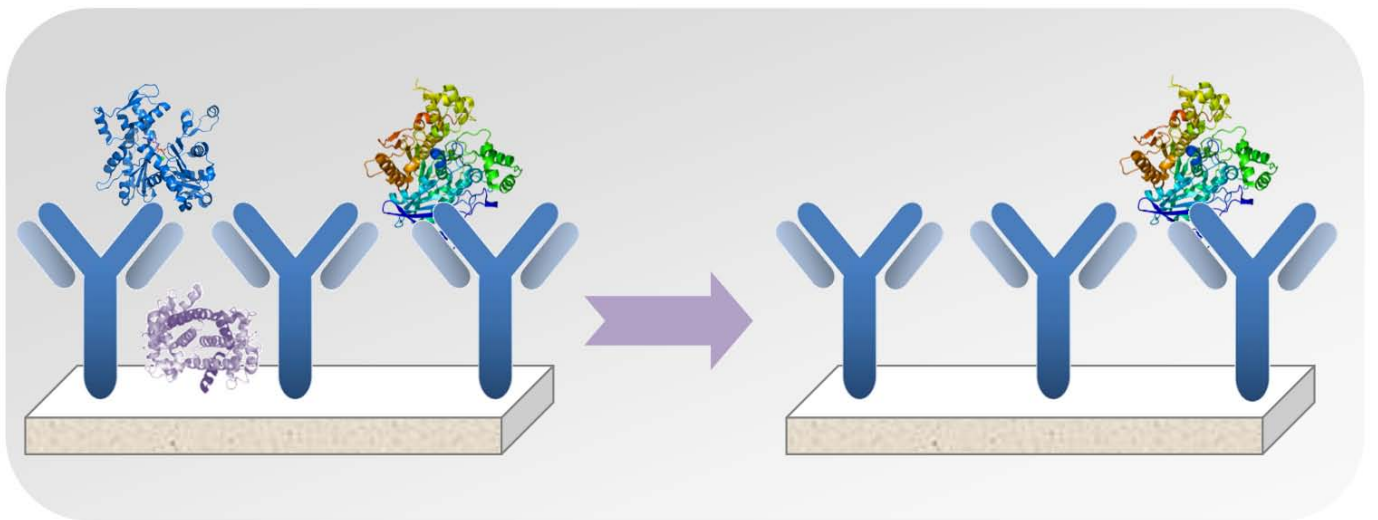
Our future work will be focused on the on-line coupling of IMER to LC-MS/MS analysis. At last, an antibody-based support will be developed to extract HuBuChE from plasma, allowing the on-line analysis of HuBuChE.

Acknowledgment

The authors would like to thank the Direction Générale de l'Armement (DGA) for its financial support and James Oliver for providing language help.

CHAPITRE IV

IMMUNOEXTRACTION COUPLEE A LA DIGESTION SUR IMER POUR L'ANALYSE EN LIGNE DE LA BUCHE PLASMATIQUE



Chapitre IV : Immunoextraction couplée à la digestion en ligne pour l'analyse de la BuChE plasmatique

1. Stratégie analytique

Lors du chapitre précédent, une méthode de digestion rapide, efficace et répétable a été appliquée à la BuChE, grâce à l'utilisation et à l'optimisation de supports d'enzymes immobilisées (IMER). En plus d'être plus rapides et plus performants que la digestion en solution les IMER présentent l'avantage d'être réutilisables et de pouvoir être couplés en ligne à l'analyse LC/MS, ce qui a été étudié et fait l'objet de ce chapitre. Une étape d'immunoextraction a également été développée et optimisée, afin d'extraire sélectivement la BuChE du plasma avant sa digestion et son analyse en ligne. Pour cela, trois supports immunoabsorbants (IS) ont été synthétisés afin de d'évaluer l'affinité de trois anticorps dirigés contre des épitopes différents de la BuChE. Deux catégories d'IgG ont été utilisées : les anticorps monoclonaux et polyclonaux. Pour rappel, les anticorps monoclonaux ont la particularité d'être tous identiques, et ainsi d'être tous spécifiques d'un même épitope de la protéine. A contrario, les anticorps polyclonaux sont constitués d'un mélange d'anticorps, dont seulement 5 à 10 % sont spécifiques de la protéine. Malgré cela, l'utilisation d'anticorps polyclonaux a tout de même été envisagée puisque ces anticorps sont moins coûteux car plus simples à produire que les anticorps monoclonaux.

2. Choix des supports

Le potentiel de la sépharose en tant que support de greffage a été confirmé lors du chapitre précédent, pour l'immobilisation covalente de la pepsine. Cependant, étant donné le diamètre important de la BuChE (140 Å) par rapport à la taille de pores relativement restreinte de la sépharose (700 Å) [167], l'utilisation d'un support présentant une taille de pores supérieure a été envisagée. Ainsi, les propriétés d'une grande variété de supports ont été étudiées pour envisager le greffage des anticorps anti-BuChE. La comparaison des différentes caractéristiques de chaque support en termes de taille de pore, de groupements réactifs disponibles, de stabilité et de coût (Tableau 6), a permis de choisir la résine de polyméthacrylate époxy 65 µm, vendue sous l'appellation Toyopearl, en tant que support de greffage. Ce support à base de polyméthacrylate présente une taille de pores élevée

(> 1000 Å) ainsi qu'une bonne stabilité à pH acide. De plus, il est hydrophile, ce qui limite les interactions non spécifiques. Il est également peu coûteux : en considérant que 30 mg de résine sont nécessaires pour remplir une précolonne (20 x 2 mm d.i.), le coût du support immunoabsorbant revient à moins de 1 dollar. Finalement, les groupements époxy, largement utilisés pour le greffage de biomolécules, ont été choisis pour leurs conditions douces de greffage, la simplicité de la réaction, la versatilité du greffage (immobilisation du ligand par groupement amine, thiol, et/ou hydroxyle) et la stabilité de la liaison covalente entre la matrice et le ligand. Les conditions de greffage du support Toyopearl® époxy sont indiquées Figure 30.

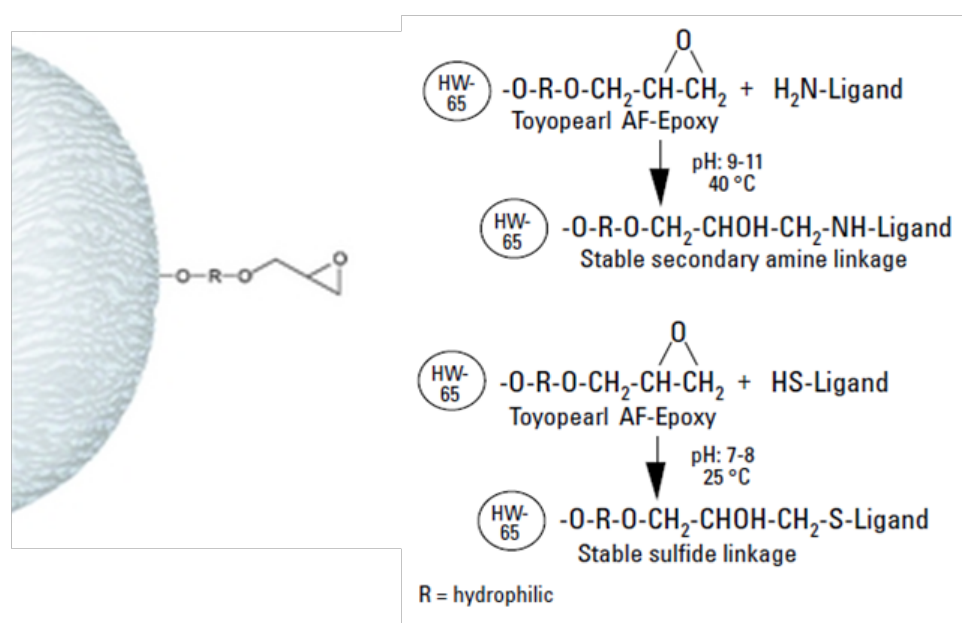


Figure 30. Schéma du greffage de biomolécules sur la résine en fonction du pH et de la température.

Un protocole de greffage des anticorps anti-BuChE sur le a donc été développé en complément du greffage des anticorps sur sépharose afin de comparer la performance de ce support à celui de sépharose, notamment en termes de taux de greffage et de rendements d'extraction.

L'ensemble de ces travaux sont présentés sous forme d'un article soumis à Journal of Chromatography A, (08 juin 2017).

Tableau 6. Comparaison des différents supports pouvant être utilisé pour le greffage d'anticorps

Nom	Support	Groupements	Particules	Pores	Stabilité	Coût	Avantages	Inconvénients
Toyopearl (TOSOH)	Polyméthacrylate	Tresyl Epoxy Formyl Amino Carboxy	65 µm	1000 Å	Tresyl : - Formyl : 6-9 Amine : 2-13 Carboxy : 2-13 Epoxy : 2-12 P° max: 3 bars	Epoxy : 31 \$/g (1 g = 32 supports)	Accessibilité Coût	- Pas de publication concernant le greffage d'anticorps
POROS (Thermo)	Polystyrene divinyl benzene	Aldehyde Epoxy (spacer 2 atomes)	20 µm	500-10000 Å	Aldéhyde : 1-14 Epoxy : 3-9 P°>170 bars	Aldéhyde: 516 €/g Epoxy : 493 €/g (1g = 28 supports)	-Très bonne stabilité -Procédure de greffage détaillée	-Moins hydrophile que polyméthacrylate -Faible aire de surface (pores 10000Å)
Dynabeads (Thermo Fisher)	Bille magnétique (hydrophile ou hydrophobe)	- Epoxy, - Tosyl, - Acide carboxilique, - Amine -Proteine G	1-4,5 µm	-	- 4-37°C - pH 2,8-8,1	5000€/g + support magnétique : 373€	-Accessibilité -Peu d'interactions non spécifique -Greffage orienté des anticorps (Fc binding)	- Achat du support magnétique - Couplage en ligne impossible
CIM (Bia-separations)	Monolithe, (GMA-EDMA)	- Epoxy -carboxy -diimidazole -éthylène-diamine -Hydrazide	-	Macropores (1-12µm) et mésopores (2-50 nm)	-	Disque : Epoxy 280 €/mL	-Accessibilité - Stabilité (P°) -Choix des pores (composition en porogène)	-Faibles taux greffages - Coût - Procédure immobilisation
Silice (Chromolith)	Monolithe	A greffer	-	Macro (2µm) + mésopores (13 nm)	pH 2-7,5	Non communiqué	- Accessibilité -Bonne résistance mécanique	-Groupements à greffer, -Faible stabilité (température fonctionnalisation)
Protein-pack Epoxy Waters	Silice	Epoxy (spacer 7 atomes)	40 µm	500 Å	pH 2-9,5	10 €/g (1 g = 28 supports)	- Spacers (+ de sites disponibles) -Hydrophile -Accessibilité (pores) -Bonne résistance mécanique -Résistance microbienne	-pH stabilité -Spacer (adsorption non spécifique) -Taille de pore restreinte
Silice Davisil (Grace)	Silice	-Cyano -Diol -Amine	10-200 µm	250-4500 Å	pH 2-8	Non communiqué	-Large choix de taille de pores et particules - Accessibilité -Bonne résistance mécanique	- Groupements à greffer - Faible stabilité à pH 2 -Vendu par 1 kg

Article 2: Development of immunosorbents coupled on-line to immobilized pepsin reactor and microLC-MS² for analysis of butyrylcholinesterase in human plasma

Maud Bonichon¹, Audrey Combès¹, Charlotte Desoubries², Anne Bossée², Valérie Pichon^{1,4}

¹ Department of Analytical, Bioanalytical Sciences and Miniaturization (LSABM), UMR CNRS-ESPCI Paris, CBI 8231, PSL Research University, ESPCI Paris, 10 rue Vauquelin, Paris, France

² DGA, CBRN Defence, 5 rue Lavoisier, Vert-le-Petit, France

³ UPMC, Sorbonne University, 4 place Jussieu, Paris, France

Abstract

Human butyrylcholinesterase (HuBuChE) has been widely used as a biomarker of exposure to organophosphorus (OPs) warfare agents. Indeed, intoxication by OPs can be proven by LC-MS² analysis of a specific HuBuChE nonapeptide on which OPs covalently bind. Therefore, we developed a fast, selective and sensitive on-line set-up for the analysis of HuBuChE from plasma that combines immunoextraction by anti-HuBuChE antibodies, pepsin digestion on Immobilized Enzyme Reactors (IMER) and microLC-MS² analysis of the target nonapeptide, FGESAGAAS.

Two pepsin-based IMER were prepared and characterized in terms of grafting and digestion yields and were coupled on-line to microLC-MS² analysis. In addition, immunosorbents were prepared by covalent grafting of three anti-HuBuChE antibodies on CNBr-sepharose and epoxy-polymethacrylate supports and packed in precolumns. The best antibody grafting yields were obtained with sepharose-based supports, with grafting yields up to 98%. B2 18-5 monoclonal antibody grafted on sepharose led to the best immunosorbent, with HuBuChE recovery higher than 85%. The immunosorbent was introduced upstream of the on-line digestion set-up and immunoextraction of HuBuChE was achieved in 14 min while digestion was performed in 20 min, allowing detection of the target nonapeptide in less than 1 hour. The global recovery of the nonapeptide was higher than 42 % using the best immunosorbent with a RSD value lower than 5% (n = 3). Finally, the limit of quantification evaluated in plasma sample was 2 fmol of nonapeptide. This value, corresponding to 0.5 fmol

of HuBuChE tetramer, is well below the average amount of HuBuChE tetramer in 50 μL of plasma (590 fmol).

1. Introduction

Human butyrylcholinesterase (HuBuChE, UniProt accession P06276) is a serine hydrolase present in plasma [51, 139]. It is a tetrameric glycoprotein composed of four identical subunits (85 kDa) with a molecular weight of 340 kDa. The tetrameric form, that is made of two dIMER, is the predominant form in plasma (95%) [174, 175]. HuBuChE is known as a scavenger protein that protects the cholinergic system against acetylcholinesterase poisons [40]. HuBuChE can covalently bind to organophosphorus compounds (OPs) including pesticides and chemical warfare agents such as sarin [53, 57, 140, 141], soman [53, 141, 142], tabun [53, 142, 143] or VX [17, 141]. The high reactivity of HuBuChE with OPs makes HuBuChE a good biomarker of OP exposure. Indeed, the binding of OP nerve agents to serine 198 of the HuBuChE active site allows retrospective detection of HuBuChE-OP adducts in blood for as long as 16 days after exposure when OP urinary metabolites are no longer detectable [147]. The detection of these adducts is usually performed after digestion by pepsin, commonly over 2 hours. Pepsin digestion produces small peptides, including the nonapeptide FGESAGAAS, covalently bound to OP, that is further analyzed by liquid chromatography tandem mass spectrometry (LC-MS²) [54, 148]. However, as the pepsin is free in solution, autoproteolysis can occur, generating peptides that can interfere during LC-MS analysis of the nonapeptide. To overcome this drawback, we recently developed pepsin-based immobilized enzyme reactors (IMER) [176]. These supports were prepared by grafting pepsin on a CNBr-activated sepharose phase, and were packed in precolumns (20 x 2 mm i.d.). Optimization of the HuBuChE digestion parameters on IMER enabled us to get lower digestion times and higher digestion yields than those obtained in solution [54, 148, 177] or using commercial pepsin-IMER [57]. Indeed, IMER allowed efficient digestion of HuBuChE in only 20 min, without pretreatment, while minimizing sample contamination during handling and avoiding pepsin autoproteolysis. Moreover, these supports can be reused [149, 176] and can also be directly coupled to LC-MS [57, 171].

Human plasma contains about 4 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ of HuBuChE, while other proteins such as albumin can be 10000 times more concentrated [40, 87]. Hence, it is essential to extract HuBuChE from highly concentrated proteins in plasma before digestion and analysis by LC-

MS to avoid ion suppression. Current purification methods are based on HuBuChE extraction from plasma by procainamide [7, 49, 53, 174] or antibodies immobilized on magnetic beads activated with streptavidin or protein G [14, 18, 101, 104, 178]. Procainamide gels are relatively cheap but not selective enough, implying the need of additional purification steps, which extends the extraction time and reduces the total recovery of the method [46, 174]. Purification of HuBuChE by immunomagnetic beads is more specific than the procainamide approach and requires smaller amounts of plasma. In most protocols, HuBuChE is directly digested on the immunomagnetic beads in contact with the protease, which involves the use of a new batch of antibodies for each sample since they are also digested [17, 18, 104, 147, 178]. The digestion step leads to peptides derived from HuBuChE but also from antibodies, protein G, protease by self-digestion and thus to numerous peptides that could affect the mass spectrometry response of the target peptide adducts. To reduce the presence of unwanted peptides, an elution step can be applied to release HuBuChE from the beads by acetic acid prior to digestion [14, 52, 101]. However, these extraction methods are based on a partition phenomenon between HuBuChE and antibodies, which induces long extraction times, varying from 2 h to 18 h. Besides, none of these studies mentioned the regeneration of the antibodies and thus the reusability of the beads, nor the repeatability of the grafting and the extraction processes. In the current work, we developed an alternative approach that consists in packing covalently grafted antibodies into a precolumn to extract HuBuChE by solid phase extraction (SPE). SPE is faster than adsorption by partition, and can be easily automated. Moreover, the washing step is easier to optimize as it can be directly monitored by UV detection by on-line coupling of the immunosorbent (IS) to the UV detection system [171]. After immunoextraction, regeneration of the antibodies allows to reuse the IS for months and thus to reduce the cost of the extraction procedure. In addition, IS can be directly coupled on-line to digestion on IMER and to LC-MS analysis, which avoids sample loss and contamination and allows automation of the whole analytical procedure. Among different grafting supports available for antibody immobilization, like silica [90, 179], polystyrene divinyl benzene [180], glycidyl methacrylate-co-ethylene glycol dimetacrylate (GMA-EDTA)[80, 81] or magnetic beads [18, 96, 147, 178], two supports, i.e. epoxy activated polymetacrylate resin [181] and CNBr activated sepharose [171, 182] were chosen. Sepharose is an agarose gel that has been widely used for antibody immobilization [4, 52, 171, 182]. It displays several advantages such as good chemical stability covering a wide range of pH (2-9) and a relative hydrophilicity that minimizes non specific interactions between sepharose and hydrophobic

proteins. Its 700 Å pore size provides high capacity and relatively good accessibility of target molecules to the pores. Polymethacrylate resin was also chosen as grafting support for its high pore size (> 1000 Å), which allows proteins with high molecular weight and diameter like HuBuChE (140 Å) to easily access the antibodies bound inside the pores. It also has low cost and good stability at low pH, which is crucial regarding the acidic condition applied on IS during the elution step.

Until now, no research group reported the use of an immunosorbent coupled on-line to an IMER for the total on-line analysis of HuBuChE-OP adducts from plasma. Three anti-HuBuChE antibodies directed against three different epitopes of HuBuChE were immobilized on CNBr sepharose or on epoxy resin supports and packed in precolumns. The resulting IS were first characterized in terms of antibody grafting yields. HuBuChE extraction yields were then evaluated for each support by LC/UV. Similar IMER to those developed and optimized in our previous study were synthesized and packed in precolumns of different sizes, by immobilizing pepsin on CNBr sepharose supports [176] and were coupled on-line to microLC-MS analysis. Finally, the best immunosorbent was integrated to the analytical system including the IMER coupled on-line with the microLC-MS analysis and the set-up was applied for analysis of HuBuChE in plasma.

2. Experimental

2.1. Chemicals

Pepsin from porcine gastric mucosa, sodium azide (NaN_3), sodium chloride (NaCl), Trizma hydrochloride ($\text{NH}_2\text{C}(\text{CH}_2\text{OH})_3$, HCl), human serum albumin, cyanogen bromide-activated Sepharose 4B (90 μm , 700 Å), Toyopearl[®] AF-Epoxy-650M Bulk Media (65 μm , 1000 Å) were purchased from Sigma Aldrich (Saint-Quentin Fallavier, France). Potassium dihydrogen phosphate (KH_2PO_4), di-sodium hydrogen phosphate dihydrate ($\text{Na}_2\text{HPO}_4(2\text{H}_2\text{O})$), sodium bicarbonate (NaHCO_3) sodium acetate ($\text{CH}_3\text{CO}_2\text{Na}$), acetic acid (CH_3COOH), formic acid (HCOOH), glycine, hydrochloric acid and acetonitrile (ACN) were purchased from VWR (Fontenay-sous-Bois, France). Sodium hydroxide was purchased from Merck (Darmstadt, Germany). HPLC-grade acetonitrile was ordered from Carlo Erba (Val de Reuil, France). High purity water was obtained from a Milli-Q purification system (Millipore,

Saint Quentin en Yvelines, France). Human plasma was obtained from the Centre de Transfusion Sanguine des Armées (Clamart, France).

Polyclonal antibodies N-15 (sc46803 goat polyclonal to the N-terminal of HuBuChE) and C-18 (sc46801 goat polyclonal to the C-terminal of HuBuChE) were purchased from Santa Cruz Biotechnology (Dallas, Texas, USA). Mouse monoclonal B2 18-5 [87] was provided by Prof. Oksana Lockridge (University of Nebraska Medical Center, Omaha). Mouse IgG from serum (I5381) was purchased from Sigma-Aldrich.

HuBuChE, (670 μg of lyophilized HuBuChE with 0.02 mol.L^{-1} ammonium bicarbonate, 200 U.mg^{-1} , MBS173030) obtained by the purification of human serum, was purchased from Lee Biosolutions (Maryland heights, Missouri, USA). Synthetic nonapeptide (FGESAGAAS, MW: 795.3 g.mol^{-1}) was obtained from Proteogenix (Schiltigheim, France). Bicinchoninic acid (BCA) assay reagents and tryptic cytochrome C digest (16 nmol.mL^{-1} in water) were from Thermo Fisher Scientific (Illkirch, France).

The phosphate buffer saline solution (PBS, pH 7.4) consisted of 0.01 mol.L^{-1} of both Na_2HPO_4 and KH_2PO_4 and 0.15 mol.L^{-1} of NaCl. The PBS-azide solution is a solution of PBS with 0.1% (w/w) of NaN_3 . Pepsin solutions were prepared in saline sodium acetate solution ($\text{CH}_3\text{CO}_2\text{Na}$, 0.1 mol.L^{-1} , pH 5.8, NaCl 0.5 mol.L^{-1}).

2.2. MicroLC-MS analysis

The microLC-MS analytical system was composed of a micro-pump (Dionex Ultimate 3000, controlled by Chromeleon 6.8 SR11) interfaced with a triple quadrupole mass spectrometer (TSQ Quantum Access MaxTM, Thermo Scientific) assembled with an ESI source (IonMax source, probe HESI-II). The analytical column was an Acclaim PepMap 100 (C18, $150 \times 1 \text{ mm I.D.}$, $3 \mu\text{m}$, 100 \AA Thermo Scientific), preceded by a Hypersil Gold trap column (C18, $10 \times 1 \text{ mm I.D.}$, $5 \mu\text{m}$, Thermo Scientific). The synthetic nonapeptide at 8.6 nmol.mL^{-1} in formic acid ($5 \mu\text{L}$) was mixed with $10 \mu\text{L}$ of a tryptic digest of cytochrome C at 16 nmol.mL^{-1} and this solution was used to optimize the separation conditions in scan mode (m/z from 300 to 1500). The mobile phase was water and acetonitrile both acidified with 0.1% formic acid and delivered at a flow rate of $50 \mu\text{L.min}^{-1}$. The separation of peptides was achieved by increasing the amount of acidified acetonitrile from 2% to 90% in 20 min. The scan time was set to 500 ms and ionization was performed in positive mode with the following source conditions: source voltage was set at 3000 V,

capillary temperature at 250 °C, vaporizer temperature at 80 °C, sheath gas and auxiliary gas pressures at 10, tube lens offset at 70 V and skimmer offset at 0 V. Peptides resulting from HuBuChE digestion on IMER were analyzed by microLC-MS². The three most intense b-fragments of the nonapeptide, b₈, b_{8-H₂O} and b_{7-H₂O}, were followed in MRM mode (*m/z* 796.3→691.3; 796.3→673.3; 796.3→602.3 respectively) between 0 min and 19.3 min using a fragmentation voltage of 30 eV. These transitions were used to quantify the amount of nonapeptide resulting from HuBuChE digestion with or without a previous immunoextraction step. For this purpose, calibration curves were established for each MRM transition by injecting 5 μL of different concentrations of a synthetic nonapeptide (6.8, 33.8, 67.5, 338, 675, 1688 and 3375 ng.mL⁻¹) into the microLC-MS² system. The concentration range was adjusted depending on the amount of HuBuChE digested and new calibration curves were regularly made to take into account mass spectrometry variations. To evaluate non specific interactions resulting from the percolation of plasma on immunosorbents, the most intense albumin peptide (LGMF *m/z* = 468) was followed by Single Ion Monitoring (SIM) between 19.3 min and 21.7 min. This peptide was chosen after the digestion on IMER of a commercial human serum albumin solution and it was analyzed by microLC-MS in scan mode (*m/z* between 300 and 1500), using the same gradient and mass spectrometry source parameters described above.

2.3. Preparation of the immunosorbents

2.3.1. Sepharose-based immunosorbents

The grafting of the N-15, C-18 and B2 18-5 antibodies on sepharose was achieved according to the procedure already developed in our laboratory [171]. Briefly, 35 mg of CNBr activated sepharose was swollen in 1 mL of HCl (1 mmol.L⁻¹) for 15 min and washed twice with a solution containing NaHCO₃ (pH = 8.3, 0.1 mol.L⁻¹) and NaCl (0.5 mol.L⁻¹). Then, 100 μg of anti-HuBuChE antibodies diluted in 100 μL of PBS (pH = 7.4, 0.1 mol.L⁻¹) were incubated with sepharose for 24 h at 4 °C, while stirring at 4 rpm. The resulting sorbent was packed into a precolumn (20 x 2 mm I.D.). The precolumn was connected to a pump (LC-10 AS, Shimadzu) and the remaining uncoupled sites of sepharose were blocked by percolating a Tris buffer solution (pH = 8, 0.1 mol.L⁻¹) at 400 μL min⁻¹ for 2 h at room temperature. Then, the sorbent was alternatively washed 3 times at 400 μL min⁻¹ with 4 mL of acetate buffer (0.1 mol.L⁻¹ + NaCl 0.5 mol.L⁻¹, pH = 4) and NaHCO₃ buffer (0.1 mol.L⁻¹ +

NaCl 0.5 M, pH = 8.3) to remove unbound antibodies. The immunosorbents were stored at 4 °C in a PBS-azide solution and were called N-15_{SP}, C-18_{SP} and B2 18-5_{SP}.

2.3.2. Epoxy resin-based immunosorbents

To determine the optimal conditions of grafting on the epoxy resin, twelve vials containing 30 mg of epoxy resin were each swollen in 1 mL of H₂O and stirred at 4 rpm for 15 min. The supernatant was removed and 1 mL of PBS buffer (pH = 7.4) or borate buffer (pH = 8, 8.5 or 9) was added. This step was repeated 3 times. Then, 100 µg of mouse IgG from serum (Sigma-Aldrich, I5381) diluted in 100 µL of PBS buffer (pH = 7.4) or borate (pH = 8, 8.5 or 9) were added to the epoxy resin. For each value of pH, three samples were prepared. One sample was stirred at 4 °C, a second at 25 °C and the last one at 37 °C, for 72 h. To evaluate the amount of antibodies grafted on the epoxy resin, 10 µL of supernatant were collected from the 12 vials every 24 h and quantified by BCA assay.

After optimization of the grafting conditions with mouse IgG from serum, B2 18-5 antibodies were grafted on the swollen epoxy resin by introducing 100 µg of B2 18-5 antibody diluted in 100 µL of PBS buffer (pH = 7.4). After 24 h of stirring at 25 °C, the grafted resin was filled in a precolumn (20 x 2 mm I.D.) and washed with ethanolamine for 6 h at 100 µL.min⁻¹ to block the remaining uncoupled epoxy sites. PBS buffer (pH = 7.4), followed by a solution of NaCl (1 mol.L⁻¹) and PBS buffer (pH = 7.4) were percolated through the precolumn at 400 µL.min⁻¹ for 20 min to remove unbound antibodies. The resulting immunosorbent, called B2 18-5_{ER}, was stored at 4 °C in a PBS-azide solution.

2.3.3. Quantification of antibodies grafted on sepharose and epoxy resin

A BCA assay was performed to quantify the antibodies remaining in the supernatant after grafting and thus to evaluate the amount of antibodies immobilized on sepharose and epoxy resin. Antibodies were available in small amount because of their high cost. It was therefore not possible to make calibration curves to quantify the amount of grafted antibodies. Consequently, the absorbance corresponding to 10 µL of the initial solution of antibodies was used as reference value and was compared to the absorbance of 10 µL of supernatant containing the unbounded antibodies remaining after grafting (in triplicate). Then, 10 µL of supernatant was added in triplicate and 100 µL of working reagent (mix of bicinchoninic acid and Cu²⁺) was added in each microwell. The microplate was incubated at 37 °C for 30 min with stirring at 300 rpm. Absorbance was measured at 562 nm with a spectrophotometer

(SpectraMax M2, Molecular Devices, St Gregoire, France). The grafting yields were calculated by dividing the absorbance of antibodies remaining in the supernatant by the absorbance of the solution used for the grafting.

2.4. Immunosorbents coupled to UV detection

The immunoextraction procedure was first carried out on a set-up composed of two connected switching valves: one carries a 5 μL injection loop and is linked to the pump while the other carries the IS, connected to the UV detector (Figure 31).

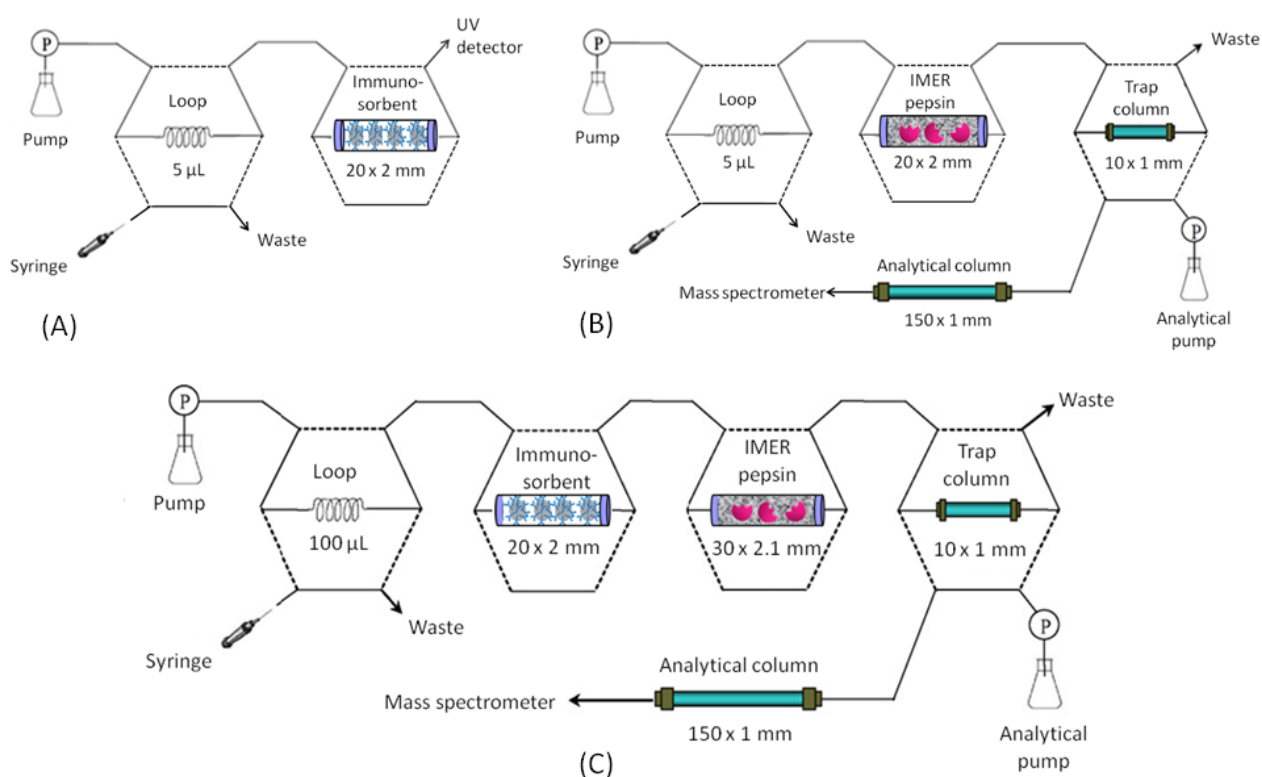


Figure 31. Set-up used for the immunoextraction of 5 μL of HuBuChE solution on the immunosorbents (A). Set-up used for the on-line pepsin digestion of 5 μL of HuBuChE solution on IMER and its analysis by microLC-MS (B). Set-up used for the on-line immunoextraction, followed by pepsin digestion and analysis of HuBuChE in 50 μL of plasma (C). The trap column concentrated the peptides.

After conditioning of the IS for 30 min with PBS, 5 μL of HuBuChE solution (300 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ in PBS buffer, pH = 7.4) was percolated through the IS that was further washed

for 10 min with the PBS solution at $100 \mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$. Afterwards, HuBuChE was eluted from the IS by percolating a formic acid solution ($\text{pH} = 2.2$) at $100 \mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$ for 10 min. Detection of HuBuChE during the transfer with PBS and elution steps was followed at 280 nm. It was previously checked that HuBuChE had the same UV response in PBS as in formic acid. The extraction yield was calculated by dividing the area of the peak observed during the elution step by the sum of the area of the transfer and elution peaks.

2.5. Preparation of pepsin-based IMER

Two pepsin-based IMER were prepared according to the protocol previously developed by our group for pepsin immobilization [176]. Briefly, 1.7 mL of a $4 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ pepsin solution in $0.1 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ sodium acetate was incubated with 35 mg or 58 mg of CNBr activated sepharose for 16 h at $4 \text{ }^\circ\text{C}$. Then, 30 mg from the 35 mg of sorbent, were packed in a $20 \times 2 \text{ mm}$ I.D. precolumn (IMER 1) while 50 mg, from the 58 mg of sorbent, were packed in a $30 \times 2.1 \text{ mm}$ I.D. precolumn (IMER 2). The remaining uncoupled sites were blocked by percolating a glycine solution through the precolumn at a flow rate of $400 \mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$ for 120 min for IMER 1 and 200 min for IMER 2. The gel was washed three times at $400 \mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$ for 10 min (IMER 1) or 16 min (IMER 2), alternating between sodium acetate and HCl solutions to remove unbound enzymes. Finally, IMER were stored at $4 \text{ }^\circ\text{C}$ in a formic acid solution ($\text{pH} = 3$) when not used.

2.6. Quantification of pepsin grafted on IMER

A bicinchoninic acid (BCA) assay was used to evaluate the amount of pepsin immobilized on sepharose. Two calibration curves (six levels of concentration) were made by adding $10 \mu\text{L}$ of pepsin at a concentration range from $100 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ to $4 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ in the microwells of a 96 microplate. After addition of $10 \mu\text{L}$ of the working reagent in each microwell and incubation of the microplate at $37 \text{ }^\circ\text{C}$ for 30 min, the absorbance was measured at 562 nm. Pepsin grafting yields were calculated by comparing the amount of pepsin remaining in the supernatant to the initial amount of pepsin in the coupling solution.

2.7. HuBuChE digestion procedure on IMER

The digestion was performed using a set-up composed of three serial six-port switching valves Figure 31B. One carries a 5 μL injection loop and is connected to a syringe-pump, the second carries an IMER and the third the trap column (Hypersil Gold C18, 10 x 1 mm I.D., 5 μm) connected to the IMER and to microLC-MS. Briefly, 2.4 μg of a commercial HuBuChE solution was loaded into the 5 μL injection loop and was transferred by 30 μL (IMER 1) or 40 μL (IMER 2) of formic acid (pH = 2.2) to the IMER at 50 $\mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$. After digestion by *stop flow* for 10 or 20 min, peptides were transferred with 150 μL (IMER 1) or 250 μL (IMER 2) of formic acid at 50 $\mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$ to the trap column for concentration. Finally, the third valve was switched and the peptides were transferred from the trap column to the analytical column to be analyzed by microLC-MS² as described in Section 2.2. IMER could be directly reused after a 30 min washing step with formic acid at pH = 2.2.

Digestion yields were evaluated by dividing the amount of nonapeptide resulting from pepsin digestion by the theoretical amount of nonapeptide corresponding to a 100% digestion yield. This amount was calculated taking into account that 1 mole of HuBuChE (Mw = 340 kDa) gives 4 moles of nonapeptide.

2.8. Immunoextraction and digestion steps coupled on-line to microLC-MS²

For total analysis of HuBuChE from plasma, IS B2 18-5_{SP} and IS B2 18-5_{ER} were coupled on-line to IMER 2 according to the set-up described in Figure 31C. After conditioning the immunosorbent for 30 min with PBS buffer (pH = 7.4) at 50 $\mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$, immunoextraction was achieved in two steps. The first step consisted in transfer of 100 μL of a diluted plasma sample (plasma/PBS 1/1 v/v) through the immunosorbent with 700 μL of PBS buffer at 50 $\mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$ to remove non-specifically retained plasma proteins. Afterwards, HuBuChE retained by the IS was eluted and transferred to the IMER with 62 μL of formic acid at pH = 2.2 at 50 $\mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$ and a *stop flow* digestion was performed for 10 min. This step was repeated twice. Then, HuBuChE peptides were transferred from the IMER to the trap column with 250 μL of the same acid solution at 50 $\mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$. Finally, the valve connected to the trap column was switched and the peptides were transferred by the LC mobile phase to the analytical column to be analyzed as mentioned in Section 2.2. After immunoextraction, immunosorbents were stored in a PBS-azide solution for at least 24 h to allow the regeneration of antibodies before their re-use.

3. Results and discussion

3.1. Preparation of immunosorbents and evaluation of their grafting yields

According to the results found in the literature in terms of affinity for HuBuChE, three antibodies directed against three epitopes were chosen for the preparation of immunosorbents: two polyclonal antibodies whose epitopes were respectively located near the N-terminal (N-15) [14] and C-terminal (C-18) amino acid sequence of HuBuChE [183] and one monoclonal antibody B2 18-5 whose epitope was not mentioned but whose affinity for HuBuChE was demonstrated by Peng *et al.* [4, 87, 106]. The choice of the immobilization support is a key parameter for antibody grafting since it conditioned the chemical and mechanical properties of the immunosorbent. The support must be stable, chemically inert and have good mechanical resistance. It also needs to be easily functionalized and should not be hydrophobic to avoid developing non specific interactions with molecules present in the sample. Two materials, matching these conditions, were chosen as grafting supports. Sepharose, that has been widely used for antibody immobilization was selected for its low hydrophobicity and for its high capacity. Because sepharose has relatively low pore size (700 Å), an epoxy resin support, with higher porosity (1000 Å) but never described for antibody grafting, was chosen to ensure optimal access of HuBuChE (140 Å) to the antibodies bound inside the pores.

3.1.1. Sepharose-based immunosorbents

To evaluate the potential of this support, 100 µg of polyclonal or monoclonal anti-HuBuChE antibodies were covalently bound to 35 mg of CNBr activated sepharose and packed in a precolumn (20 x 2 mm I.D.). At the end of the grafting step, the supernatant containing unbound antibodies was analyzed by BCA assay to quantify the amount of antibodies grafted on sepharose. Monoclonal B2 18-5 antibodies (100 µg, 1 mg.mL⁻¹ in PBS with 0.1% sodium azide) were easily bound to sepharose (35 mg) with 95% grafting yields, close to the 99% yields described by Peng *et al.* for the immobilization of 5 mg of B2 18-5 antibodies on 1 g of CNBr activated sepharose, for 20 h [4]. Polyclonal antibodies N-15 and C-18 (100 µg, 200 µg.mL⁻¹ in PBS with 0.1% sodium azide and 0.1% gelatin) were grafted on sepharose and the grafting yield was estimated to be 35% for N-15 and 38% for C-18 antibodies. By comparison with the results obtained with the B2 18-5 monoclonal antibodies, the grafting yields of N-15 and C-18 polyclonal antibodies were quite low. Considering that

identical antibody/sepharose ratios were used, it was assumed that the low grafting yields were due to the antibody concentration or to the 0.1% gelatin added by the supplier in the PBS solution that could bind to CNBr sepharose grafting sites. Consequently, the same grafting procedure was applied with N-15 and C-18 antibodies solutions without gelatin (1 mg.mL⁻¹ in PBS with 0.1% sodium azide) and excellent grafting yields were obtained for N-15 and C-18 antibodies (94% and 98% respectively). The resulting immunosorbents were called N-15_{SP}, C-18_{SP} and B2 18-5_{SP}.

3.1.2. Epoxy resin-based immunosorbent

Several reactive groups were available for this resin: tresyl, formyl, amino, carboxy and epoxy groups. Among them, the epoxy group was chosen for its gentle and easy reaction condition, the stability of the covalent linkage and the grafting versatility. Indeed ligands can be bound by their amino or thiol groups, depending on the pH and the temperature used during the grafting step. Epoxy groups have already been used for antibody immobilization on magnetic beads or sepharose [80, 81, 179, 180] but antibodies have not been grafted on this epoxy resin so far. Therefore, the grafting of antibodies on the resin needed to be optimized. Based on the literature [184], the use of a grafting solution with a pH between 7 and 8 at 25 °C must favor protein grafting on epoxy resin by thiol group while solutions with a pH close to 9 at 40 °C favor grafting by amino group. Because of the high cost of anti-HuBuChE antibodies, the grafting yield of antibodies on this resin was studied with mouse IgG. To evaluate the best grafting conditions, 100 µg of mouse IgG were grafted on 30 mg epoxy resin at different pH (7.4, 8, 8.5 and 9), temperature (4 °C, 25 °C or 37 °C) and grafting time (24 h, 48 h or 72 h). BCA assays were performed every 24 h to evaluate the grafting yields for each conditions.

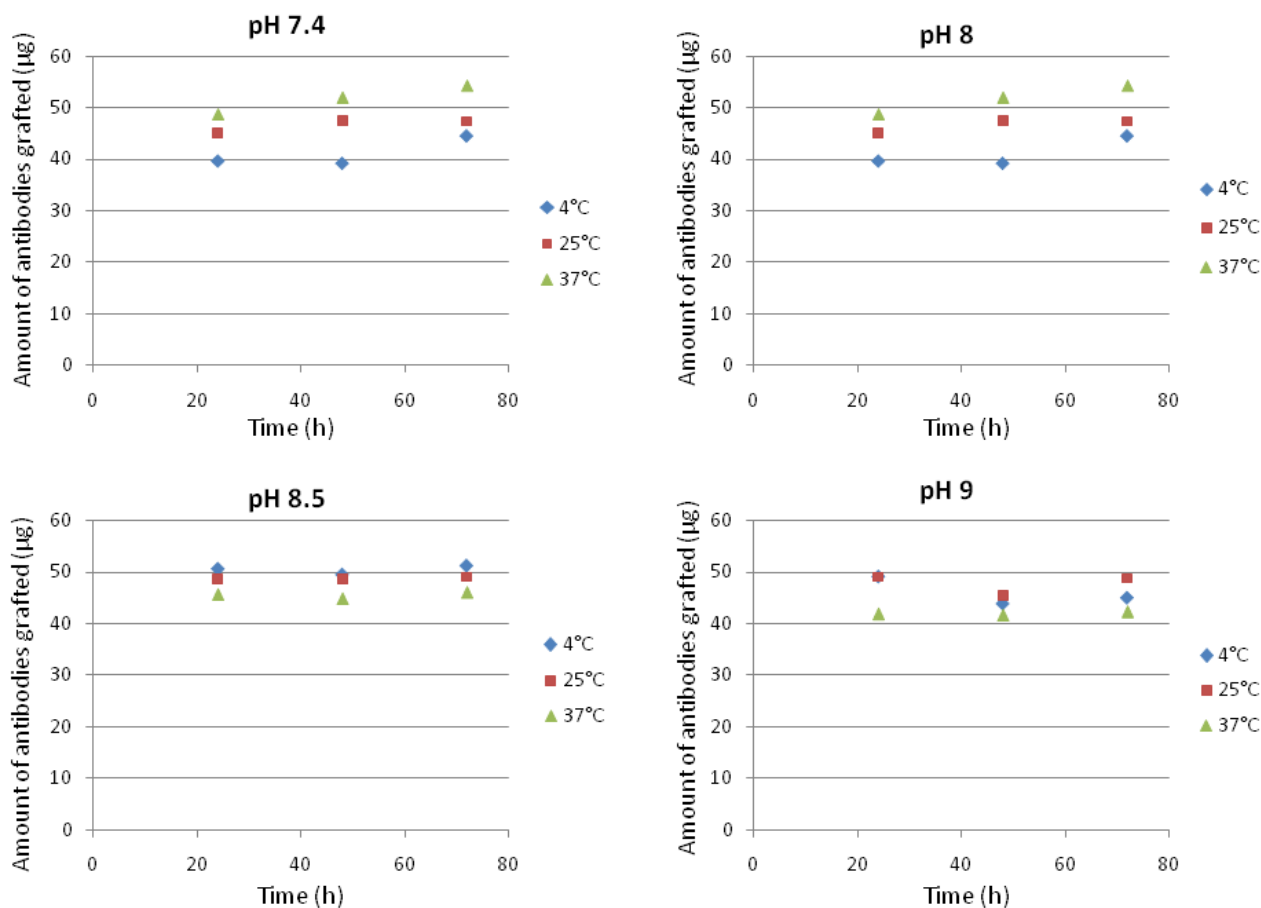


Figure 32. Amount of mouse IgG grafted on epoxy resin (30 mg) depending on the pH, the temperature and the grafting time.

As shown in Figure 32, increase of the grafting time, whatever the pH or the temperature, did not enhance the grafting of IgG mouse antibodies on this resin. This can be explained by saturation of the epoxy sites by 24 h. Even though no significant difference in terms of grafting yields was observed when increasing the pH or the temperature, two trends may be discerned. For pH 7.4 and 8, favoring the grafting of antibodies by thiol groups, the grafting seemed less efficient at 4 °C than 25 °C or 37 °C. On the contrary, temperature did not influence the grafting of antibodies by amino groups at pH 8.5 and 9. Considering the low impact of pH on grafting yields, it was chosen to graft the antibodies by thiol group at 25 °C and pH = 7.4, which corresponds to the optimal pH for antibody stability. The optimized procedure was then applied to B2 18-5 anti-HuBuChE antibodies. As depicted in Section 2.3.2., 100 µg of B2 18-5 antibodies were grafted on the epoxy resin for 24 h at 25 °C and pH 7.4. After evaluation of the amount of antibody remaining in the supernatant by BCA assay, a

grafting yield of 59% was obtained and was superior to those observed for mouse antibodies at pH 7.4 and 25 °C (45%). However, this value was almost 2-fold lower than that obtained on sepharose (95%). This can be explained by a weaker specific surface area of the epoxy resin due to its larger pore size (1000 Å) compared to sepharose (700 Å). Despite this low grafting yield of antibodies on the epoxy resin, access of HuBuChE to antibodies could be favored by the high pore size of the resin. Consequently, retention of HuBuChE was studied on both IS B2 18-5_{SP} and B2 18-5_{ER} to compare them in terms of extraction recoveries and selectivity.

3.2. Immunoextraction of HuBuChE

Immunoextraction involves three basic steps. The first step is called percolation and consists in loading of the sample onto the immunosorbent. It occurs in an aqueous buffer like PBS, under conditions close to physiological medium to ensure the best retention of the target analyte on antibodies. Then, a washing step is applied to remove the interfering compounds slightly retained on the support without disturbing the interaction between the target analyte and the antibodies. Finally, the last step is the elution of the analyte from the immunosorbent by an acidic or chaotropic solution that disrupts analyte-antibody interactions [65]. In this study, the immunoextraction procedure was carried out with a set-up including a 5 µL injection loop, an IS (20 x 2 mm I.D.) and a UV detector (Figure 31A)

After conditioning of the IS, 5 µL of HuBuChE solution was percolated and the IS was washed with 1 mL of PBS before elution of HuBuChE from the IS at 100 µL.min⁻¹ by a formic acid solution for 10 min. The presence of HuBuChE during the percolation, the washing and the elution steps was followed at 280 nm by UV detection. During the development of the immunoextraction procedure, we noticed that whatever the antibodies, no retention of HuBuChE was observed when percolating a HuBuChE solution containing 0.1% sodium azide. Consequently, all of the immunoextractions were performed with azide-free HuBuChE solutions. As shown on the UV chromatogram obtained after percolation and elution of HuBuChE on the IS B2 18-5_{ER} (Figure 33) a small peak was observed at 280 nm during percolation and washing with PBS. It indicates that a low amount of protein was lost during this step and could correspond to HuBuChE, or to interfering proteins present in the commercial HuBuChE preparation. Elution of HuBuChE was achieved in 2 min, with an elution volume of 200 µL (Figure 33).

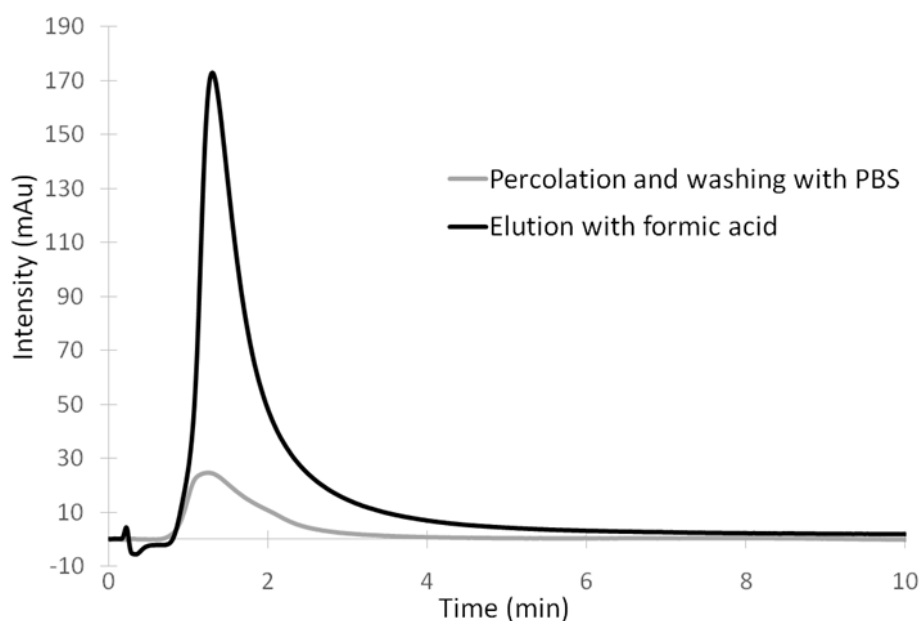


Figure 33. UV analysis ($\lambda = 280$ nm) of the effluent of B2 18-5_{ER} immunosorbent (20 x 2 mm I.D.) after percolation of 5 μ L of a HuBuChE solution (1.5 μ g). The grey chromatogram corresponds to the percolation and washing steps (PBS solution pH = 7.4 at 100 μ L.min⁻¹) and the black chromatogram to the elution step (formic acid solution pH = 2.2 at 100 μ L.min⁻¹).

Even in the case that a small amount of HuBuChE was lost during percolation, it was estimated that more than 80% of HuBuChE was retained on the IS B2 18-5_{ER} by comparison of the area of the percolation and the elution peaks (Section 2.4). This value was similar to the 97% extraction yield obtained by Peng *et al* for the immunoextraction of 500 μ L of plasma on B2 18-5 antibodies (20 μ g) immobilized on Dynabeads Protein G [87]. The slight difference between these two values was explained by the different origins of HuBuChE (commercial or plasmatic) and by the different methods applied to evaluate the binding of HuBuChE on antibodies. In our case, HuBuChE extraction was followed by UV measurement at 280 nm while Peng *et al* evaluated it by measuring the residual HuBuChE activity in plasma. The immunoextraction procedure was then applied to the sepharose-based immunosorbents B2 18-5_{SP}, N-15_{SP} and C-18_{SP}. About 85% of HuBuChE was retained on the monoclonal IS B2 18-5_{SP} with an elution volume of 150 μ L. However, no retention was observed for polyclonal-based immunosorbents N-15_{SP} and C-18_{SP}. Indeed, HuBuChE was totally released during the percolation and washing steps and was missing on the elution chromatogram. No information

was found in the literature concerning the retention of HuBuChE on C-18 antibodies. However, Arial *et al.* showed that N-15 antibodies, immobilized on magnetic beads, could effectively capture HuBuChE from plasma after a 15 h incubation time [14]. The absence of retention of HuBuChE on the IS N-15 was due to a weak affinity of the N-15 antibodies for HuBuChE. Contrary to the washing step by partition, the washing step by SPE requires high affinity antibodies to maintain retention of HuBuChE on the IS. Thus, only B2 18-5_{SP} and B2 18-5_{ER} immunosorbents were kept for on-line coupling to IMER for digestion by pepsin.

3.3. On-line coupling of IMER to microLC-MS²

3.3.1. Analysis of HuBuChE peptides by microLC-MS²

The goal of this study was to couple on-line a selective immunoextraction step with a rapid and efficient HuBuChE digestion on IMER to LC-MS for analysis of the target nonapeptide FGESAGAAS. In a preliminary study, nanoLC-MS was used for the analysis of HuBuChE peptides [176]. Nano-chromatography brought high sensitivity while only requiring a low amount of sample (250 nL), which allowed minimization of the cost of development of the method. However, the on-line coupling of the IMER (20 x 2 mm I.D.) to the nano-column (EASY-Spray PepMap[®] C18, 150 x 0.75 mm I.D., 3 μm, 100 Å) was tricky because of the incompatibility of their volumes. Indeed, 100 μL of formic acid were required to recover the nonapeptide from the IMER while injected volumes higher than 250 nL would cause a loss of efficiency in nanoLC-MS. Consequently, a trap column was needed to concentrate the 100 μL peptide solution collected from the IMER before its injection on the analytical column. Current nano-trap columns can only be applied to low volumes of sample (1 to 5 μL) which was not compatible with the 100 μL peptide solution. To analyze the totality of the sample by nanoLC-MS, it was necessary to reduce the size of the IMER. However, low diameter devices are hard to pack with sepharose beads. Thus, we decided to move from nanoLC-MS to microLC-MS analysis, to couple the previously developed IMER to a micro trap column (10 x 1 mm I.D.), which was compatible with the 100 μL peptide solution.

To carry out the separation by microLC-MS², a solution of synthetic nonapeptide (5 μ L) was mixed with a solution of tryptic cytochrome C digest to simulate peptides resulting from HuBuChE digestion. The peptides were separated at 50 μ L.min⁻¹ on an Acclaim PepMap 100 analytical column (C18, 150 x 1 mm, 3 μ m, 100 \AA) with a water (A)/ACN (B) gradient varying from 2% B to 90% B in 20 min. Peptides were detected by mass spectrometry in SCAN mode. The total ion chromatogram resulting from analysis of the peptides is shown in Figure 34A. An extracted ion chromatogram corresponding to the nonapeptide ($m/z = 796.3$) was performed and the nonapeptide was observed at a retention time of 18.9 min (Figure 34 B).

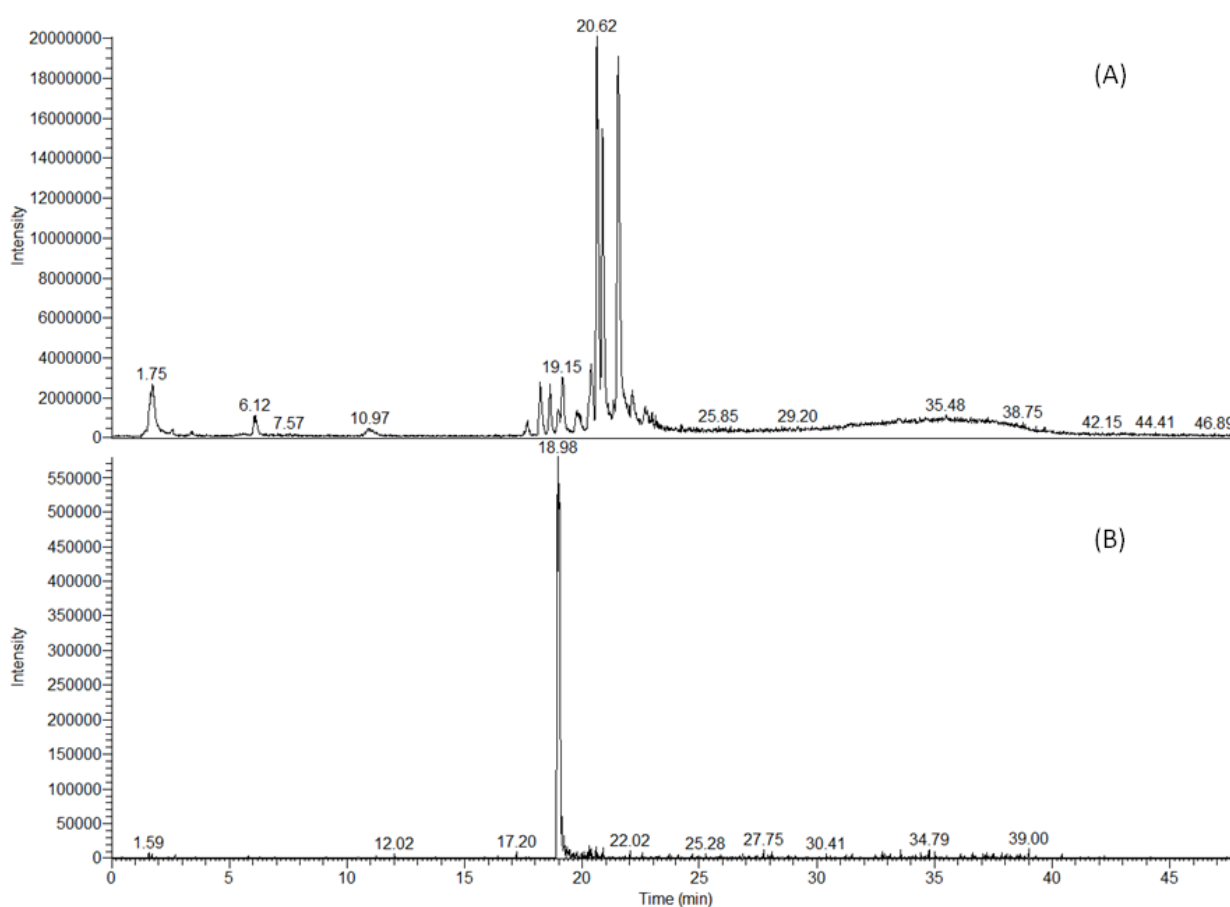


Figure 34. Total ion chromatogram of the nonapeptide/cytochrome C digest mixture (A) and the extracted ion chromatogram of the nonapeptide FGESAGAAS ($m/z = 796.3$) (B).

Calibration curves were established for the MRM transitions m/z 796.3 \rightarrow 602.3, 796.3 \rightarrow 673.3 and 796.3 \rightarrow 691.3 to further identify and quantify by microLC-MS² the nonapeptide resulting from HuBuChE digestion with or without immunoextraction upstream. The linear regression equations and coefficient values of the regression curves obtained for

the concentration range 6.8 to 675 ng.mL⁻¹ were equal to $y = 33584 x - 26.856$, $R^2 = 0.999$; $y = 34237 x - 218.65$, $R^2 = 0.999$; $y = 34804 x - 36.013$, $R^2 = 0.998$ for the transitions m/z 796.3→602.3, 796.3→673.3 and 796.3→691.3 respectively (see calibration curves in supplementary material S.3, *Annexe 3*). For the transition m/z 796.3→602.3, the limit of detection (LOD, S/N = 3) and of quantification (LOQ, S/N = 10) of the nonapeptide were estimated to be 0.08 ng.mL⁻¹ (0.4 pg injected) and 0.28 ng.mL⁻¹ (1.4 pg) respectively. The LOD and LOQ values were respectively 0.10 ng.mL⁻¹ (0.5 pg) and 0.35 ng.mL⁻¹ (1.7 pg) for the transitions m/z 796.3→673.3 and 796.3→691.3. These LOD values were 9 to 36 times below the LOD of the nonapeptide reported by Pantazides *et al.* (1 ng.mL⁻¹ for 10 μL injected) by microLC-MS² [104], Sporty *et al.* (3 ng.mL⁻¹ for 5 μL injected) by microLC-MS², Carter *et al.* (0.96 ng.mL⁻¹ for 3 μL injected) by LC-MS² [18] and similar to those resulting from analysis of the nonapeptide by nanoLC-MS² in our previous work (0.15 ng.mL⁻¹ for 250 nL injected).

As previously mentioned, a trap column was needed to couple on-line the IMER (20 x 2 mm I.D) to the microLC-MS analysis. However, it was crucial to evaluate the breakthrough volume of the trap column (Hypersil Gold) to ensure that the totality of the nonapeptide resulting from the digestion on IMER could be retained on this support. The setup used to estimate the breakthrough volume was made of a six-port switching valve including a syringe pump containing the synthetic nonapeptide solution (5 μg.mL⁻¹ in formic acid, pH = 2.2) linked to the trap column and to the mass spectrometer. The solution was injected at 50 μL.min⁻¹ on the trap column and in order to avoid exceeding the column capacity, the nonapeptide solution was replaced after 16 min by a formic acid solution (pH = 2.2) for 40 min. In these conditions, the breakthrough volume was reached after 30 min, corresponding to 1.5 mL of formic acid. This volume is significantly higher than the 100 μL usually applied to recover peptides from off-line digestion of HuBuChE on IMER [176]. Thus, the target nonapeptide resulting from HuBuChE digestion on IMER could be retained on the trap column.

To conclude, a sensitive method was developed to trap, separate and detect the target nonapeptide by microLC-MS² and was applied to the detection of the nonapeptide resulting from the on-line digestion of HuBuChE on IMER.

3.3.2. Digestion of HuBuChE on IMER coupled on-line to microLC-MS²

In our previous studies, we showed that sepharose was the best performing support for enzyme immobilization and that among different amounts of pepsin grafted on sepharose, the highest off-line digestion yields of HuBuChE on IMER (20 x 2 mm I.D.) were obtained with IMER grafted with 6.8 mg of pepsin, with digestion yields between 20% and 24% [171, 176]. Thus, a similar IMER called IMER 1 (20 x 2 mm I.D.), synthesized by the grafting of 6.8 mg of pepsin on 35 mg of CNBr-activated sepharose, was chosen for on-line digestion on IMER, to allow comparison with off-line digestion. The grafting yield of pepsin on CNBr-sepharose, was evaluated to be 24% by BCA assay and was thus similar to previous results (22%) [171, 176]. Hence, the good repeatability of the grafting process of pepsin on CNBr-activated sepharose was confirmed. A standard HuBuChE solution at 480 $\mu\text{g/mL}$ (5 μL) was digested on-line on IMER 1 using the set-up depicted in Figure 31B. After digestion by *stop flow* for 20 min, HuBuChE peptides were trapped in a precolumn and analyzed by microLC-MS². The amount of nonapeptide obtained after digestion was quantified by following the MRM transitions m/z 796.3 \rightarrow 691.3; 796.3 \rightarrow 673.3 and 796.3 \rightarrow 602.3. As shown in Figure 35, the nonapeptide was observed with a retention time of 18.9 min, stating an efficient digestion of HuBuChE.

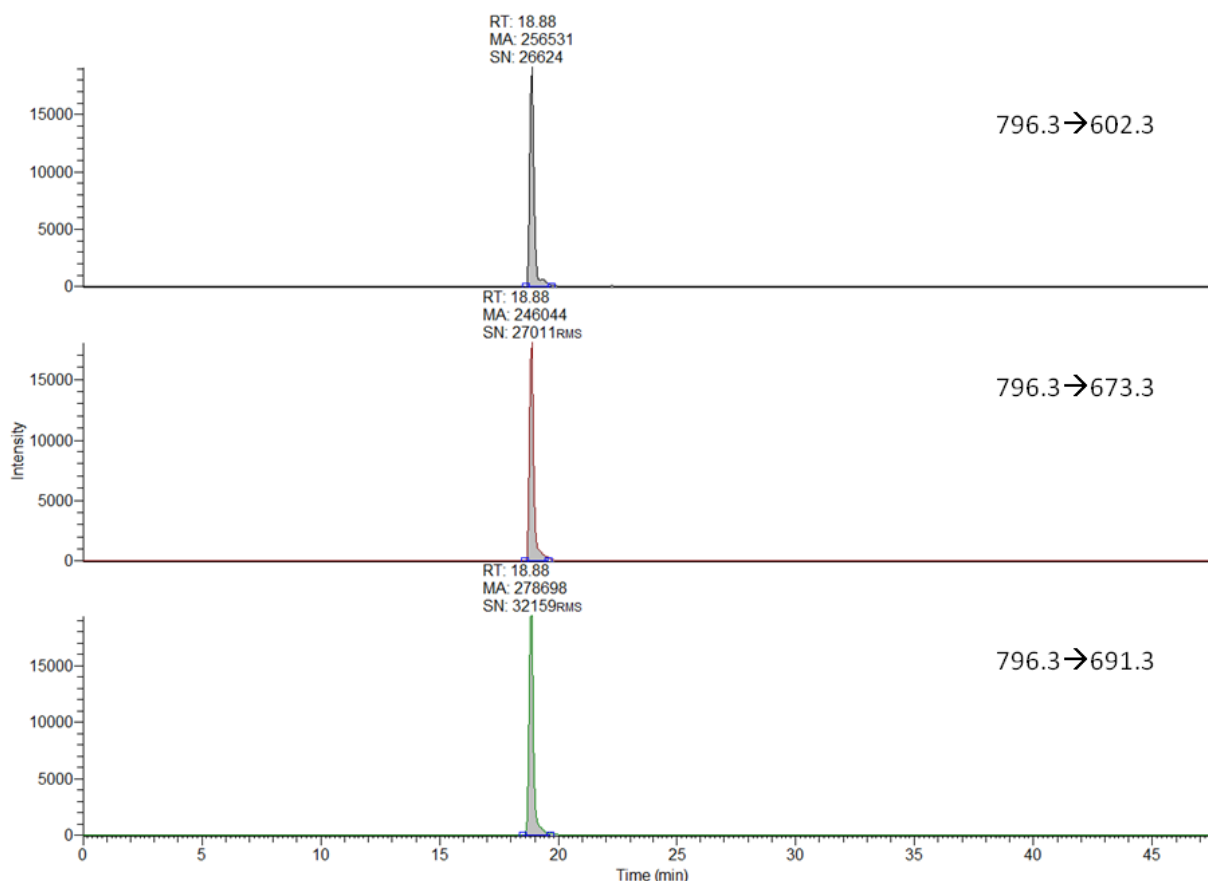


Figure 35. MRM chromatograms (transitions 796→602, 796→673 and 796→691) of the target nonapeptide obtained after on-line digestion of 2.4 μ g of HuBuChE on IMER 1 for 20 min and its analysis by microLC-MS².

The on-line digestion was repeated 3 times and the digestion yield of HuBuChE on IMER was $24 \pm 2\%$ which was similar to that obtained off-line: $24 \pm 3\%$ [176]. IMER synthesis and digestion were repeatable over time and high retention of HuBuChE peptides on the trap column was achieved. Therefore, IS could be coupled on-line to the IMER.

3.4. On-line coupling of immunosorbents to IMER and microLC-MS²

As with any coupling, many constraints had to be taken into account to realize efficient coupling of the immunoextraction step with enzymatic digestion on IMER. Contrary to the percolation and the washing steps, the elution step was crucial for this coupling. Indeed, the elution solution applied on IS had to be compatible with the solution used for the digestion on IMER, in terms of pH and volumes. The pH of the solution was not problematic in this coupling, as the solution chosen for HuBuChE elution and digestion was a formic acid

solution pH = 2.2. Nevertheless, the elution volume of HuBuChE on IS was important to assess its compatibility with the IMER dwell volume (37 μL). The elution volume was previously estimated around 150 μL for the IS B2 18-5_{SP} and B2 18-5_{ER}. To digest the majority of HuBuChE eluted from the IS on IMER, many ways can be considered. HuBuChE can be eluted at a low flow rate through the IMER, or eluted by *stop flow* with a succession of small volumes, equal or lower than the dwell volume of the IMER. Because the dwell volume of IMER 1 (20 x 2 mm I.D) was equal to 37 μL , at least 4 digestions on IMER 1 were necessary to digest HuBuChE resulting from the elution step. To preserve a reasonable digestion step on IMER, it was essential to reduce the digestion time. For this, 2.4 μg of HuBuChE were diluted in 150 μL of formic acid to mimic the elution conditions in term of pH and volume, and digested on-line on IMER 1 by three different methods. The HuBuChE solution was digested by *stop flow* either for 4 x 5 min or 4 x 10 min or by continuous flow at 7.5 $\mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$ for 20 min. The best digestion yields were obtained for the 4 x 10 min digestion, with digestion yields 2-fold higher than continuous flow digestion and 1.5 times higher than the 4 x 5 min digestion. Considering that a 40 min digestion time was too long, a bigger size IMER, called IMER 2 (30 x 2.1 mm I.D) was synthesized by grafting 6.8 mg of pepsin on 58 mg of CNBr-activated sepharose to reduce the number of digestions. The volume to transfer HuBuChE from the loop to the IMER was adapted to the dimensions of the IMER 2 and set to 40 μL while 250 μL of formic acid pH 2.2 were used to transfer the peptides from IMER 2 to the trap column. Thanks to its higher dwell volume (62 μL), digestion of the HuBuChE solution on IMER 2 was completed by only two *stop flow* digestions of 10 min. The linearity of the HuBuChE digestion on IMER 2 was checked by digesting increasing amount of HuBuChE between 0.15 μg and 2.4 μg (Figure 36).

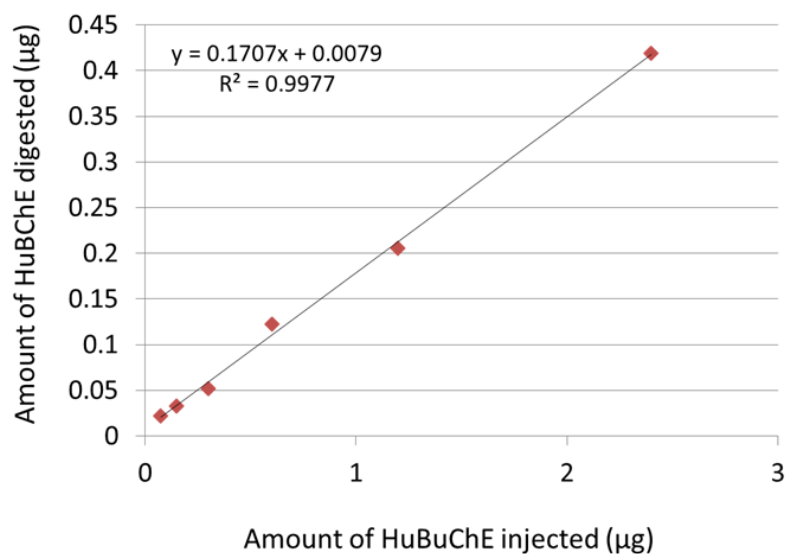


Figure 36. Amount of HuBuChE digested on IMER 2 in 10 min depending on the amount of HuBuChE introduced.

The digestion yield of HuBuChE on IMER 2 was evaluated as 18% (RSD = 8%) and good linearity was observed. Considering that the amount of HuBuChE digested on IMER 2 was compatible with the amount of HuBuChE in 100 µL of plasma (0.4 µg), the IMER 2 was coupled on-line to B2 18-5_{SP} or B2 18-5_{ER} immunosorbents for the on-line immunoextraction and digestion of HuBuChE in plasma.

3.5. Optimization of the immunoextraction procedure

First, selectivity of the whole analytical system was estimated by LC-MS, by following the presence of human albumin (UniProt accession P02768) after the immunoextraction and digestion steps. For that, 5 µL of a 200 µg.mL⁻¹ commercial albumin solution was digested on IMER 2 for 10 min and the resulting peptides were analyzed by LC-MS in scan mode. Albumin peptides were recognized by MASCOT and the most intense peptide $[M+H]^+ = 467.6$ at 19.6 min, corresponding to the sequence of amino acids ³⁵¹LGMF³⁵⁴ of human albumin was chosen as qualifying ion. Then, the presence of this peptide after percolation of plasma on B2 18-5_{SP} and B2 18-5_{ER} immunosorbents was followed by SIM mode from 19.3 min to 21.7 min, while the MRM method was used to quantify HuBuChE between 0 min and 19.3 min. The albumin peak was observed at 19.6 min and it was estimated that more than 99.9% of albumin was removed after immunoextraction

using a 700 μL PBS buffer washing step, which confirmed the selectivity of the whole procedure. In order to decrease the duration of the immunoextraction step, washing steps with 500 μL and 300 μL of PBS buffer were tested. Nevertheless, an increase of non specific interactions by a factor of 2 was observed on each immunosorbent when using a 300 μL washing volume. Accordingly, the washing volume was kept at 700 μL .

3.6. On-line analysis of HuBuChE from plasma

A human plasma sample was diluted (1/1 v/v plasma/PBS) and 100 μL of this sample was directly percolated and washed through the immunosorbent B2 18-5_{SP} or B2 18-5_{ER} with 700 μL of PBS buffer pH = 7.4. HuBuChE was eluted from the immunosorbent with formic acid and digested on IMER 2 by *stop flow* for 2 x 10 min. HuBuChE peptides were transferred from the IMER to the precolumn with 250 μL of formic acid and analyzed by microLC-MS². This procedure was carried out in triplicate for both immunosorbents. The MRM chromatograms of the nonapeptide resulting from the coupling of IS B2 18-5_{SP} to IMER 2 are shown in Figure 37. The target nonapeptide was observed at 18.9 min with a S/N ratio higher than 10000 for the first two transitions and the LOQ was estimated to a few femtomoles. It confirmed the efficiency of the immunoextraction and digestion steps and the high sensitivity of the method. The amount of nonapeptide obtained after these two steps was evaluated thanks to the nonapeptide calibration curves described in Section 3.3.1. The total yield of the method, corresponding to this amount divided by the amount of nonapeptide expected for 100% extraction and digestion was evaluated considering a 4 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ medium concentration of HuBuChE in plasma. The coupling of IS B2 18-5_{ER} to IMER 2 led to a total yield of $8 \pm 3\%$ while a $42 \pm 3\%$ total yield was obtained for IS B2 18-5_{SP}. Thus, it appeared that sepharose was the most appropriate support for the coupling of the immunoextraction procedure to IMER 2. However the 42% yield was quite high compared to the theoretical expectations. Considering an 18% digestion yield of HuBuChE on IMER 2, it was not expected to get a total yield higher than this value, even with a 100% extraction yield.

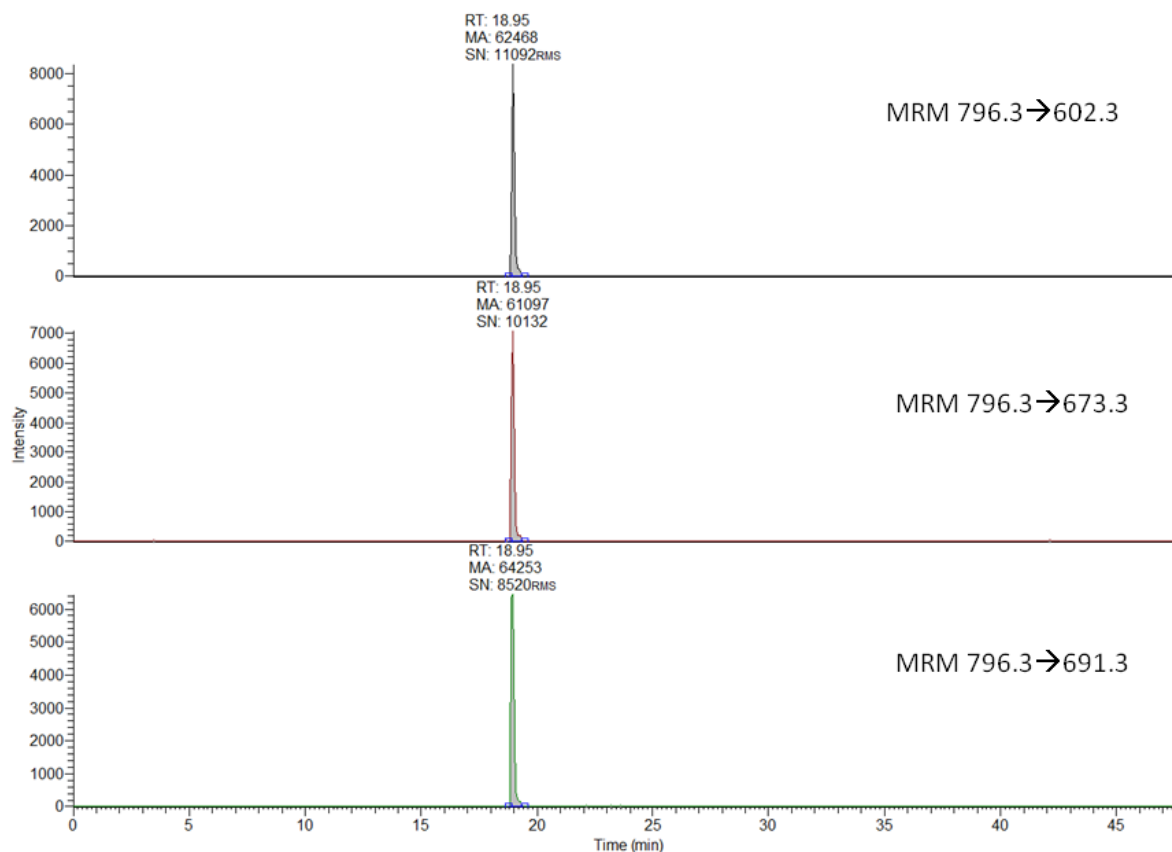


Figure 37. MRM chromatograms of the nonapeptide FGESAGAAS obtained after on-line immunoextraction of HuBuChE from 50 μL plasma and digestion on IMER 2, followed by microLC-MS² analysis. The immunoextraction was performed in 14 min on IS B2 18-5_{SP}, the digestion on IMER 2 occurred in 20 min and the peptides were analyzed by mass spectrometry in MRM mode (transitions 796 \rightarrow 602, 796 \rightarrow 673 and 796 \rightarrow 691).

These variations between theoretical and experimental results can be explained by three phenomena: (i) as the concentration of HuBuChE in plasma is person dependent, the real concentration in plasma was somewhat higher than the 4 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ value used for quantification, (ii) matrix effect during LC-MS² analysis could have an impact on evaluation of the digestion yields (iii) the amount of commercial HuBuChE estimated by the supplier was overestimated because of contaminant proteins in the sample and it lowered the digestion yields on IMER 2. This third explanation was explored and confirmed by Oksana Lockridge with the evaluation of the purity of LeeBiosolution HuBuChE by SDS gel. According to O. Lockridge, 100 % pure HuBuChE, purified from Cohn paste by anion exchange chromatography and procainamide gel, has a specific activity of 500 $\text{U}\cdot\text{mg}^{-1}$. HuBuChE used

in this work having a specific activity of 200 U.mg^{-1} it was estimated that the protein was only 40 % pure. SDS gel experiment confirmed that and showed that LeeBiosolutions HuBuChE was contaminated with albumin and other proteins (data not shown). Taking into account that HuBuChE is only 42% pure, digestion yield of HuBuChE on IMER2 was re-evaluated to $45 \pm 4 \%$. The total yields of the method being $42 \pm 3\%$ for IS B2 18-5_{SP}, it was estimated that B2 18-5 allowed to extract about 100 % of HuBuChE from plasma.

4. Conclusions

An on-line analytical system including an immunoextraction step, a digestion step and a microLC-MS² analysis was developed for the detection of the target HuBuChE nonapeptide in plasma in less than 1 h. The quantification limit of the nonapeptide on this system was evaluated to a few femtomoles for the analysis of 50 μL of plasma ($S/N > 10000$) which would allow one to achieve quantification of the nonapeptide in a further reduced volume of plasma ($< 10 \mu\text{L}$). HuBuChE digestions were carried out on-line on reusable IMER and were quantified by microLC-MS². HuBuChE digestion yields up to 18% were obtained on IMER (30 x 2.1 mm I.D.) after only 10 min digestion by stop flow and were repeatable over different HuBuChE amounts. Three immunosorbents were successfully prepared by covalent grafting of three anti-HuBuChE antibodies on CNBr-sepharose with grafting yields up to 98%. HuBuChE recovery was close to 100% for the best immunosorbent B2 18-5_{SP} grafted with B2 18-5 antibodies. This immunosorbent was coupled on-line to an IMER and immunoextraction of HuBuChE was achieved in 14 min while digestion was performed in 20 min. The nonapeptide global recovery was higher than 42% for the B2 18-5_{SP} immunosorbent with a RSD value lower than 5% ($n = 3$). Non-specific interactions on this set-up were evaluated by following the presence of the most intense albumin peptide obtained after the percolation of plasma and it was estimated that more than 99.9% of albumin was removed during percolation and washing.

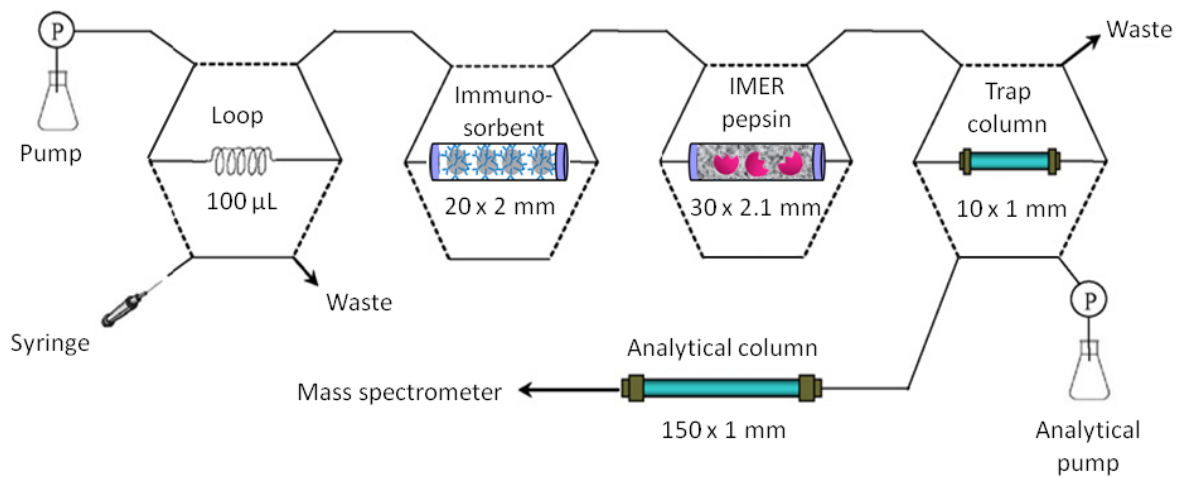
To conclude, the coupling of a selective immunoextraction step to a brief and repeatable digestion on IMER has allowed a rapid and sensitive on-line analysis of HuBuChE in a low volume of plasma and will be applied to the analysis of HuBuChE-OP adducts.

Acknowledgment

The authors would like to thank the Direction Générale de l'Armement (DGA) for its financial support and Pr. Oksana Lockridge for providing B2 18-5 antibodies and for reviewing this article.

CHAPITRE V

IMMUNOEXTRACTION ET DIGESTION EN LIGNE POUR L'ANALYSE DE BUCHE ADDUITE PAR DES AGENTS NEUROTOXIQUES ORGANOPHOSPHORES



Chapitre V : Immunoextraction et digestion en ligne pour l'analyse de BuChE adduite par des agents neurotoxiques organophosphorés

Dans le chapitre précédent, plusieurs immunoadsorbants ont été préparés par greffage covalent de trois anticorps anti-BuChE sur des supports de sépharose activée CNBr et époxy-polyméthacrylate. De très bons taux de greffage ont été obtenus avec les supports à base de sépharose, avec des valeurs proches de 98%. L'anticorps monoclonal B2 18-5 greffé sur sépharose a conduit à un rendement d'extraction de la BuChE avoisinant les 100% tandis que les étapes de lavage ont permis l'élimination de plus de 99.9% d'albumine, protéine majoritaire dans le plasma, ce qui a confirmé l'efficacité des immunoadsorbants pour l'extraction de la BuChE du plasma. Le couplage en ligne d'un IMER de pepsine à l'analyse microLC-MS² a été effectué et l'ajout de l'immunoadsorbant en amont de la digestion en ligne a permis la détection du nonapeptide cible en moins d'une heure. Finalement, la méthode d'analyse en ligne s'est montrée très répétable et a conduit à un fort taux de récupération du nonapeptide avec une limite de quantification de 2 fmol.

Cependant, nous avons pu constater la difficulté de quantifier les rendements d'extraction et de digestion de la BuChE à partir de la solution de BuChE étalon. En effet, la quantité de BuChE estimée par les fournisseurs, ainsi que la pureté de la BuChE étant surestimées, cela a dans un premier entraîné une sous-estimation des taux de digestion et des rendements d'extraction de la BuChE en milieu pur. La quantité de BuChE réellement présente dans la solution commerciale a pu être évaluée grâce à un protocole fourni par O.Lockridge (Annexe 4), ce qui a permis de retrouver des valeurs cohérentes avec les rendements obtenus en milieu réel.

Les anticorps polyclonaux testés n'ayant présenté qu'une très faible affinité pour la BuChE, l'efficacité de trois anticorps monoclonaux pour l'extraction de la BuChE du plasma a été évaluée par la synthèse et la caractérisation de trois nouveaux immunoadsorbants. Après l'évaluation des rendements d'extraction de la BuChE non adduite dans le plasma, l'analyse en ligne a été appliquée à des échantillons de plasma dopés par des OPNA.

Finalement, les méthodes de purification de la BuChE par gels de procainamide ou d'huprine ont été comparées aux immunoadsorbants afin de confirmer le fort potentiel de ces derniers pour l'analyse des adduits OPNA-BuChE dans le plasma.

Ce chapitre se présente sous la forme d'un article, soumis à *Analytical, Bioanalytical Chemistry* (23 juin 2017).

Article 3: On-line coupling of immunoextraction, digestion and micro liquid chromatography-tandem mass spectrometry for the analysis of sarin and soman-butyrylcholinesterase adducts in human plasma

Maud Bonichon¹, Valentina Valbi¹, Audrey Combès¹, Charlotte Desoubries², Anne Bossée²,
Valérie Pichon^{1,4}

¹ Department of Analytical, Bioanalytical Sciences and Miniaturization (LSABM), UMR CNRS-ESPCI Paris, CBI 8231, PSL Research University, ESPCI Paris, 10 rue Vauquelin, Paris, France

² DGA, CBRN Defence, 5 rue Lavoisier, Vert-le-Petit, France

³ UPMC, Sorbonne University, 4 place Jussieu, Paris, France

Abstract

Organophosphorus nerve agent (OPNA) adducts formed with human butyrylcholinesterase (HuBuChE) can be used as biomarker of OPNA exposure. Indeed, intoxication by OPNA can be confirmed by the LC/MS² analysis of a specific HuBuChE nonapeptide on which OPNA covalently bind. A fast, selective and highly sensitive on-line method was developed to detect sarin and soman-adducts in plasma, including immunoextraction by anti-HuBuChE antibodies, pepsin digestion on Immobilized Enzyme Reactors (IMER) and microLC-MS² analysis of the OPNA-adducts. The potential of three different monoclonal antibodies, covalently grafted on sepharose, were compared for the extraction of HuBuChE. The on-line method developed with the most promising antibodies allowed to extract up to 100% of HuBuChE contained in plasma and to digest 45% of it in less than 40 min. Moreover, OPNA-HuBuChE adducts, aged OPNA-adducts and unadducted HuBuChE could be detected (with S/N > 2000), even in plasma spiked with low concentration of OPNA (10 ng.mL⁻¹). Finally, the potential of this method was compared to approaches involving other affinity sorbents, already described for HuBuChE extraction.

1. Introduction

Organophosphorus nerve agents (OPNA) are highly toxic chemical warfare agents that can bind to several proteins belonging to the serine esterase family (acetylcholinesterase, butyrylcholinesterase, carboxylesterase) [185, 186] or to albumin [187]. The acute toxicity of OPNA results from their binding on the active site of acetylcholinesterase (AChE) [188]. Inhibition of AChE activity leads to accumulation of acetylcholine on synaptic receptors and to a loss of nerve impulses transmission. [189]. Clinical symptoms appear as early as 50% inhibition of AChE activity and include myosis, twitching, seizures, hypersalivation and respiratory depression. Levels of inhibition greater than 90% induce severe poisoning that can cause death in a few minutes [5].

The upsurge of chemical attacks over the world stressed the importance of implementing sensitive and specific analytical methods for the detection of OPNA and their degradation products in blood or urine. The monitoring of cholinesterase activity in the blood of individuals by the Ellman assay is a simple, affordable and rapid approach for the measurement of OPNA exposure. However, it implies to have a baseline of the enzyme activity level, which is sometimes difficult because of the intra- and inter-individual enzyme activities variations due to age or health status [147]. Furthermore, this method does not distinguish OPNA from organophosphorus pesticides and is only limited to cholinesterase inhibition levels higher than 20%, which restricts the diagnosis of chronic intoxication [148, 188].

Identification of intact OPNA is also problematic, because of their short lifetime in blood, covalent binding to proteins and rapid hydrolysis [16]. Detection of OPNA metabolites in blood and urine can be carried out, after a preliminary sample treatment, by the use of gas chromatography after a derivatization step [190, 191] or liquid chromatography [31, 32, 192–194] coupled with high resolution tandem mass spectrometry. Although this method is more specific and sensitive than the Ellman assay, analysis has to be performed within 48 h after exposure to get significant levels of hydrolysis products. Indeed, 90% of metabolites are eliminated after this time span and their concentration become too low to be measured.

Fluoride reactivation can regenerate OPNA from cholinesterase, which allows the identification of the OPNA by GC/MS [195]. However, fluoride reactivation cannot allow to measure endogenous HuBuChE levels or aged OPNA adducts, which unable to evaluate the

extent of HuBuChE inhibition [104]. Besides, fluoride reactivation methods are limited by denaturing and spontaneous reactivation of the enzyme and ageing of OPNA adducts.

Detection of OPNA adducts is currently the most promising method. Indeed, OPNA form very stable adducts with HuBuChE, AChE and albumin, which allows their detection and identification by LC-MS² for several months after exposure. Albumin has been used as a biomarker of exposure because of its high concentration in plasma and the good stability of the OPNA-albumin adducts [142, 187]. However, AChE and HuBuChE are more often used than albumin because of their higher reactivity with OPNA that allows detecting lower levels of exposure [104]. Since HuBuChE is ten times more abundant than AChE, located in plasma and more sensitive to inhibition by some OPNA than AChE, analysis of OPNA-HuBuChE adducts has been preferred [46, 196, 197]. In most of the studies, HuBuChE is purified and digested by pepsin into the nonapeptide ¹⁹⁵FGESAGAAS²⁰³ which includes the OPNA moiety fixed on the 198 serine residue and the adducted nonapeptide is further identified by LC-MS² [104, 147, 178, 198]. One of the limitations of this method comes from a phenomenon called ageing during which the alkoxy-group of the adducted OPNA moiety is cleaved and replaced by a hydroxyl function [174]. Ageing occurs in a few minutes for soman to a couple of days for VX. As the aged adducts of diverse OPNA possess identical chemical structure, the OPNA cannot be identified unambiguously [50]. Despite that, the measurement of aged OPNA-adducts is essential to avoid underestimating or missing the exposure in case of total aging of OPNA before sampling or during storage [198]. Aside from ageing, the critical step of these methods is the extraction of HuBuChE from plasma. Indeed, HuBuChE is a low abundant protein in plasma (4 µg.mL⁻¹) which implies to perform a purification step to extract and isolate HuBuChE from the most concentrated proteins (e.g. albumin).

On-column procainamide gel extractions have been frequently used to purify HuBuChE from plasma [7, 40, 43, 49, 53, 174, 199–202]. However, this method is considered as poorly sensitive, time-consuming and requires large volume of sample or additional purification steps. Another support was recently developed by Brazzolotto *et al.* for the extraction of HuBuChE using huprine-sepharose affinity gel [50]. This support has a higher binding capacity and specificity than procainamide gels and would lead to HuBuChE purity between 54% to 90%, which could not be achieved in a single step using procainamide-based affinity, according to Brazzolotto *et al.* Alternatively, the purification by immunomagnetic beads [14, 101, 104, 147, 178, 198] is more sensitive and specific, requires lower amount of plasma and is faster than the procainamide approach. Nevertheless, the

antibodies fixed on the magnetic beads are digested in most of the protocols, which excludes the reusability of the beads and increases the cost of the procedure. Besides, apart from the recent work of Mathews *et al.* [108], the immunomagnetic methods were not applied to the simultaneous detection of OPNA and OPNA aged adducts.

Very recently we developed an on-line system based on immunosorbents (IS) and immobilized enzyme reactors (IMER) coupled to microLC-MS², for the total analysis of native HuBuChE from plasma (publication in process). Using the set-up described in Erreur ! Source du renvoi introuvable., HuBuChE was extracted from 50 μ L of plasma by B2 18-5 monoclonal antibodies in only 14 min, before being digested for 20 min on a pepsin-based IMER. After digestion, HuBuChE peptides were concentrated on a trap column and directly transferred to the analytical system. The target nonapeptide was detected in about 20 min. In the present work, we took advantage of this optimized on-line method to study the potential of three monoclonal antibodies (mAb2, 3E8 and B2 18-5), grafted on sepharose, to extract HuBuChE from plasma. The repeatability of the extraction was evaluated for each IS in triplicate as well as the repeatability of IS synthesis. The procedure was then applied to plasma samples spiked with sarin and soman, for the detection of OPNA-HuBuChE adducts and their aged forms. Finally, IS were compared to the huprine and procainamide approaches by evaluating the sensitivity of the three methods for the identification of unadducted and OPNA-HuBuChE adducts in plasma.

2. Experimental

2.1. Chemicals

Pepsin from porcine gastric mucosa, sodium azide (NaN₃), sodium chloride (NaCl), Trizma hydrochloride (NH₂C(CH₂OH)₃, HCl), cyanogen bromide-activated Sepharose 4B (90 μ m, 700 Å) and tetramethylammonium chloride were purchased from Sigma Aldrich (Saint-Quentin Fallavier, France). Potassium dihydrogen phosphate (KH₂PO₄), di-sodium hydrogen phosphate (Na₂HPO₄), sodium bicarbonate (NaHCO₃) sodium acetate (CH₃CO₂Na), acetic acid (CH₃COOH), formic acid (HCOOH), glycine and hydrochloric acid were purchased from VWR (Fontenay-sous-Bois, France). Sodium hydroxide was obtained from Merck (Darmstadt, Germany). HPLC-grade acetonitrile was ordered from Carlo Erba (Val de Reuil, France). High purity water was obtained from a Milli-Q purification system (Millipore, Saint

Quentin en Yvelines, France). Amicon Ultra-4 mL (100 kDa) and 0.5 mL centrifugal filters (10 kDa) were obtained from Merck Millipore (Darmstadt, Germany). BCA protein assay reagents were from Thermo Fisher Scientific (Illkirch, France). Synthetic nonapeptide (FGESAGAAS, MW: 795.3 g.mol⁻¹) was obtained from Proteogenix (Schiltigheim, France). Procainamide sepharose 4 fast flow (24 μmol procainamide/mL of gel) was purchased from GE Healthcare (Uppsala, Sweden). Huprine-sepharose was a gift from Dr. Florian Nachon (French Defence Health Service, Bretigny, France).

Monoclonal antibodies against human BuChE mAb2 and B2 18-5 were kindly provided by Prof. Oksana Lockridge (University of Nebraska, Medical Center) and monoclonal anti-HuBuChE antibody 3E8 was purchased from Thermo Fisher Scientific (HAH 002-01-02). The phosphate buffer saline solution (pH = 7.4) consisted of 0.01 mol.L⁻¹ of both Na₂HPO₄ and KH₂PO₄ and 0.15 mol.L⁻¹ of NaCl.

Human plasmas from two healthy individuals without known exposure to OPNA were obtained from the Centre de Transfusion Sanguine des Armées (Clamart, France). In these samples, the couple sodium citrate/citric acid was used as anticoagulant. Human plasma samples spiked with sarin and soman were provided by DGA/CBRN Defence (Vert-le-Petit, France). Two plasma-sarin samples were obtained after addition of 50 μL of a sarin solution at 1 or 10 μg.mL⁻¹ in isopropanol to 5 mL of plasma. The resulting sarin-plasma sample spiked at 10 ng.mL⁻¹ was incubated at 25 °C for 2 h while the sample spiked at 100 ng.mL⁻¹ was incubated for 17 h at 37 °C to ensure that most of HuBuChE was adducted and that aged sarin adducts were formed. The plasma-soman sample at 10 ng.mL⁻¹ was obtained by incubating 50 μL of a soman solution at 1 μg.mL⁻¹ in isopropanol to 5 mL of plasma, for only 30 min at 25°C to avoid excessive ageing of soman. The plasma samples were aliquot in 500 μL and stored at -20°C or -80°C (plasma spiked with sarin at 37°C) until further use.

2.2. MicroLC-MS analysis

The chromatographic system was equipped with a micro-pump (Dionex Ultimate 3000, controlled by Chromeleon 6.8 SR11) and with a Acclaim PepMap 100 column (C18, 150 x 1 mm I.D., 3 μm, 100 Å, Thermo Scientific), preceded by a Hypersil Gold trap column (C18, 10 x 1 mm I.D., 5 μm, Thermo Scientific). Mobile phase A was water acidified with 0.1% formic acid and mobile phase B was acetonitrile with 0.1% formic acid. The separation of OPNA-adducted and unadducted HuBuChE nonapeptides was achieved at a flow rate of 50

$\mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$ with a gradient varying from 2% to 90% B in 20 min. Detection was achieved with a triple quadrupole mass spectrometer (TSQ Quantum Access MaxTM, Thermo Scientific) assembled with an ESI source (IonMax source probe HESI-II). Ionization was performed in positive mode with a source voltage set at 3000 V, capillary temperature at 250 °C, sheath gas and auxiliary gas pressures at 10, vaporizer temperature at 80 °C, tube lens offset at 70 V and skimmer offset at 0 V. The three most intense b-fragments of the HuBuChE nonapeptide, b_8 , $b_{8-\text{H}_2\text{O}}$ and $b_{7-\text{H}_2\text{O}}$, fragmented with a 30 eV collision energy, were followed in MRM mode (m/z 796.3 \rightarrow 691.3; 796.3 \rightarrow 673.3; 796.3 \rightarrow 602.3 respectively). Calibration curves were performed for these three MRM transitions by injecting 5 μL of different concentrations of a synthetic nonapeptide (6.8, 33.8, 67.5, 338, 675 $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$) into the microLC-MS² to quantify the nonapeptide resulting from HuBuChE immunoextraction and digestion by microLC-MS². The linear regression equations and coefficient values of the regression curves obtained for the transitions m/z 796.3 \rightarrow 602.3, 796.3 \rightarrow 673.3 and 796.3 \rightarrow 691.3 were respectively $y = 45372 x + 876.04$, $R^2 = 0.999$; $y = 42509 x + 2232.1$, $R^2 = 0.996$; $y = 53669 x - 264.52$, $R^2 = 0.999$. The calibration curves are shown in supplementary material (*S4, Annexe 3*).

The monitoring of the sarin-nonapeptide adduct ($m/z = 916.4$) was performed by following the transitions 916.4 \rightarrow 602.3 and 916.4 \rightarrow 673.3 and the soman-nonapeptide adduct ($m/z = 958.4$) was detected with the transitions 958.3 \rightarrow 602.3 and 958.3 \rightarrow 673.3. The aged sarin and soman-nonapeptide adduct ($m/z = 874.3$) were detected with the transitions 874.3 \rightarrow 602.3 and 874.3 \rightarrow 673.3. These transitions were chosen according to previous studies on these adducts [107, 108, 174, 198].

2.3. Synthesis of pepsin-based IMER

The pepsin-based IMER was prepared following the protocol previously developed by our group [176]. Briefly, 1.7 mL of a 4 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ pepsin solution in 0.1 $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ sodium acetate was put in contact with 58 mg of CNBr activated sepharose for 16 h at 4 °C. Then, 50 mg from the 58 mg sorbent, were packed in a 30 x 2.1 mm I.D. precolumn. A glycine solution (pH = 2) was percolated through the precolumn at a flow rate of 400 $\mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$ for 200 min to block the remaining uncoupled sites. The gel was washed three times with sodium acetate (pH = 5.8) and HCl (1 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$) for 16 min at 400 $\mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$ to remove unbound enzymes. Finally, IMER was stored at 4 °C for months in a formic acid solution (pH = 2.2). As previously described [176], bicinchoninic acid (BCA) assay was used to evaluate the

amount of pepsin immobilized on sepharose. Two calibration curves were made by adding 10 μL of pepsin at a concentration range varying from $100 \mu\text{g.mL}^{-1}$ to 4 mg.mL^{-1} in a 96 wells microplate. Then, 10 μL of the working reagent were added in each microwell and the microplate was incubated at $37 \text{ }^\circ\text{C}$ for 30 min. The absorbance was measured at 562 nm. Pepsin grafting yields were calculated by dividing the amount of pepsin remaining in the supernatant, evaluated thanks to the calibration curves, by the initial amount of pepsin introduced in the coupling solution.

2.4. Synthesis of sepharose-based immunosorbents

The anti-HuBuChE antibodies mAb2, B2 18-5 and 3E8 were grafted on sepharose similarly to the procedure already developed by our team for other antibodies [171]. The CNBr activated sepharose (35 mg) was swollen for 15 min in 1 mL of HCl (1 mmol.L^{-1}) and washed two times with NaHCO_3 (0.1 mol.L^{-1} , $\text{pH} = 8.3$) containing NaCl 0.5 mol.L^{-1} . Then, 100 μg of anti-HuBuChE antibodies diluted in 100 μL of PBS (0.01 mol.L^{-1} , $\text{pH} = 7.4$), were added to sepharose. After incubation under stirring at 4 rpm, for 24 h at $4 \text{ }^\circ\text{C}$, the sorbent was packed into a precolumn (20 x 2 mm I.D.). The precolumn was connected to a pump and in order to block the remaining uncoupled sites of sepharose, a Tris buffer solution (0.1 mol.L^{-1} , $\text{pH} = 8$) was percolated for 2 h at $400 \mu\text{L.min}^{-1}$, at room temperature. The gel was washed 3 times to remove unbound antibodies with 4 mL of acetate solution (0.1 mol.L^{-1} + NaCl 0.5 mol.L^{-1} , $\text{pH} = 4$) and 4 mL of NaHCO_3 ($\text{pH} = 8.3$). The immunosorbents were stored at $4 \text{ }^\circ\text{C}$ in a PBS-azide solution and were reused for months. They were called IS mAb2_{SP}, B2 18-5_{SP} and 3E8_{SP}. Similarly to IMER, a BCA assay was performed to quantify the antibodies remaining in the supernatant after grafting and thus to evaluate the amount of antibodies immobilized on sepharose. The grafting yields were calculated by dividing the absorbance of antibodies remaining in the supernatant by the absorbance of the solution used for the grafting.

2.5. Purification of HuBuChE and OPNA-HuBuChE adducts from plasma

2.5.1. Immunosorbents and IMER coupled on-line to microLC-MS²

The complete analysis of HuBuChE from plasma was performed on the set-up described on Figure 38, The immunosorbent (mAb2_{SP}, 3E8_{SP} or B2 18-5_{SP}), coupled on-line

to the IMER and to the analytical system, was conditioned for 30 min with PBS buffer (pH = 7.4) at $50 \mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$. Then, $100 \mu\text{L}$ of a diluted plasma sample (plasma/PBS 1/1 v/v) were percolated through the immunosorbent that was further washed with $700 \mu\text{L}$ of PBS ($0.1 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$, pH = 7.4) to remove non-specifically retained plasmatic proteins. To avoid exceeding the volume of IMER ($62 \mu\text{L}$) and to digest a maximum of HuBuChE, the protein was eluted in two times from the IS through the IMER by $62 \mu\text{L}$ of formic acid (pH = 2.2), at $50 \mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$. A digestion by stop flow was performed for 10 min after each elution step. The resulting HuBuChE peptides were transferred from the IMER to the trap column by $250 \mu\text{L}$ of formic acid (pH = 2.2) before being eluted by the LC mobile phase to the analytical system. Immunosorbents were regenerated after each immunoextraction by a solution of PBS (pH = 7.4) for at least 24 h at $4 \text{ }^\circ\text{C}$ before being re-used. The same procedure was applied for the analysis of plasma samples spiked with OPNA.

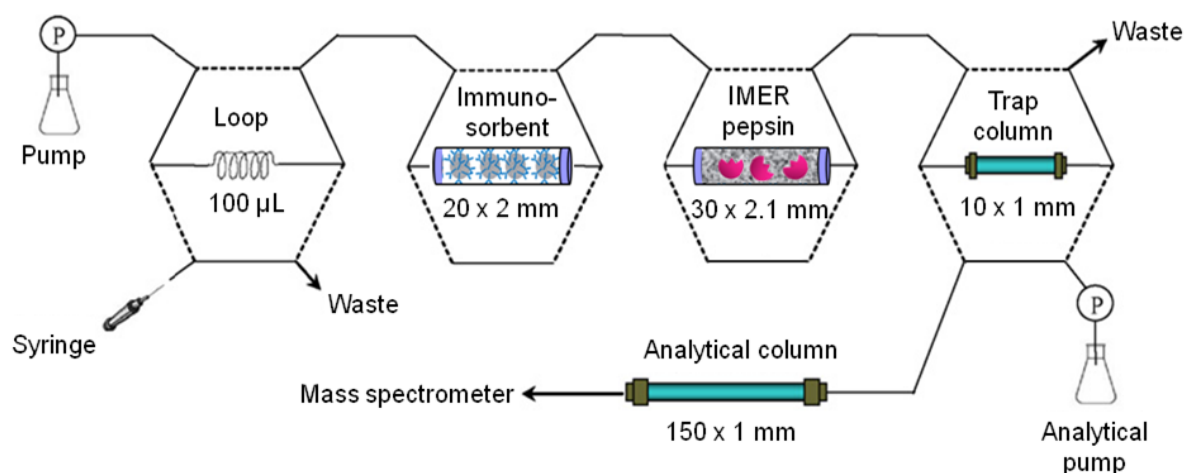


Figure 38. Set-up used for the on-line immunoextraction, followed by pepsin digestion and analysis of HuBuChE in $50 \mu\text{L}$ of plasma

2.5.2. Procainamide gel

Procainamide-sepharose gel from GE Healthcare (2.5 mL) was preconditioned with 15 mL of buffer A ($15 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1} \text{ Na}_2\text{HPO}_4$, $5 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1} \text{ NaH}_2\text{PO}_4$, pH = 6.7) and $100 \mu\text{L}$ of plasma was added and gently mixed with the gel, following Liu *et al.* protocol [49]. The mixture was incubated for 1 hour at room temperature and shaken at a speed of 60 rpm. The mixture was poured in a 6 mL SPE column (between two PTFE frits) and washed with 10 mL of Buffer A before being eluted with 4.5 mL of buffer B ($15 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1} \text{ Na}_2\text{HPO}_4$, $5 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$

NaH_2PO_4 , 2 mmol.L^{-1} NaCl , $\text{pH} = 6.7$). The 4.5 mL eluate was collected and concentrated about $110 \text{ }\mu\text{L}$ using a 4.0 mL 100-kDa cut-off filter by two successive centrifugation steps at 4500 rpm for 20 min . Then, $400 \text{ }\mu\text{L}$ of solution C (0.2 mol.L^{-1} formic acid) were added and the solution was filtered with a 100-kDa cut-off filter at 4500 rpm for 7 min . The resulting proteins on the filter were diluted to $110 \text{ }\mu\text{L}$ with solution C. Two different digestions by pepsin were applied to digest HuBuChE obtained after this filtration. First, a digestion in solution was performed at 37°C for 1 h by adding $16.0 \text{ }\mu\text{L}$ of a 2.0 mg.mL^{-1} pepsin solution in solution C to the $110 \text{ }\mu\text{L}$ protein extract. The digested solution was size fractionated with a prewashed 10 kDa cut-off filter to remove pepsin or proteins and $5 \text{ }\mu\text{L}$ of the peptides solution were injected into the microLC-MS² system. Alternatively, the protein solution recovered on the filter was diluted by 2 into $125 \text{ }\mu\text{L}$ of formic acid ($\text{pH} = 2.2$) to be digested on IMER, similarly to the digestion applied after immunoextraction. The $125 \text{ }\mu\text{L}$ were collected into a syringe, connected to a syringe-pump and the solution was pushed through the IMER at $50 \text{ }\mu\text{L.min}^{-1}$ by $62 \text{ }\mu\text{L}$ of formic acid $\text{pH} = 2.2$ and digested by stop flow for 10 min . This step was repeated twice. The peptides were then transferred with $250 \text{ }\mu\text{L}$ of formic acid at $50 \text{ }\mu\text{L.min}^{-1}$ to the trap column to be analyzed by microLC-MS².

2.5.3. Huprine gel

Huprine-sepharose gel (1 mL) was put in a 6 mL SPE column and equilibrated with 5 mL of a Tris buffer (0.02 mol.L^{-1} , NaCl 0.1 mol.L^{-1} , pH 7.4) [50]. Then, $50 \text{ }\mu\text{L}$ of plasma or plasma spiked with 10 ng.mL^{-1} of sarin was diluted by two in a PBS buffer ($\text{pH} = 7.4$, 0.1 mol.L^{-1}) and loaded onto the huprine gel column. After extensive washing with the same buffer (5 mL) and with 5 mL of Tris 0.02 mol.L^{-1} containing NaCl 0.25 mol.L^{-1} (pH 7.4), HuBuChE was eluted with 2.5 mL of Tris (0.02 mol.L^{-1} , NaCl 0.25 mol.L^{-1} , pH 7.4) containing 0.5 mol.L^{-1} tetramethylammonium chloride. The eluate was concentrate about $110 \text{ }\mu\text{L}$ using a prewashed 100-kDa cut-off filter by centrifugation at 4500 rpm for 10 min . Then, $400 \text{ }\mu\text{L}$ of formic acid ($\text{pH} = 2.2$) were added and the solution was filtered with a 100-kDa cut-off filter at 4500 rpm for 5 min . The resulting solution was diluted to $125 \text{ }\mu\text{L}$ with formic acid $\text{pH} = 2.2$ and digested on IMER before being analyzed as previously mentioned.

3. Results and discussion

3.1. Analysis of plasma without OPNA by the on-line coupling of IS and IMER to microLC-MS²

The aim of this study was to compare the potential of three anti-HuBuChE monoclonal antibodies (3E8, mAb2 and B2 18-5) grafted on sepharose, to extract HuBuChE and OPNA-adducted-HuBuChE from plasma. Antibodies 3E8 are commercially available, and were mainly used for the extraction of HuBuChE from plasma, using the immunomagnetic approach [87, 104, 106–108, 147, 178, 198]. The use of mAb2 and B2 18-5 antibodies for HuBuChE purification is more recent and was developed by Oksana Lockridge, using different immobilization supports like Pansorbin cells [106], Dynabeads-Protein G [4, 87, 106] or CNBr-activated sepharose [52, 109]. In these works [87, 106], the potential of the three antibodies to extract unadducted HuBuChE from plasma was compared, but only in a semi-quantitative way. Indeed, the amount of HuBuChE bound on antibodies was evaluated by comparing the HuBuChE activity in plasma that may vary before and after extraction, without taking into account the elution step. Moreover, the comparison of the potential of these three antibodies to extract OPNA-adducted HuBuChE has never been done before and will be discussed in the present work.

For this, immunosorbents (3E8_{SP}, mAb2_{SP} and B2 18-5_{SP}) were synthesized by the covalent grafting of 100 µg of anti-HuBuChE antibodies on 35 mg of CNBr-activated sepharose, packed in 20 x 2 mm I.D. precolumns. To compare the affinity of the antibodies towards HuBuChE, it was necessary to ensure that similar amounts of antibodies were grafted on the IS by controlling the amount of antibodies grafted on sepharose. Antibody grafting yields on sepharose were evaluated by BCA assay for the three IS and similar values, between 95% and 97% were obtained (Table 6), attesting the efficient grafting of antibodies.

Table 6. Grafting yields of 100 μg of monoclonal antibodies B2 18-5, 3E8 and mAb2 on sepharose and HuBuChE recovery yields obtained after immunoextraction of 50 μL of plasma on the resulting immunosorbents, pepsin digestion on IMER and microLC-MS² analysis.

Antibodies	Immunosorbents	Antibody grafting yields	Global HuBuChE recovery yields (n = 3)
B2 18-5	B2 18-5 _{SP}	95%	42 \pm 3 %
3E8	3E8 _{SP}	95%	28 \pm 4 %
mAb2	mAb2 _{SP}	97%	47 \pm 7 %

To evaluate their ability to extract HuBuChE, each IS was coupled on-line to the IMER and the microLC-MS² analysis as described in Figure 38. The coupling of immunosorbent to the on-line digestion set-up had already been optimized in a previous study (publication in process), thus the same conditions were applied for the coupling with IS B2 18-5_{SP}, IS mAb2_{SP} and IS 3E8_{SP}. Briefly, 700 μL of PBS (0.1 mol.L⁻¹, pH = 7.4) were used to transfer 50 μL of plasma to the IS and to wash it, this volume allowing the removal of more than 99.9% of albumin, the most concentrated protein in plasma. HuBuChE was eluted from the IS to the IMER, to be digested by two consecutive stop flow digestions, for 20 min. The peptides were transferred and concentrated into a trap column and analysis was performed by microLC-MS². This procedure was applied in triplicate for each IS to evaluate their respective affinity towards HuBuChE.

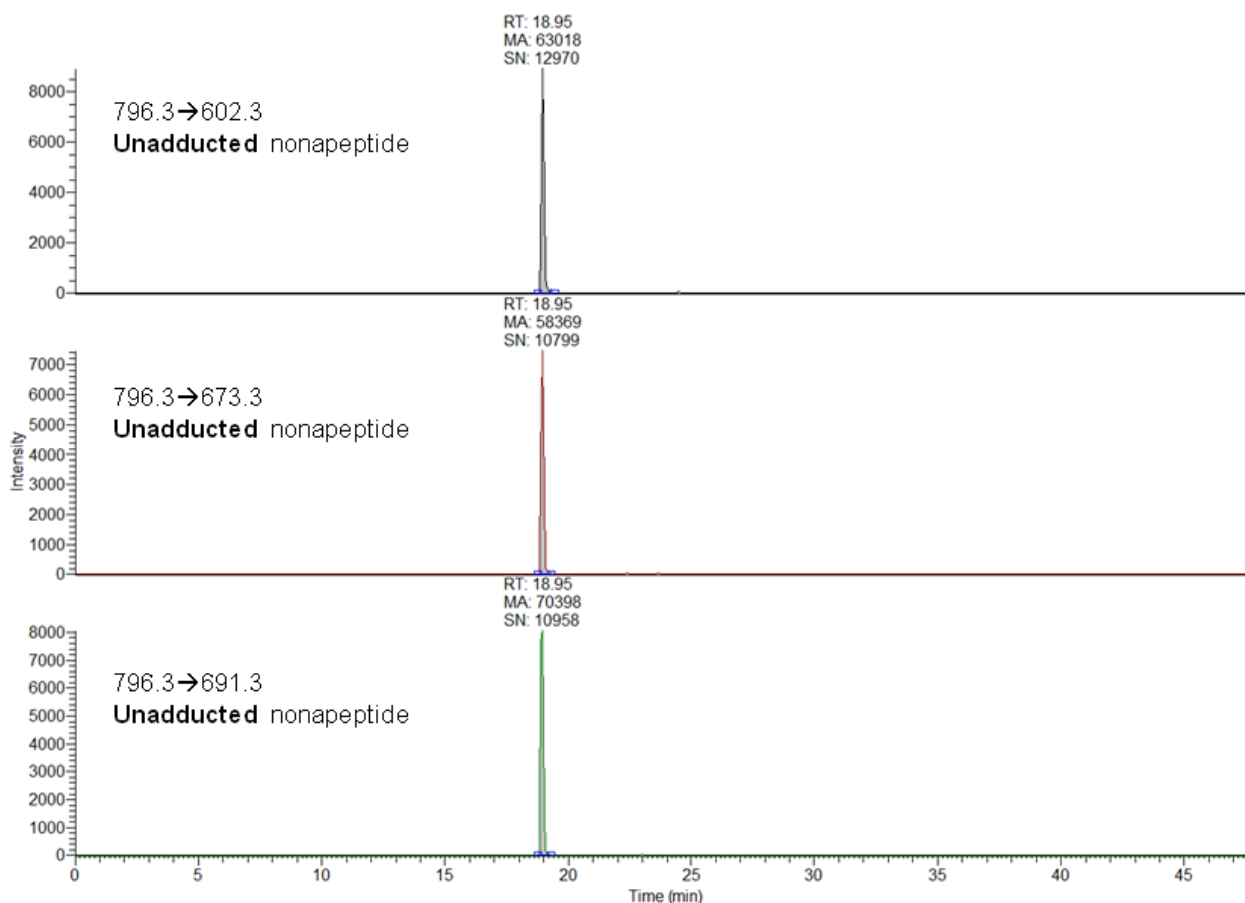


Figure 39. MRM chromatograms of the nonapeptide obtained after immunoextraction of 50 μ L of HuBuChE from plasma on IS mAb2_{SP} and its digestion on IMER followed by microLC-MS² analysis.

One example of chromatograms obtained after immunoextraction on IS mAb2_{SP} is shown in Figure 39. The intact nonapeptide was observed at 19.0 min with a signal/noise (S/N) higher than 10000, equivalent to a limit of quantification (LOQ) of 2 femtomoles (S/N = 10). Thanks to the nonapeptide calibration curves depicted Section 2.2., the amount of nonapeptide obtained after immunoextraction and digestion was quantified for each IS to compare their performances. Transitions 796.3→602.3 and 796.3→673.3 were used to quantify while 796.3→691.3 was used as qualitative ion. The total recovery of HuBuChE is shown on Table 6 and was calculated by dividing the amount of nonapeptide obtained after immunoextraction and digestion by the theoretical amount of nonapeptide corresponding to a 100% extraction and digestion yield. HuBuChE total recovery yield was $47 \pm 7\%$ for IS mAb2_{SP} and was $42 \pm 3\%$ for IS B2 18-5_{SP}, IS 3E8_{SP} was clearly less efficient ($28 \pm 4\%$). The total HuBuChE recovery could not dissociate HuBuChE extraction yields from the HuBuChE digestion yields. However, we demonstrated in a previous work (publication in progress) that HuBuChE digestion on IMER was repeatable ($45 \pm 4\%$) for amounts of HuBuChE similar to those present in 50 μ L of plasma (0.2 μ g). Considering a digestion yield of 45%, it was

estimated that IS mAb2_{SP} and B2 18-5_{SP} extract between 90% and 100% of HuBuChE and IS 3E8_{SP} about 60% of HuBuChE. Although the methods used to estimate the amount of HuBuChE bound on antibodies were different, these results were consistent with those described by Peng *et al.* for the extraction of HuBuChE from 500 μ L of plasma incubated overnight with B2 18-5, mAb2 and 3E8 antibodies, immobilized on Dynabeads-Protein G [87]. In this work, HuBuChE activity in plasma was measured before and after extraction and showed that B2 18-5 extracted about $97 \pm 1\%$ of HuBuChE, mAb2 about $72 \pm 16\%$ and 3E8 about $70 \pm 14\%$. Even, if mAb2_{SP} gave higher extraction yields compared to Peng *et al.*, this value was similar to the 95-98% extraction yields evaluated by Schopfer *et al.* for the extraction of HuBuChE from 500 μ L of human plasma incubated overnight with mAb2 grafted on sepharose beads [52]. Therefore, immunosorbents allowed, in less than 20 min, to obtain similar HuBuChE extraction yields to those obtained in one night for the same antibodies, using binding by partition. Finally, low RSD values were obtained using this online set-up (<15%), despite the variations due to this 4 steps procedure (immunoextraction, digestion, trapping of peptides and LC-MS² analysis), which confirmed the reliability of this on-line set-up.

3.2. Repeatability of the IS mAb2 synthesis

Even if the grafting yields of the three different anti-HuBuChE antibodies were similar, it was interesting to study the repeatability of the grafting for the same antibody. For that, the synthesis of IS mAb2_{SP} was performed in triplicate. This antibody was chosen for its high grafting yields on sepharose and its high HuBuChE extraction yields. After each grafting using 100 μ g of mAb2 antibodies on CNBr-sepharose and packing of the resulting gel into a precolumn (20 x 2 mm I.D.), the amount of antibodies grafted on sepharose was evaluated thanks to a BCA assay (Section 2.4.). Antibodies grafting yields of $94 \pm 3\%$ were obtained, attesting the high repeatability of the IS synthesis. As the synthesis of the first IS mAb2 was performed 12 months before the other two and by a different operator, it was concluded that a robust method was developed for the synthesis of immunosorbents. HuBuChE extraction yields were evaluated the same day on the three IS coupled on-line to IMER and microLC-MS², by percolating 50 μ L of a plasma sample (diluted 1/1 in PBS). An average HuBuChE recovery of $47 \pm 6\%$ was obtained, which was similar to the recovery obtained after three extractions on one IS mAb2 ($47 \pm 7\%$). Consequently, the high repeatability of the immunosorbents in terms of extraction yields and grafting yields was confirmed.

3.3. Analysis of plasma spiked with sarin and soman by the on-line coupling of IS and IMER to microLC-MS²

The same procedure was then applied to the analysis of sarin and soman-HuBuChE adducts. A plasma spiked with 100 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ of sarin for 17 h at 37°C was diluted 1/1 (v/v) in PBS (pH = 7.4) and analyzed using the on-line set-up previously described. Each immunosorbent was tested in triplicate to assess its potential to extract sarin-adducted HuBuChE, aged sarin-adducted HuBuChE as well as unadducted HuBuChE. As displayed in Figure 40, in a qualitative way, the MRM chromatograms showed that IS mAb2 could capture adducted and non-adducted HuBuChE, allowing the detection by microLC-MS² of the sarin-nonapeptide adduct at 20.5 min with a S/N of 26000 and the detection of the unadducted nonapeptide at 19.0 min. The aged-sarin adduct was also detected at a retention time of 20.2 min, with a relatively high signal intensity (S/N > 7000). This showed that despite the high concentration of sarin in the plasma sample, a small amount of HuBuChE was unadducted. It may be due to a kinetic competition between hydrolysis of sarin and its addition to HuBuChE and other proteins such as albumin [17]. For reasons of clarity, only MRM chromatograms with daughter ions $m/z = 673.3$ were displayed on Figure 40, although the transitions $796.3 \rightarrow 602.3$; $916.4 \rightarrow 602.3$ and $874.3 \rightarrow 602.3$ were acquired and showed the same phenomenon.

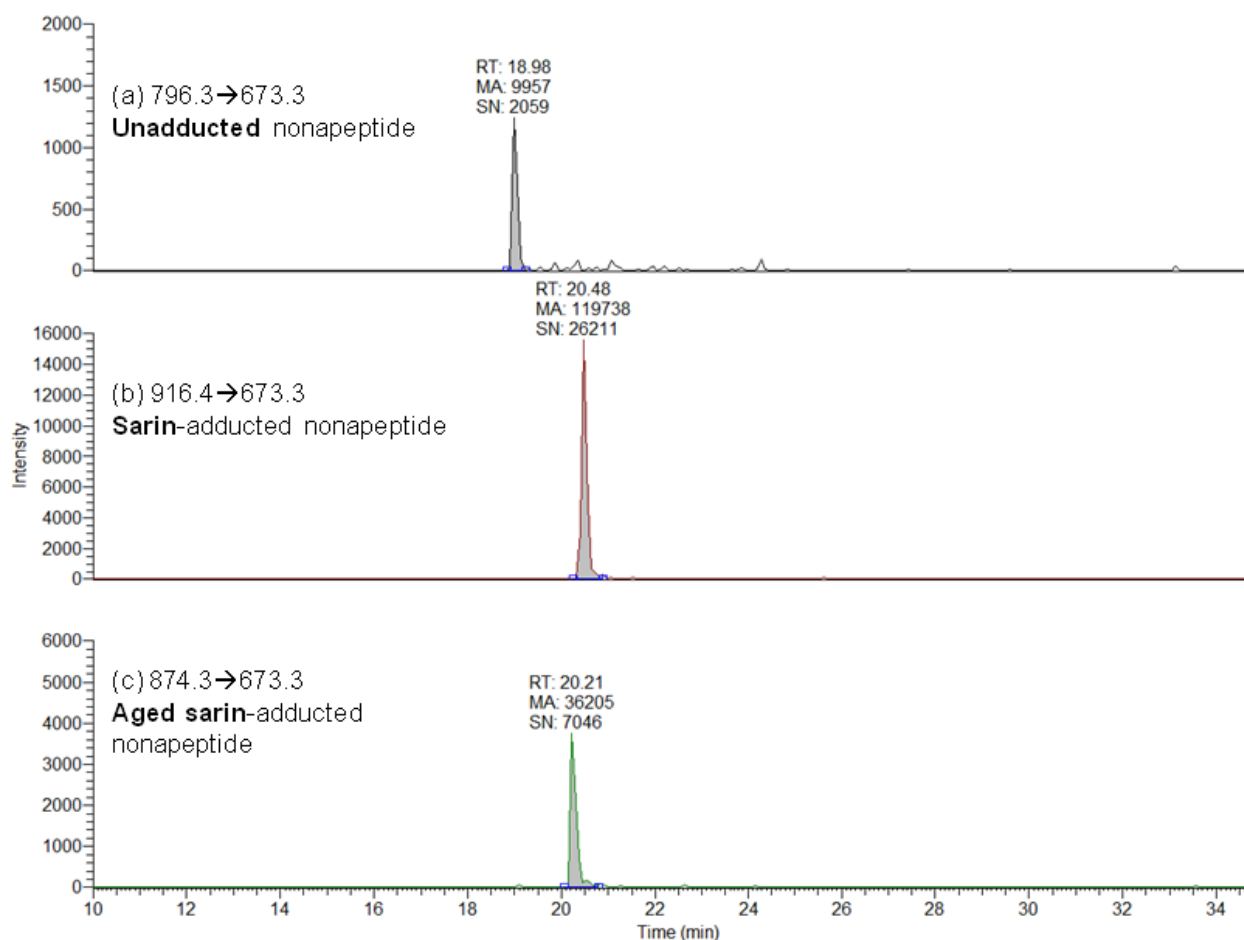


Figure 40. MRM chromatograms of the intact nonapeptide (A), sarin-nonapeptide adduct (B) and aged sarin-nonapeptide adduct (C) obtained after immunoextraction on IS mAb2_{SP} of 50 μ L of HuBuChE from plasma spiked with 100 $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ of sarin, and digestion on IMER, followed by microLC-MS² analysis.

As shown in Figure 41, the three antibodies can bind sarin-adducted and aged sarin-adducted HuBuChE as well as unadducted HuBuChE. By measuring the area of the peak of both OPNA-adducted and unadducted HuBuChE, the level of OPNA-adducted HuBuChE can be estimated, without the need of baseline HuBuChE activity measurement. As shown in Figure 41, close unadducted/sarin-adducted nonapeptide ratios were obtained for the 3 IS. The proportion of HuBuChE adducted with sarin was evaluated to $95 \pm 1\%$, by dividing the amount of sarin and aged-sarin adducted-nonapeptide to the total amount of nonapeptide (sum of unadducted, sarin and aged-sarin adducted nonapeptides). The largest amounts of sarin-adducts were extracted with IS mAb2_{SP} and B2 18-5_{SP}.

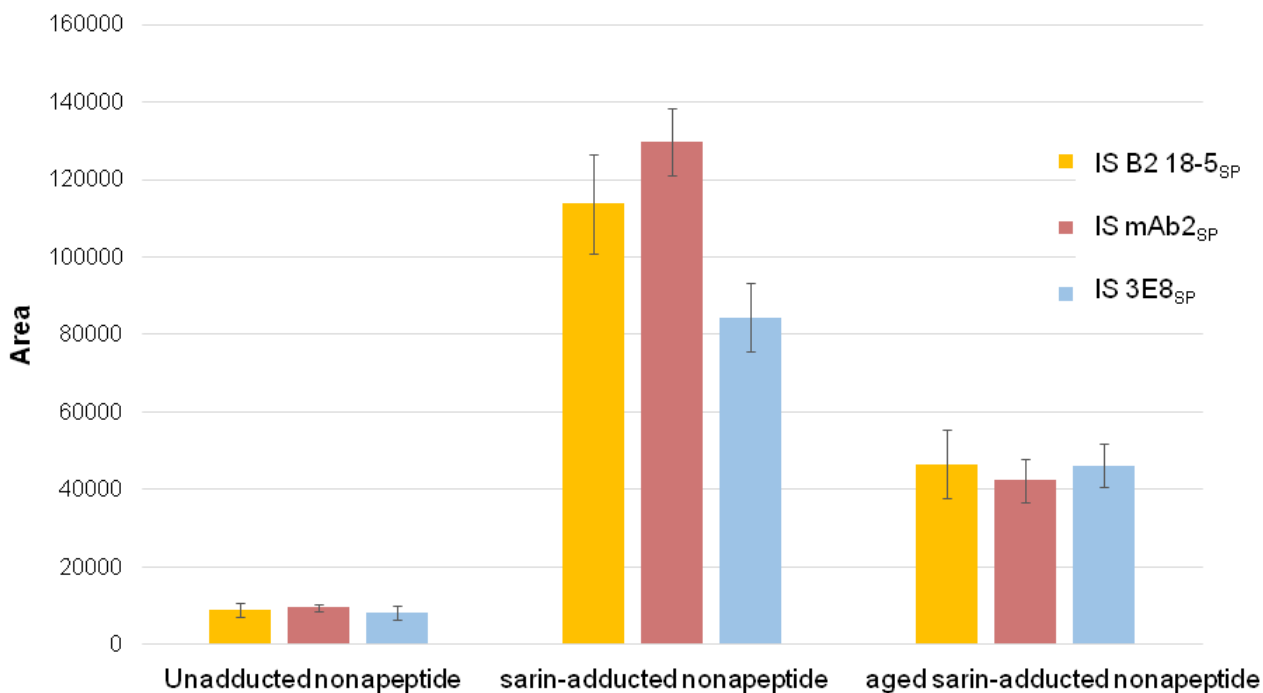


Figure 41. Peak area of the intact nonapeptide, sarin-nonapeptide adduct and aged sarin-nonapeptide adduct, obtained after immunoextraction of 50 μL of plasma spiked with sarin (100 $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$) on immunosorbents B2 18-5SP, mAb2SP and 3E8SP, followed by digestion on IMER and analysis by microLC-MS² (MRM transition 796.3 \rightarrow 673.3).

To ensure that no memory effect was observed on IS, after the immunoextraction of plasma spiked with sarin, a blank was performed on the three IS by injecting a plasma sample that was not spiked with OPNA. The Figure 42 shows that only intact nonapeptide was distinguishable after immunoextraction and thus, that IS could be reused without the risk of false positive results.

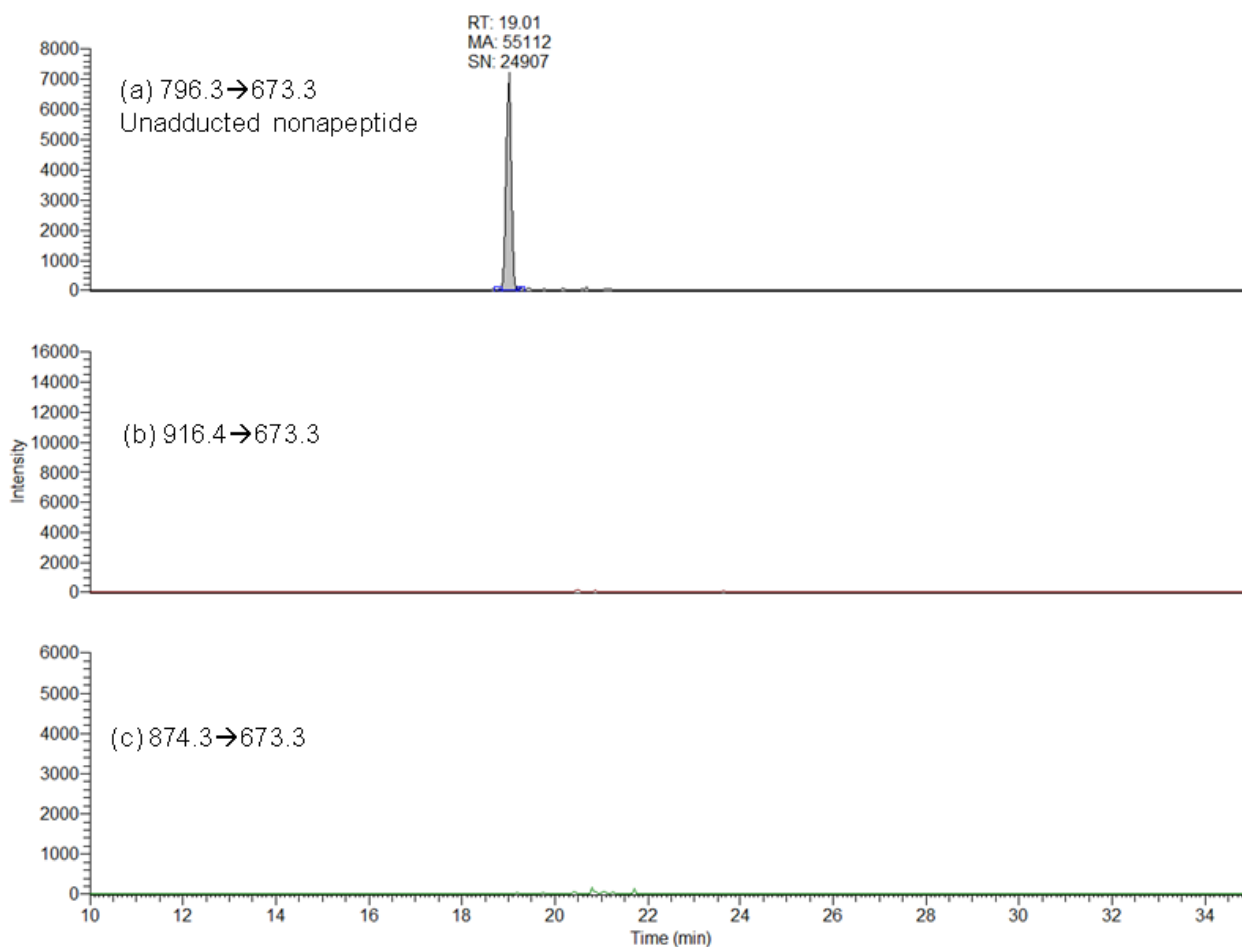


Figure 42. MRM chromatograms of the intact nonapeptide (A), obtained after immunoextraction of 50 μL of BuChE from plasma without OPNA, and its digestion on IMER, followed by microLC-MS² analysis. MRM transitions corresponding to the sarin-nonapeptide adduct (B) and to the aged sarin-nonapeptide adduct (C).

To evaluate the ability of the on-line method to detect lower amounts of OPNA in plasma, two plasma samples were incubated with only $10 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ of sarin and soman at 25°C . To be able to detect both the aged and un-aged OPNA adducts, sarin was incubated for 2 h and soman was incubated for only 30 min, because of its high ageing rate. The OPNA-spiked plasmas were analyzed using IS mAb2_{SP}. As depicted in Figure 43, MRM chromatograms clearly showed sarin-adduct, soman-adduct, and their aged adducts. As soman ages faster than sarin, the predominant form of soman-HuBuChE adduct in plasma after 30 min of incubation was the aged soman-adducted nonapeptide while the aged sarin-HuBuChE adduct was minority in plasma after 2 h of incubation. Unadducted nonapeptide was also observed in the two samples and was most intense in plasma spiked with soman

(S/N = 10000) than the one spiked with sarin (S/N = 2500, data not shown). It was estimated that 94% of HuBuChE was adducted after 2 h of incubation with sarin and 84% of HuBuChE was adducted with soman after 30 min of incubation. This was explained by the different incubation times but also by the lower reactivity of soman to HuBuChE because of its higher steric hindrance. To conclude, sarin-adduct, soman-adduct and their aged adduct can be easily identified by this on-line method, which would allow one to detect very low level of HuBuChE inhibition by OPNA in plasma, or to detect it in volumes of plasma much more lower than 50 μL .

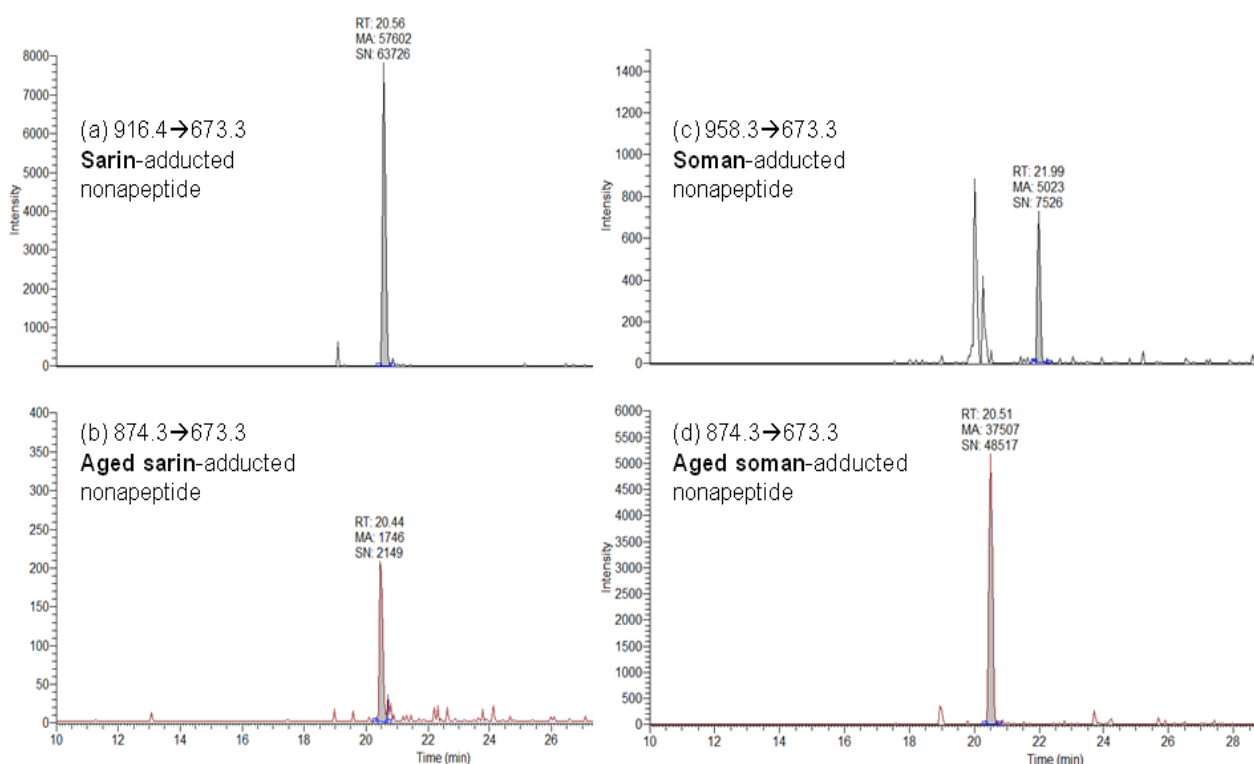


Figure 43. MRM chromatograms of the sarin-nonapeptide adduct (A), aged sarin-nonapeptide adduct (B), soman-nonapeptide adduct (C) and aged soman-nonapeptide adduct (D) obtained after immunoextraction of 50 μL of HuBuChE from plasma spiked with 10 $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ of sarin or soman and its digestion on IMER, followed by microLC-MS² analysis.

3.4. Comparison of the on-line set-up with the procainamide and huprine approaches

The efficiency of immunosorbents to selectively extract HuBuChE from plasma was compared to the most frequently used or efficient approaches found in literature to purify

HuBuChE. Procainamide gel, has been widely used to extract HuBuChE, combined or not with additional purification steps [7, 43, 49, 53, 174, 199, 203]. The method depicted by Liu *et al.* [49] put forward that more than 90% HuBuChE could be extracted with only one purification step with off-column procainamide gel. Consequently, this method was chosen and reproduced in this work closely as possible to compare HuBuChE recovery obtained after purification by procainamide to that obtained after on-line immunoextraction. For this, 100 μL of plasma was incubated with procainamide gel for 1 h and loaded on a SPE column for washing. HuBuChE was eluted and digested in solution for 1 h with a pepsin solution before being analyzed by microLC-MS². Extraction of HuBuChE from plasma and its digestion took more than three hours and the nonapeptide could not be observed by microLC-MS² by this method (data not shown). To avoid the presence of peptides resulting from pepsin digestion [176], the digestion step was alternatively performed on IMER for 2 x 10 min, by diluting the HuBuChE solution in 125 μL of formic acid, to mimic the digestion step applied after immunoextraction. However, HuBuChE digestion on IMER did not allow quantifying the nonapeptide, even if lower background noise was noticed (S/N <10). Liu *et al.* mentioned good extraction recovery of HuBuChE by procainamide gel but no information was given concerning the purity of the extract. The low nonapeptide intensity observed in our chromatograms could be explained by the difference of procainamide gels used in the two studies. Contrary to other teams [7, 43, 53, 174, 199, 203] and to our protocol, Liu *et al.* synthesized their own procainamide gel, which results in higher procainamide binding rate on sepharose (38 $\mu\text{mol}/\text{mL}$ of gel) and to higher capacity than procainamide gels commercially available (24 $\mu\text{mol}/\text{mL}$ of gel). However, even with this home-made procainamide gel, chromatograms shown by Liu *et al.* were less intense and clean than those obtained with on-line immunoextraction described in this work. Indeed, their MRM chromatograms, obtained after purification with procainamide gel and digestion of plasmas spiked with 0.1 $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ of VX or with 0.5 $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ of soman, were not intense, with S/N ratios close to 10.

Brazzolotto *et al.* developed a novel and fast protocol to purify recombinant HuBuChE using huprine-based affinity chromatography [50]. Huprine is known as a cholinesterase inhibitor and thus to have high affinity towards HuBuChE [204]. Huprine was immobilized on NHS-sepharose by Brazzolotto *et al.* and recombinant HuBuChE produced by CHO cells was purified on the huprine gel leading to purity up to 90%. To compare the potential of huprine to immunoextraction for the extraction of HuBuChE from plasma, the procedure mentioned by Brazzolotto *et al.* [50] was reproduced and was applied to 50 μL of plasma

sample. Briefly, after percolation of the plasma sample and washing of the sorbent to remove contaminants, HuBuChE was eluted from the huprine column and digested on IMER for 2 x 10 min to be analyzed by microLC-MS² similarly to the digestion procedure following immunoextraction and procainamide gel purification. Contrary to the chromatograms obtained after HuBuChE purification by procainamide gel, the unadducted nonapeptide was observed at 19.0 min (S/N >1200, data not shown), supporting the efficient extraction of HuBuChE from plasma by huprine. Besides, huprine purification was easier and faster (30 min) than the procainamide approach (2 h). Considering this results, huprine extraction protocol was applied to the analysis of 50 μL of plasma spiked with 10 $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ of sarin and the resulting chromatograms are shown in Figure 44. The sarin-adducted nonapeptide was detected at 20.4 min with a S/N above 3200 but the aged sarin adduct could not be detected, although it was clearly observed on the chromatograms shown in Figure 43b, obtained after on-line immunoextraction and digestion of the same plasma sample. The area of the sarin-adducted nonapeptide obtained after extraction by huprine (Figure 44) was 10 times inferior to the one obtained after immunoextraction (Figure 43a). Thus, it was estimated that the purification of HuBuChE by huprine was 10 times less efficient than the on-line immunoextraction

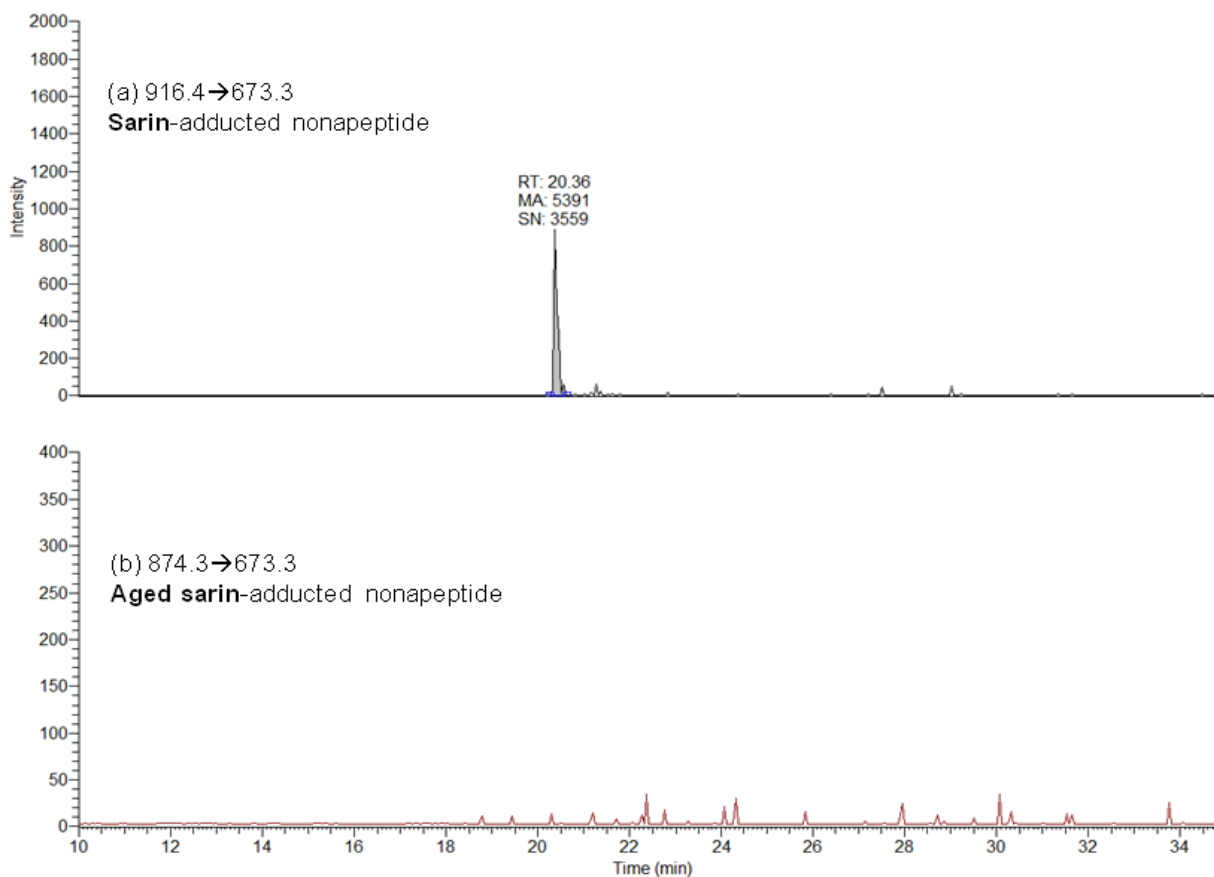


Figure 44. MRM chromatograms of the sarin-nonapeptide adduct (A) and aged sarin-nonapeptide adduct (B) obtained after purification on huprine of 50 μL of HuBuChE from plasma spiked with 10 $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ of sarin and its digestion on IMER for 20 min, followed by microLC-MS² analysis.

Finally, huprine-gel should be preferred to procainamide gel for the one-step purification of HuBuChE from plasma because of its higher selectivity for HuBuChE. However, the best results in terms of HuBuChE recoveries and sensitivity were obtained using the immunosorbent coupled on-line with IMER and microLC-MS², with extraction yields of HuBuChE up to 100% and high purity of the extract.

4. Conclusion

Three monoclonal anti-HuBuChE antibodies, mAb2, 3E8 and B2 18-5, were compared for the extraction of HuBuChE and OPNA-adducted HuBuChE from plasma. Antibodies were efficiently grafted on sepharose with grafting yields between 94% and 97% and with high repeatability (RSD < 3% for IS mAb2 synthesized in triplicate). The resulting immunosorbents were coupled on-line to the digestion step on IMER and to microLC-MS² and the HuBuChE nonapeptide was detected in less than 1 hour, with a LOQ of 2 fmol. The total HuBuChE recovery using this on-line set-up was estimated to $47 \pm 7\%$, with a HuBuChE extraction yield close to 100% for IS mAb2_{SP}. The measurement of both adducted and unadducted HuBuChE allowed estimating the percentage of OPNA-adducted HuBuChE in plasma. Aged-OPNA adducts, OPNA adducts and unadducted HuBuChE were easily detected in 50 μL of plasma spiked with $10 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ of sarin or soman. No memory effect was observed after percolating a plasma sample spiked with OPNA, showing that immunosorbents could be reused without false positive results. Finally, extraction on immunosorbent was compared to extraction with procainamide or huprine for the one-step purification of HuBuChE and it was concluded that IS was 10 times more efficient than huprine to extract HuBuChE from plasma and that procainamide gel was less inefficient.

In the future, this powerful method will be automated and apply to the fast analysis of simultaneous detection of several OPNA-adducts and aged-OPNA in human plasma.

Acknowledgment

The authors would like to thank Pr. Oksana Lockridge for providing mAb2 and B2 18-5 antibodies and Dr. Florian Nachon for providing huprine. This research was supported by Direction Générale de l'Armement (DGA), grant no. 140221.

CONCLUSION GENERALE

L'objectif de ce travail était de développer une méthode permettant l'analyse de composés organophosphorés neurotoxiques (OPNA) dans le plasma, sous forme adduite avec la butyrylcholinestérase. Dans un premier temps, une méthode nanoLC-MS² extrêmement sensible a été développée pour l'analyse et la quantification du nonapeptide de BuChE, utilisé comme biomarqueur d'intoxication par les OPNA. La sensibilité du système analytique a été démontrée à l'aide d'un nonapeptide de synthèse puis d'un nonapeptide issu de la digestion en solution de la BuChE, avec une limite de quantification estimée à quelques attomoles.

Ensuite, la digestion a été effectuée sur un support d'enzymes immobilisées (IMER) ce qui a permis une digestion efficace de la BuChE en seulement 20 min, malgré sa forte glycosylation. De très bons taux de digestion de la BuChE sur IMER ont pu être quantifiés, en utilisant un nonapeptide de synthèse comme étalon. La répétabilité des IMER a été évaluée par la synthèse d'un IMER en triplicat, ayant conduit à des IMER présentant des rendements de greffage et de digestion identiques. Divers paramètres tels que le volume de transfert, la température et le temps de digestion ont été optimisés. Enfin, la digestion de la BuChE sur IMER a été comparée à celle en solution, ce qui a confirmé la supériorité des IMER en termes de taux de digestion et de rapidité.

Dans un second temps, le couplage en ligne de l'IMER à l'analyse microLC-MS² a été entrepris. La digestion de la BuChE a été effectuée sur un IMER de dimensions supérieures et a mené à des taux de digestion de l'ordre de 42% en seulement 10 min. Par ailleurs, la digestion sur IMER s'est montrée répétable sur une gamme de concentration de la BuChE compatible avec celle du plasma.

Puis, des supports à base d'anticorps ont été développés, afin d'extraire sélectivement la BuChE du plasma. Ainsi, divers immunoabsorbants ont été préparés à partir du greffage d'anticorps anti-BuChE monoclonaux ou polyclonaux sur sépharose ou sur support de polyméthacrylate. Seuls les anticorps monoclonaux ont permis une extraction efficace de la BuChE avec des rendements d'extraction proches de 100%. Par ailleurs, l'utilisation de la sépharose en tant que support d'immobilisation a conduit à de meilleurs taux de greffage et d'extraction de la BuChE que ceux à base de polyméthacrylate. Après une étude portant sur l'optimisation du couplage entre l'IS et l'IMER, ces supports ont été couplés en ligne à l'analyse microLC-MS², ce qui a permis l'obtention et l'analyse du nonapeptide en moins d'une heure. De très bons résultats en termes de rendements et de répétabilité ont été obtenus

par ce couplage en ligne, avec un rendement total estimé à plus de 47%. Les interactions non spécifiques sur ces supports ont été évaluées en suivant la présence d'un peptide, après percolation du plasma, ce qui a permis d'estimer que les étapes de lavage permettaient d'éliminer plus de 99,9% d'albumine. Enfin, ce système en ligne a permis de quantifier le nonapeptide à partir d'un très faible volume de plasma (50 μ L), avec une limite de quantification de celui-ci de quelques femtomoles.

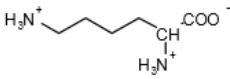
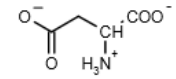
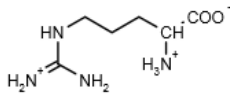
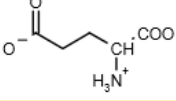
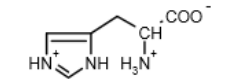
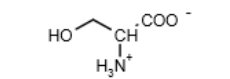
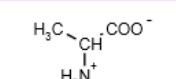
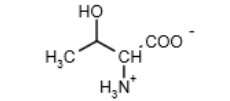
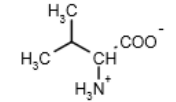
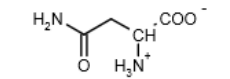
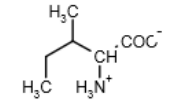
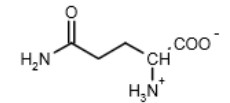
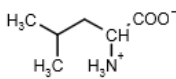
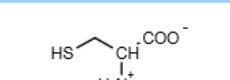
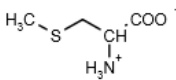
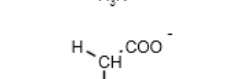
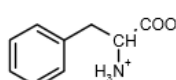
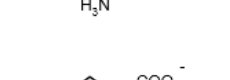
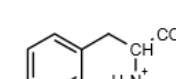
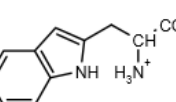
Ainsi, l'analyse en ligne ayant conduit à une analyse rapide, efficace et répétable, celle-ci a été appliquée à des échantillons de plasma dopés par des OPNA. Les adduits vieilliss et non adduits pouvant être simultanément détectés par cette méthode, le pourcentage de BuChE adduite par les OPNA a pu être estimé. Aucun effet mémoire n'a été observé après la percolation d'échantillons de plasma dopés par des OPNA, ce qui a prouvé que les immunoabsorbants pouvaient être réutilisés sans risque de faux positifs. Enfin, l'immunoextraction a été comparée aux extractions par gels de procainamide et d'huprine pour la purification de la BuChE du plasma. Il a été conclu que les immunoabsorbants étaient 10 fois plus efficaces que l'huprine pour extraire la BuChE du plasma et que la procainamide était peu efficace.

Cette méthode, pour l'instant uniquement appliquée au soman et au sarin, sera automatisée et pourra être appliquée à la détection et à la quantification simultanée de l'ensemble des OPNA les plus courants et de leur forme vieillie. Cela permettra d'identifier et de quantifier les OPNA dans des échantillons de plasma de personnes intoxiquées.

Finalement, ces résultats prometteurs nous encouragent à miniaturiser ces outils analytiques, qui permettront de réduire encore le volume d'échantillon et également de diminuer le coût de synthèse des supports, notamment par la réduction de la quantité d'anticorps à immobiliser. L'analyse nanoLC/MS² ayant déjà été mise au point lors de ces travaux de thèse, la synthèse d'immunoabsorbants et d'IMER en format capillaire pourra être envisagée, notamment par l'utilisation de colonne capillaire de type monolithique afin de développer un système d'analyse en ligne de la BuChE totalement miniaturisé.

ANNEXES

Annexe 1 : Classification, noms et structures des 20 acides aminés

		Basiques		Acides		
Basiques	Lysine	Lys (K)		Acide Aspartique	Asp (D)	
	Arginine	Arg (R)		Acide Glutamique	Glu (E)	
	Histidine	His (H)				
Polaires	Serine	Ser (S)		Alanine	Ala (A)	
	Threonine	Thr (T)		Valine	Val (V)	
	Asparagine	Asn (N)		Isoleucine	Ile (I)	
	Glutamine	Gln (Q)		Leucine	Leu (L)	
	Cystéine	Cys (C)		Methionine	Met (M)	
	Glycine	Gly (G)		Phénylalanine	Phe (F)	
	Proline	Pro (P)		Tyrosine	Tyr (Y)	
				Tryptophane	Trp (W)	
						Hydrophobes

Annexe 2 : Les agents chimiques de guerre

Depuis 1997, la convention sur l'Interdiction des Armes Chimiques (CIAC), stipule l'interdiction d'utiliser, de produire ou de stocker des armes chimiques aux états signataires. L'Organisation de l'Interdiction des Armes Chimiques (OIAC) a réparti les armes chimiques en plusieurs catégories, en fonction de leurs effets [205]:

Agent	Persistance	Vitesse d'action	Mode d'action	Effet physiologique	Diffusion
Agents suffocants • Chlore (Cl) • Phosgène (CG) • Diphosgène(DP) • Chloropicrine(PS)	<ul style="list-style-type: none"> • Faible • Faible • Faible • Faible 	<ul style="list-style-type: none"> • Variable • Retardée • Retardée • Rapide 	Absorption par les poumons	Il y a accumulation de fluide dans les poumons, entraînant l'asphyxie de la victime	Gaz
Agents vésicants • Ypérite (H, HD) • Moutarde à l'azote (HN) • Oxime de phosgène(CX) • Lewisite (L)	<ul style="list-style-type: none"> • Très élevée • Élevée • Faible • Élevée 	<ul style="list-style-type: none"> • Retardée • Retardée • Immédiate • Rapide 	Absorption par les poumons, la peau	Brûlures sur la peau, les muqueuses et les yeux; provoquent de grosses cloques sur la peau exposée; provoquent des cloques dans la paroi de la trachée et dans les poumons ; grand nombre de victimes; faible pourcentage de décès	Liquide, aérosol, vapeur et poussière
Agents hemotóxiqes • Cyanure d'hydrogène(AC) • Chlorure de cyanogène (CK) • Arsine (SA)	<ul style="list-style-type: none"> • Faible • Faible • Faible 	<ul style="list-style-type: none"> • Rapide • Rapide • Retardée 	Absorption par les poumons	Le cyanure détruit l'aptitude des tissus sanguins à utiliser l'oxygène, les "affame" et asphyxie le cœur	Gaz
Agents neurotoxiques • Tabun (GA) • Sarin (GB) • Soman (GD) • Cyclosarin(GF) • VX	<ul style="list-style-type: none"> • Faible • Faible • Modérée • Modérée • Très élevée 	<ul style="list-style-type: none"> • Très rapide • Très rapide • Très rapide • Très rapide • Rapide 	Absorption par les poumons (série G); contact avec la peau (VX)	Provoquent des convulsions, la perte du contrôle du corps, la paralysie musculaire, y compris la paralysie du cœur et du diaphragme; des doses mortelles peuvent entraîner le décès en 5 minutes	Liquide, aérosol, vapeur et poussière
Agents de lutte antiémeute • Gaz lacrymogène(CS) • Gaz poivré(OC)	<ul style="list-style-type: none"> • Faible • Faible 	<ul style="list-style-type: none"> • Immédiate • Immédiate 	Absorption par les poumons, la peau, les yeux	Provoquent des larmes, une toux et des irritations des yeux, du nez, de la bouche et de la peau; bloquent les voies respiratoires	Liquide, aérosol

Annexe 3 : Supplementary materials

Publication 1

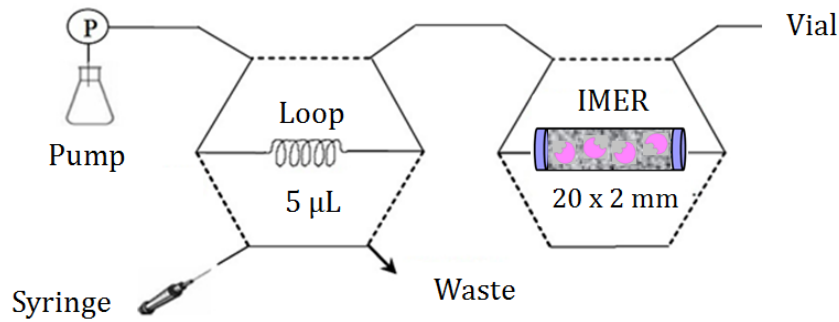


Figure S.1. Scheme of the assembly used to digest HuBuChE on IMER.

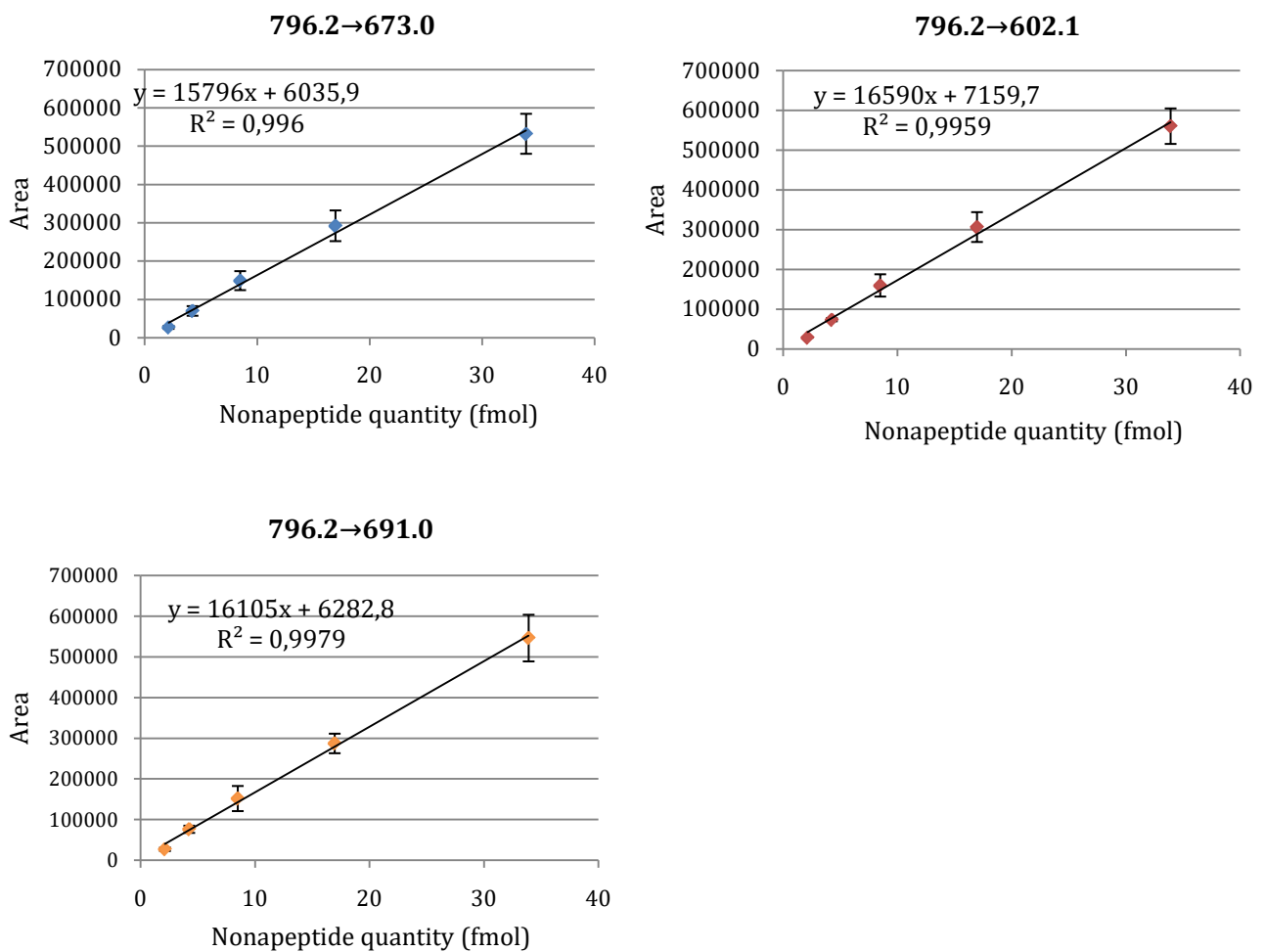


Figure S.2. Calibrations curves obtained after the injection of various amounts of synthetic nonapeptide varying from 2.12 fmol (6.75 ng.mL⁻¹) to 33.9 fmol (108 ng.mL⁻¹) for the transitions m/z 796.2→691.0; 796.2→673.0 and 796.2→602.1.

Publication 2

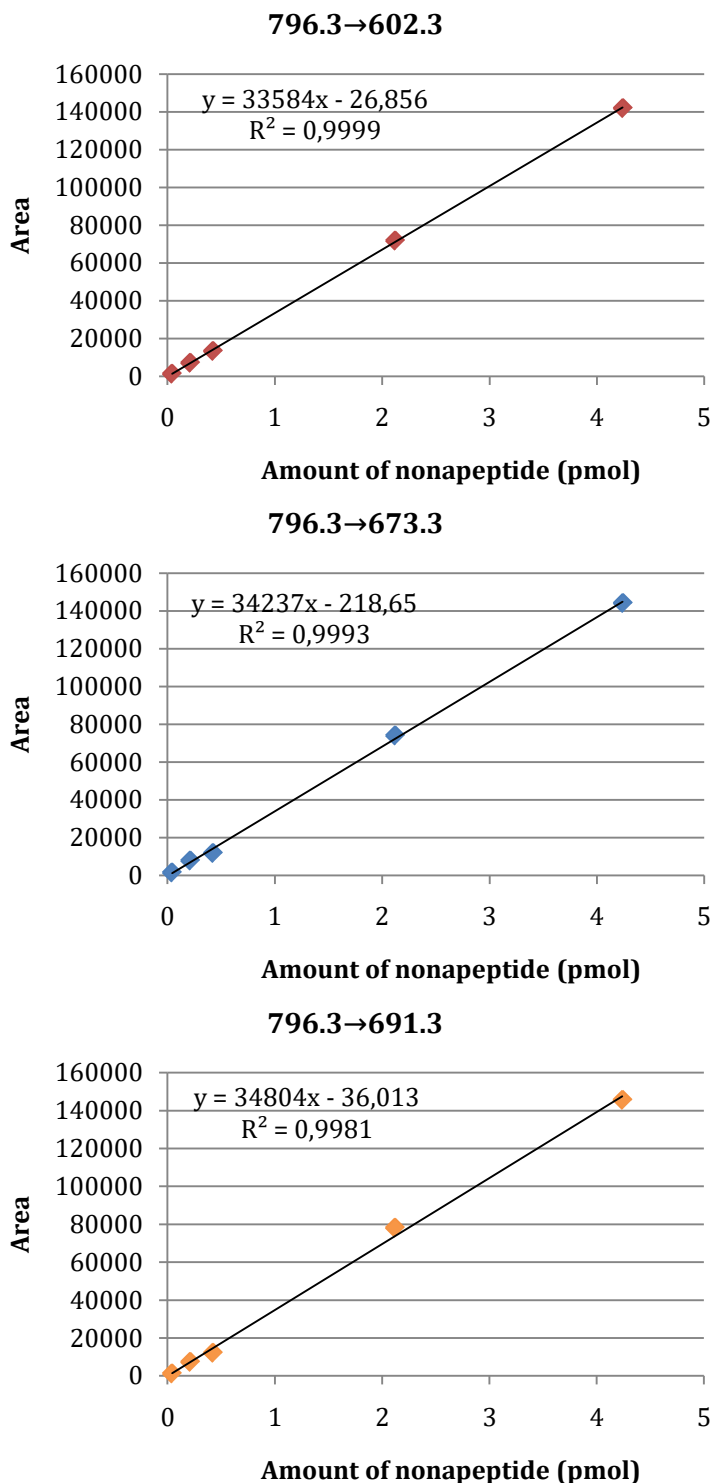


Figure S3. Calibration curves obtained after the injection of various amounts of synthetic nonapeptide varying from 0.04 pmol (6.75 ng.mL^{-1}) to 4.24 pmol (675 ng.mL^{-1}) for the transitions m/z 796.3→673.3; 796.3→602.3 and 796.3→691.3.

Publication 3

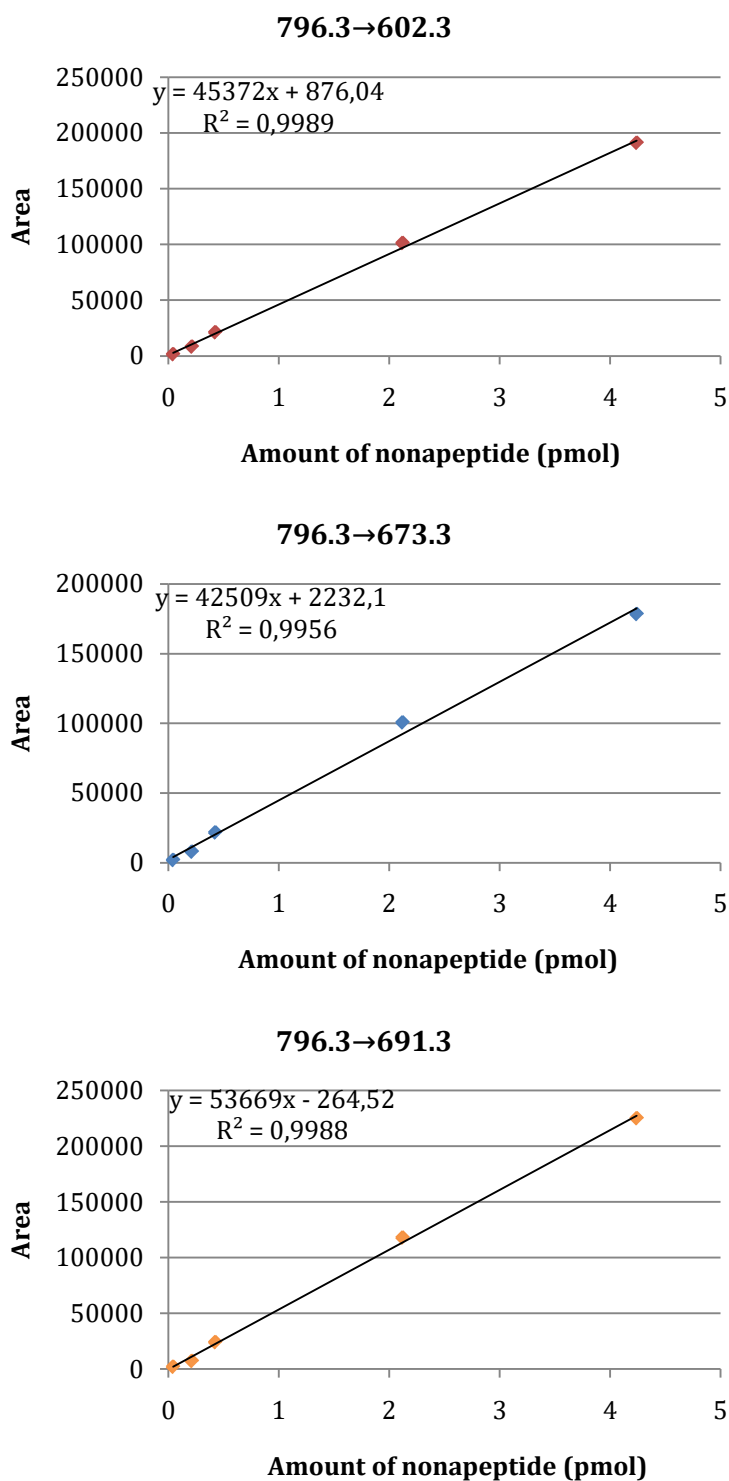


Fig. S4. Calibration curves obtained after the injection of various amounts of synthetic nonapeptide varying from 0.04 pmol (6.75 ng.mL⁻¹) to 4.24 pmol (675 ng.mL⁻¹) for the transitions m/z 796.3→602.3; 796.3→673.3 and 796.3→691.3.

Annexe 4 : Pureté d'une solution de BuChE commerciale LeeBiosolutions

Résultats fournis par Oksana Lockridge :

Dix unités de BuChE humaine lyophilisée ont été commandées chez Lee Biosolutions et ont été fournies avec le certificat d'analyse suivant:

Lyophilisée avec $0,02 \text{ mol.L}^{-1}$ ammonium bicarbonate

$25 \mu\text{g}$ protéine/flacon ($A_{280} E^{0.1\%} = 1.6$)

5 unités/flacon

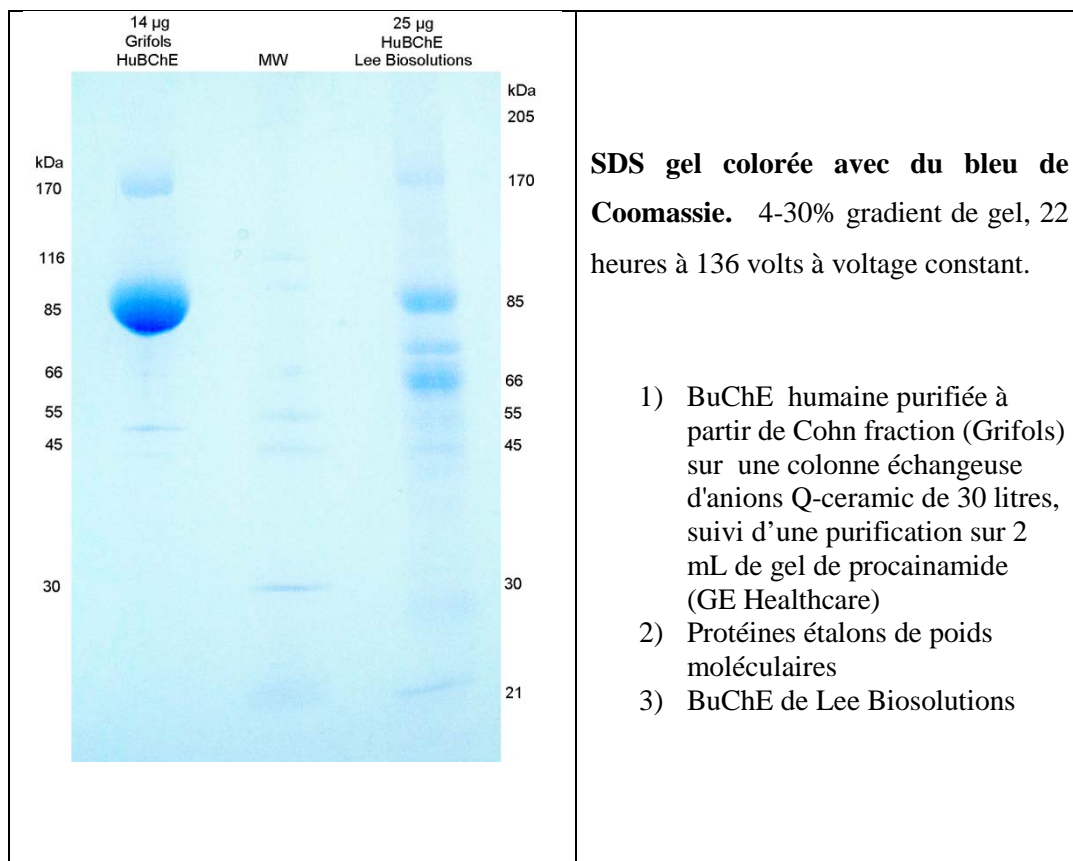
Activité spécifique : 200 unités (U)/mg protéine

La pureté de la BuChE a été calculée à partir de son activité spécifique. Actuellement, l'équipe d'Oksana Lockridge purifie la BuChE à partir de 80 kg de fraction de Cohn IV-4 achetés chez Grifols (Barcelone, Espagne) avec un rendement de 1,5 g de BuChE (750 000 U) par mois. La concentration de BuChE a été mesurée à grâce à un spectrophotomètre, dans une cuvette de quartz de 1 cm, en lisant l'absorbance à 280 nm, une solution de BuChE à 1 mg.mL^{-1} ayant une absorbance de 1,8 à 280 nm. L'activité enzymatique est mesurée dans du phosphate de potassium $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$ à pH 7,0 à 25°C avec 1 mmol.L^{-1} de butyrylthiocholine et $0,5 \text{ mmol.L}^{-1}$ de DTNB. La BuChE humaine pure, issue de la fraction de Cohn a une activité spécifique de 500 U.mg^{-1} .

A titre d'exemple, un échantillon de BuChE ayant une activité de 100 U.mL^{-1} et une absorbance à 280 nm de 0,36 a une activité spécifique de 500 U.mg^{-1} , ce qui le rend 100% pure. Ainsi, l'échantillon de BuChE fourni par LeeBiosolutions ayant une activité spécifique de 200 U.mg^{-1} , il n'est pur qu'à 40 %.

Afin de confirmer la présence de protéines contaminantes dans l'échantillon de BuChE commerciale, l'intégralité d'un flacon contenant 5 unités de BuChE a été utilisé pour un test sur gel SDS. Le flacon a été centrifugé avant son ouverture pour s'assurer que l'intégralité de la poudre lyophilisée est au fond du tube puis $25 \mu\text{L}$ d'eau ont été ajoutés au flacon contenant les 5 unités de BuChE. En théorie, un rendement de 200 U.mL^{-1} devrait être obtenu, cependant une valeur de seulement 50 U.mL^{-1} a été mesurée : il est possible que la poudre ne se soit pas totalement dissoute.

Afin d'évaluer la présence de protéines contaminantes par gel SDS, 11 µl de SDS/DTT ont été ajoutés aux 25 µL de BuChE et l'échantillon a été bouilli pendant 3 min. Après centrifugation, l'échantillon a été percolé dans un puit du gel SDS. Les résultats sont présentés ci-dessous. D'après le certificat d'analyse (5U = 25 µg de BuChE), une quantité de 25 µg de BuChE était attendue. Il apparaît que la quantité de BuChE présente dans l'échantillon est largement inférieure aux 14 µg de BuChE pure servant de référence. De plus, la présence de poids moléculaires ne correspondant pas à la BuChE nous informe que la BuChE fournie par Lee Biosolutions est contaminée par l'albumine (65 kDa) et par d'autres protéines.



LISTE DES TABLEAUX ET FIGURES

Liste des figures

Figure 1. Formation d'une liaison peptidique entre deux acides aminés [1].....	20
Figure 2 : Représentation des structures primaires, secondaires, tertiaires et quaternaires.....	21
Figure 3. Procédure de catalyse enzymatique. Adapté de [2].....	22
Figure 4. Réaction d'hydrolyse de l'acétylcholine par les cholinestérases.	23
Figure 5. Structure primaire de la butyrylcholinestérase humaine.....	24
Figure 6. Structure tétramérique de la BuChE (A) et vue détaillée de son site actif (B). Adapté de [5].	24
Figure 7. Evolution des agents neurotoxiques après exposition.	27
Figure 8. Processus de vieillissement et de réactivation spontanée de l'adduit. EOH se rapporte à l'AChE ou la BuChE native. Adapté de [8].....	28
Figure 9. Représentation de la gamme dynamique de concentration de protéines dans le plasma humain. Issu de [41].	32
Figure 10. Structure chimique de la procainamide	33
Figure 11. Structure chimique de l'huprine.....	34
Figure 12. Peptides obtenus après clivage enzymatique de la BuChE par deux protéases, la chymotrypsine et la pepsine. Issu de [42]......	35
Figure 13. Digestion de l'adduit OPNA-BuChE par la pepsine menant à un nonapeptide contenant l'OPNA.....	37
Figure 14. Schéma d'un spectromètre de masse triple quadripôle.....	38
Figure 15. Nomenclature des fragments peptidiques. Issu de [1].....	39
Figure 16. Schéma de fragmentation du nonapeptide FGESAGAAS au niveau des liaisons amides (sans OP). Le nombre en indice de b correspond au nombre d'acide aminés contenus dans le fragment.	39
Figure 17 : Représentation schématique d'une molécule d'IgG. Issu de [58].	45
Figure 18. Vue d'ensemble de la production d'anticorps [59].	46
Figure 19. Procédure d'immunoextraction sur cartouche.....	47
Figure 20. Représentation des réactions de greffage covalent entre un anticorps et un support activé par du CNBr (a), un aldéhyde (b), un époxyde (c), du carbonyldiimidazole (d) et du NHS (e). Issu de [1].	51

Figure 21 : Illustration schématique de la procédure d'extraction et de digestion de la BuChE avant l'analyse par LC-MS ² . La BuChE est extraite par un complexe anticorps-biotine fixé à des billes magnétiques de streptavidine et digérée avec de la trypsine. Adapté de [14].	53
Figure 22 . Influence de la température sur l'activité de la pepsine immobilisée ou en solution. Issu de [133].	62
Figure 23 : Représentation schématique du système analytique de digestion pepsique en ligne couplé à la LC-MS/MS (ESI/QTOF). A gauche, injection de l'échantillon vers l'IMER et la colonne. A droite, séparation des peptides sur la colonne et régénération de la cartouche. Issu de [57].	64
Figure 24 . Présentation du montage en ligne en format micro pour l'analyse d'une protéine ciblée après immunoextraction et digestion en ligne. Issu de [1].	66
Figure 25 . Extracted ion chromatograms and fragmentation spectra of the synthetic nonapeptide FGESAGAAS (m/z 796) (A) and of the nonapeptide resulting from the digestion of HuBuChE in solution (B).	81
Figure 26 . Amount of pepsin immobilized on 35mg of CNBr-activated sepharose grafted by 3 different amounts of pepsin in solution (1.7, 6.8 and 13.6 mg in 1.7 mL of coupling solution).	83
Figure 27 . Influence of the transfer volume on the digestion yields of 7.1 pmol of HuBuChE ₁ digested during 20 minutes at 27°C on IMER 1.7 prepared with 1.7 mg of pepsin (3 digestions).	84
Figure 28 . Influence of the digestion time on the digestion yields of 7.1 pmol of HuBuChE ₁ digested at 27°C on IMER 6.8B prepared with 6.8 mg of pepsin with a transfer volume of 30 µL (3 digestions).	86
Figure 29 . Digestion yields obtained after the digestion of 7.1 pmol of HuBuChE ₂ by pepsin in solution (E/S: 10) at 37°C during 2 h (1 digestion) and obtained after the digestion at 27°C of 7.1 pmol of HuBuChE ₂ during 20 min on 3 IMERs prepared with 6.8 mg of pepsin and one IMER prepared with 13.6 mg of pepsin (3 digestions each).	88
Figure 30 . Schéma du greffage de biomolécules sur la résine en fonction du pH et de la température.	94
Figure 31 . Set-up used for the immunoextraction of 5 µL of HuBuChE solution on the immunosorbents (A). Set-up used for the on-line pepsin digestion of 5 µL of HuBuChE solution on IMER and its analysis by microLC-MS (B). Set-up used for the on-line immunoextraction, followed by pepsin digestion and analysis of HuBuChE in 50 µL of plasma (C). The trap column concentrated the peptides.	103
Figure 32 . Amount of mouse IgG grafted on epoxy resin (30 mg) depending on the pH, the temperature and the grafting time.	108
Figure 33 . UV analysis (λ= 280 nm) of the effluent of B2 18-5 _{ER} immunosorbent (20 x 2 mm I.D.) after percolation of 5 µL of a HuBuChE solution (1.5 µg). The grey chromatogram corresponds to the percolation and washing steps (PBS solution pH = 7.4 at 100 µL.min ⁻¹) and the black chromatogram to the elution step (formic acid solution pH = 2.2 at 100 µL.min ⁻¹).	110
Figure 34 . Total ion chromatogram of the nonapeptide/cytochrome C digest mixture (A) and the extracted ion chromatogram of the nonapeptide FGESAGAAS (m/z 796.3) (B).	112

Figure 35. MRM chromatograms (transitions 796 →602, 796 →673 and 796 →691) of the target nonapeptide obtained after on-line digestion of 2.4 μg of HuBuChE on IMER 1 for 20 min and its analysis by microLC-MS². 115

Figure 36. Amount of HuBuChE digested on IMER 2 in 10 min depending on the amount of HuBuChE introduced. 117

Figure 37. MRM chromatograms of the nonapeptide FGESAGAAS obtained after on-line immunoextraction of HuBuChE from 50 μL plasma and digestion on IMER 2, followed by microLC-MS² analysis. The immunoextraction was performed in 14 min on IS B2 18-5_{SP}, the digestion on IMER 2 occurred in 20 min and the peptides were analyzed by mass spectrometry in MRM mode (transitions 796 →602, 796 →673 and 796 →691). 119

Figure 38. Set-up used for the on-line immunoextraction, followed by pepsin digestion and analysis of HuBuChE in 50 μL of plasma 133

Figure 39. MRM chromatograms of the nonapeptide obtained after immunoextraction of 50 μL of HuBuChE from plasma on IS mAb2_{SP} and its digestion on IMER followed by microLC-MS² analysis. 137

Figure 40. MRM chromatograms of the intact nonapeptide (A), sarin-nonapeptide adduct (B) and aged sarin-nonapeptide adduct (C) obtained after immunoextraction on IS mAb2_{SP} of 50 μL of HuBuChE from plasma spiked with 100 ng.mL⁻¹ of sarin, and digestion on IMER, followed by microLC-MS² analysis. 140

Figure 41. Peak area of the intact nonapeptide, sarin-nonapeptide adduct and aged sarin-nonapeptide adduct, obtained after immunoextraction of 50 μL of plasma spiked with sarin (100 ng.mL⁻¹) on immunosorbents B2 18-5SP, mAb2SP and 3E8SP, followed by digestion on IMER and analysis by microLC-MS² (MRM transition 796.3 →673.3). 141

Figure 42. MRM chromatograms of the intact nonapeptide (A), obtained after immunoextraction of 50 μL of BuChE from plasma without OPNA, and its digestion on IMER, followed by microLC-MS² analysis. MRM transitions corresponding to the sarin-nonapeptide adduct (B) and to the aged sarin-nonapeptide adduct (C). 142

Figure 43. MRM chromatograms of the sarin-nonapeptide adduct (A), aged sarin-nonapeptide adduct (B), soman-nonapeptide adduct (C) and aged soman-nonapeptide adduct (D) obtained after immunoextraction of 50 μL of HuBuChE from plasma spiked with 10 ng.mL⁻¹ of sarin or soman and its digestion on IMER, followed by microLC-MS² analysis. 143

Figure 44. MRM chromatograms of the sarin-nonapeptide adduct (A) and aged sarin-nonapeptide adduct (B) obtained after purification on huprine of 50 μL of HuBuChE from plasma spiked with 10 ng.mL⁻¹ of sarin and its digestion on IMER for 20 min, followed by microLC-MS² analysis. 146

Liste des tableaux

Table 1. Les 4 principaux OPNA [8].	26
Table 2. Demi-vies de vieillissement et de réactivation spontanée (en heure) de l'AcChE et la BuChE humaines inhibées par des agents neurotoxiques. Issu de [8].	28
Table 3. Exemple de conditions de digestion de la BuChE en solution par la pepsine décrites dans la littérature	36
Table 4. Structure et masses $[M+H]^+$ des 4 adduits organophosphorés les plus courants et de leur forme vieillie. Issu de [42].	40

REFERENCES

1. Cingoz Annabelle (2009) Analyse d'une protéine ciblée par immunoaffinité et digestion sur microréacteur enzymatique couplés à une analyse par chromatographie liquide et spectrométrie de massesynthèse, caractérisation et miniaturisation des outils bioanalytiques.
2. Vargas-Bernal R, Rodriguez-Miranda E, Herrera-Prez G (2012) Evolution and Expectations of Enzymatic Biosensors for Pesticides. *Pestic. - Adv. Chem. Bot. Pestic.*
3. Soreq H, Ben-Aziz R, Prody CA, Seidman S, Gnatt A, Neville L, Lieman-Hurwitz J, Lev-Lehman E, Ginzberg D, Lipidot-Lifson Y (1990) Molecular cloning and construction of the coding region for human acetylcholinesterase reveals a G + C-rich attenuating structure. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87:9688–9692.
4. Peng H, Blake TA, Johnson RC, Dafferner AJ, Brimijoin S, Lockridge O (2016) Monoclonal Antibodies That Recognize Various Folding States of Pure Human Butyrylcholinesterase Can Immunopurify Butyrylcholinesterase from Human Plasma Stored at Elevated Temperatures. *ACS Omega* 1:1182–1191. doi: 10.1021/acsomega.6b00311
5. Masson P, Carletti E, Nachon F (2009) Structure, activities and biomedical applications of human butyrylcholinesterase. *Protein Pept Lett* 16:1215–1224.
6. Lockridge O, La Du BN (1986) Amino acid sequence of the active site of human serum cholinesterase from usual, atypical, and atypical-silent genotypes. *Biochem Genet* 24:485–498.
7. Schans MJ van der, Fidder A, Oeveren D van, Hulst AG, Noort D (2008) Verification of Exposure to Cholinesterase Inhibitors: Generic Detection of OPCW Schedule 1 Nerve Agent Adducts to Human Butyrylcholinesterase. *J Anal Toxicol* 32:125–130. doi: 10.1093/jat/32.1.125
8. Worek F, Koller M, Thiermann H, Szinicz L (2005) Diagnostic aspects of organophosphate poisoning. *Toxicology* 214:182–189. doi: 10.1016/j.tox.2005.06.012
9. Sun J, Lynn BC (2007) Development of a MALDI-TOF-MS method to identify and quantify butyrylcholinesterase inhibition resulting from exposure to organophosphate and carbamate pesticides. *J Am Soc Mass Spectrom* 18:698–706. doi: 10.1016/j.jasms.2006.11.009
10. Sporty JLS, Lemire SW, Jakubowski EM, Renner JA, Evans RA, Williams RF, Schmidt JG, Schans MJ van der, Noort D, Johnson RC (2010) Immunomagnetic Separation and Quantification of Butyrylcholinesterase Nerve Agent Adducts in Human Serum. *Anal Chem* 82:6593–6600. doi: 10.1021/ac101024z
11. Retour sur l'attaque chimique du 21 août à Damas. http://www.lemonde.fr/proche-orient/article/2013/08/28/retour-sur-l-attaque-chimique-du-21-aout-a-damas_3467538_3218.html. Accessed 3 Nov 2014

12. Montly statistical report on victims <http://vdc-sy.net>, consulté le 16 mai 2017.
13. Assassinat de Kim Jong-nam : la Malaisie expulse l'ambassadeur nord-coréen. http://www.liberation.fr/planete/2017/03/04/assassinat-de-kim-jong-nam-la-malaisie-expulse-l-ambassadeur-nord-coreen_1553289, consulté le 20/06/2017.
14. Aryal UK, Lin C-T, Kim J-S, Heibeck TH, Wang J, Qian W-J, Lin Y (2012) Identification of phosphorylated butyrylcholinesterase in human plasma using immunoaffinity purification and mass spectrometry. *Anal Chim Acta* 723:68–75. doi: 10.1016/j.aca.2012.02.023
15. Jiang W, Murashko EA, Dubrovskii YA, Podolskaya EP, Babakov VN, Mikler J, Nachon F, Masson P, Schopfer LM, Lockridge O (2013) Matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry of titanium oxide-enriched peptides for detection of aged organophosphorus adducts on human butyrylcholinesterase. *Anal Biochem* 439:132–141. doi: 10.1016/j.ab.2013.04.018
16. Black RM (2010) History and perspectives of bioanalytical methods for chemical warfare agent detection. *J Chromatogr B* 878:1207–1215. doi: 10.1016/j.jchromb.2009.11.025
17. Marsillach J, Costa LG, Furlong CE (2013) Protein adducts as biomarkers of exposure to organophosphorus compounds. *Toxicology* 307:46–54. doi: 10.1016/j.tox.2012.12.007
18. Carter MD, Crow BS, Pantazides BG, Watson CM, Thomas JD, Blake TA, Johnson RC (2013) Direct Quantitation of Methyl Phosphonate Adducts to Human Serum Butyrylcholinesterase by Immunomagnetic-UHPLC-MS/MS. *Anal Chem* 85:11106–11111. doi: 10.1021/ac4029714
19. W.K. Berry and D.R. Davies Factors influencing the rate of 'aging' of a series of alkyl methylphosphonyl-acetylcholinesterases. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1265173/>. Accessed 15 Oct 2014
20. Ellman GL, Courtney KD, Andres V Jr, Feather-Stone RM (1961) A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochem Pharmacol* 7:88–95.
21. Nigg HN, Knaak JB (2000) Blood cholinesterases as human biomarkers of organophosphorus pesticide exposure. *Rev Environ Contam Toxicol* 163:29–111.
22. Eyer F, Meischner V, Kiderlen D, Thiermann H, Worek F, Haberkorn M, Felgenhauer N, Zilker T, Eyer P (2003) Human parathion poisoning. A toxicokinetic analysis. *Toxicol Rev* 22:143–163.
23. Lotti M (1995) Cholinesterase inhibition: complexities in interpretation. *Clin Chem* 41:1814–1818.
24. Degenhardt-Langelaan CE, Kientz CE (1996) Capillary gas chromatographic analysis of nerve agents using large volume injections. *J Chromatogr A* 723:210–214.

25. Reiter G, Mikler J, Hill I, Weatherby K, Thiermann H, Worek F (2011) Simultaneous quantification of VX and its toxic metabolite in blood and plasma samples and its application for in vivo and in vitro toxicological studies. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 879:2704–2713. doi: 10.1016/j.jchromb.2011.07.031
26. Hooijschuur EWJ, Kientz CE, Brinkman UAT (2002) Analytical separation techniques for the determination of chemical warfare agents. *J Chromatogr A* 982:177–200.
27. Lakso H-Å, Ng WF (1997) Determination of Chemical Warfare Agents in Natural Water Samples by Solid-Phase Microextraction. *Anal Chem* 69:1866–1872. doi: 10.1021/ac960997h
28. Wessels D, Barr DB, Mendola P (2003) Use of biomarkers to indicate exposure of children to organophosphate pesticides: implications for a longitudinal study of children's environmental health. *Environ Health Perspect* 111:1939–1946.
29. Fiddler A, Hulst AG, Noort D, de Ruiter R, van der Schans MJ, Benschop HP, Langenberg JP (2002) Retrospective Detection of Exposure to Organophosphorus Anti-Cholinesterases: Mass Spectrometric Analysis of Phosphorylated Human Butyrylcholinesterase. *Chem Res Toxicol* 15:582–590. doi: 10.1021/tx0101806
30. Desoubries C (2013) Extraction de produits de dégradation d'agents de guerre chimique : étude du potentiel d'une phase de dioxyde de titane et de la microextraction liquide assistée par fibre creuse. Thèse de l'université Paris 6 (UPMC)
31. Noort D, Hulst AG, Platenburg DH, Polhuijs M, Benschop HP (1998) Quantitative analysis of O-isopropyl methylphosphonic acid in serum samples of Japanese citizens allegedly exposed to sarin: estimation of internal dosage. *Arch Toxicol* 72:671–675.
32. Black RM, Read RW (1997) Application of liquid chromatography-atmospheric pressure chemical ionisation mass spectrometry, and tandem mass spectrometry, to the analysis and identification of degradation products of chemical warfare agents. *J Chromatogr A* 759:79–92. doi: 10.1016/S0021-9673(96)00763-7
33. Black RM, Clarke RJ, Read RW, Reid MT (1994) Application of gas chromatography-mass spectrometry and gas chromatography-tandem mass spectrometry to the analysis of chemical warfare samples, found to contain residues of the nerve agent sarin, sulphur mustard and their degradation products. *J Chromatogr A* 662:301–321.
34. Lacorte S, Barceló D (1995) Determination of organophosphorus pesticides and their transformation products in river waters by automated on-line solid-phase extraction followed by thermospray liquid chromatography-mass spectrometry. *J Chromatogr A* 712:103–112. doi: 10.1016/0021-9673(95)00425-M
35. Black RM, Read RW (2013) Biological markers of exposure to organophosphorus nerve agents. *Arch Toxicol* 87:421–437. doi: 10.1007/s00204-012-1005-1

36. Polhuijs M, Langenberg JP, Benschop HP (1997) New method for retrospective detection of exposure to organophosphorus anticholinesterases: application to alleged sarin victims of Japanese terrorists. *Toxicol Appl Pharmacol* 146:156–161.
37. Bajgar J (2012) Nerve agents poisoning and its treatment in schematic figures and tables. Elsevier, Chennai; Oxford
38. Doorn J (2001) Identification of Butyrylcholinesterase Adducts after Inhibition with Isomalathion Using Mass Spectrometry: Difference in Mechanism between (1R)- and (1S)-Stereoisomers. *Toxicol Appl Pharmacol* 176:73–80. doi: 10.1006/taap.2001.9279
39. Elhanany E, Ordentlich A, Dgany O, Kaplan D, Segall Y, Barak R, Velan B, Shafferman A (2001) Resolving Pathways of Interaction of Covalent Inhibitors with the Active Site of Acetylcholinesterases: MALDI-TOF/MS Analysis of Various Nerve Agent Phosphyl Adducts. *Chem Res Toxicol* 14:912–918. doi: 10.1021/tx0100542
40. Li H, Tong L, Schopfer LM, Masson P, Lockridge O (2008) Fast affinity purification coupled with mass spectrometry for identifying organophosphate labeled plasma butyrylcholinesterase. *Chem Biol Interact* 175:68–72. doi: 10.1016/j.cbi.2008.04.027
41. Issaq HJ, Xiao Z, Veenstra TD (2007) Serum and plasma proteomics. *Chem Rev* 107:3601–3620. doi: 10.1021/cr068287r
42. John H, Worek F, Thiermann H (2008) LC-MS-based procedures for monitoring of toxic organophosphorus compounds and verification of pesticide and nerve agent poisoning. *Anal Bioanal Chem* 391:97–116. doi: 10.1007/s00216-008-1925-z
43. Lockridge O, Schopfer LM, Winger G, Woods JH (2005) Large scale purification of butyrylcholinesterase from human plasma suitable for injection into monkeys: a potential new therapeutic for protection against cocaine and nerve agent toxicity. *J Med Chem Biol Radiol Def* 3:nihms5095. doi: 10.1901/jaba.2005.3-nihms5095
44. Mehrani H (2004) Simplified procedures for purification and stabilization of human plasma butyrylcholinesterase. *Process Biochem* 39:877–882. doi: 10.1016/S0032-9592(03)00195-X
45. Grunwald J, Marcus D, Papier Y, Raveh L, Pittel Z, Ashani Y (1997) Large-scale purification and long-term stability of human butyrylcholinesterase: a potential bioscavenger drug. *J Biochem Biophys Methods* 34:123–135. doi: 10.1016/S0165-022X(97)01208-6
46. Saxena A, Luo C, Doctor BP (2008) Developing procedures for the large-scale purification of human serum butyrylcholinesterase. *Protein Expr Purif* 61:191–196. doi: 10.1016/j.pep.2008.05.021
47. Li H, Tong L, Schopfer LM, Masson P, Lockridge O (2008) Fast affinity purification coupled with mass spectrometry for identifying organophosphate labeled plasma butyrylcholinesterase. *Chem Biol Interact* 175:68–72. doi: 10.1016/j.cbi.2008.04.027
48. Fidler A, Hulst AG, Noort D, de Ruiter R, van der Schans MJ, Benschop HP, Langenberg JP (2002) Retrospective Detection of Exposure to Organophosphorus

Anti-Cholinesterases: Mass Spectrometric Analysis of Phosphylated Human Butyrylcholinesterase. *Chem Res Toxicol* 15:582–590. doi: 10.1021/tx0101806

49. Liu C-C, Huang G-L, Xi H-L, Liu S-L, Liu J-Q, Yu H-L, Zhou S-K, Liang L-H, Yuan L (2016) Simultaneous quantification of soman and VX adducts to butyrylcholinesterase, their aged methylphosphonic acid adduct and butyrylcholinesterase in plasma using an off-column procainamide-gel separation method combined with UHPLC–MS/MS. *J Chromatogr B* 1036–1037:57–65. doi: 10.1016/j.jchromb.2016.09.044
50. Brazzolotto X, Wandhammer M, Ronco C, Trovaslet M, Jean L, Lockridge O, Renard P-Y, Nachon F (2012) Human butyrylcholinesterase produced in insect cells: huprine-based affinity purification and crystal structure: Recombinant human butyrylcholinesterase in insect cells. *FEBS J* 279:2905–2916. doi: 10.1111/j.1742-4658.2012.08672.x
51. Lockridge O (2015) Review of human butyrylcholinesterase structure, function, genetic variants, history of use in the clinic, and potential therapeutic uses. *Pharmacol Ther* 148:34–46. doi: 10.1016/j.pharmthera.2014.11.011
52. Schopfer LM, Masson P, Lamourette P, Simon S, Lockridge O (2014) Detection of cresyl phosphate-modified butyrylcholinesterase in human plasma for chemical exposure associated with aerotoxic syndrome. *Anal Biochem* 461:17–26. doi: 10.1016/j.ab.2014.05.021
53. Tsuge K, Seto Y (2006) Detection of human butyrylcholinesterase-nerve gas adducts by liquid chromatography–mass spectrometric analysis after in gel chymotryptic digestion. *J Chromatogr B* 838:21–30. doi: 10.1016/j.jchromb.2006.02.054
54. Jiang W, Lockridge O (2013) Detectable organophosphorus pesticide exposure in the blood of Nebraska and Iowa residents measured by mass spectrometry of butyrylcholinesterase adducts. *Chem Biol Interact* 203:91–95. doi: 10.1016/j.cbi.2012.09.002
55. Walker JM (2002) *The protein protocols handbook*, 2nd ed. Humana Press, Totowa, N.J
56. L. Fourier, F. Perret (2009) Document technique interne ANAC.
57. Carol-Visser J, van der Schans M, Fidder A, Hulst AG, van Baar BLM, Irth H, Noort D (2008) Development of an automated on-line pepsin digestion-liquid chromatography-tandem mass spectrometry configuration for the rapid analysis of protein adducts of chemical warfare agents. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 870:91–97. doi: 10.1016/j.jchromb.2008.06.008
58. J. Daussant, F.X. Desvaux *Introduction to immunochemical techniques for medical diagnosis, food quality control and environmental testing*. Institute of chemical technology, ICT Press, Prague, 2007.
59. A. D, R. L (2012) Immunoaffinity Chromatography: A Review. *Affin Chromatogr*. doi: 10.5772/35871

60. Moser AC, Hage DS (2010) Immunoaffinity chromatography: an introduction to applications and recent developments. *Bioanalysis* 2:769–790. doi: 10.4155/bio.10.31
61. Michnick SW, Sidhu SS (2008) Submitting antibodies to binding arbitration. *Nat Chem Biol* 4:326–329. doi: 10.1038/nchembio0608-326
62. Harlow, E. & Lane, D. *Antibody Structure and Function*. In: *Using Antibodies*, Harlow and Lane, 1999, pp. 1-20, Cold Spring Harbor laboratory Press, ISBN 978-087969544-6, New York, USA.
63. Köhler G, Milstein C (1975) Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature* 256:495–497.
64. Hage DS, Phillips TM. Immunoaffinity chromatography. In: Hage DS, editor. *Handbook of Affinity Chromatography*. NY, USA: Taylor & Francis; 2006. Chapter 6.
65. Pichon V, Chapuis-Hugon F, Hennion M-C (2012) Bioaffinity Sorbents. In: *Compr. Sampl. Sample Prep*. Elsevier, pp 359–388
66. Van Emon JM, Chuang JC (2013) Development and application of immunoaffinity chromatography for coplanar PCBs in soil and sediment. *Chemosphere* 90:1–6. doi: 10.1016/j.chemosphere.2012.06.053
67. Zhao M, Liu Y, Li Y, Zhang X, Chang W (2003) Development and characterization of an immunoaffinity column for the selective extraction of bisphenol A from serum samples. *J Chromatogr B* 783:401–410. doi: 10.1016/S1570-0232(02)00702-X
68. Zhao X, Yuan Y, Zhang X, Yue T (2014) Identification of ochratoxin A in Chinese spices using HPLC fluorescent detectors with immunoaffinity column cleanup. *Food Control* 46:332–337. doi: 10.1016/j.foodcont.2014.05.052
69. Bouzige M, Pichon V, Hennion M-C (1998) On-line coupling of immunosorbent and liquid chromatographic analysis for the selective extraction and determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in water samples at the ng-l level. *J Chromatogr A* 823:197–210. doi: 10.1016/S0021-9673(98)00582-2
70. Delaunay-Bertoncini N *Developpement d'immunoadsorbants à base d'anticorps monoclonaux pour l'extraction selective de familles de micropolluants organiques contenus dans des matrices complexes: comparaison avec des polymères à empreinte moléculaire.*
71. Cingoz A, Hugon-Chapuis F, Pichon V (2010) Total on-line analysis of a target protein from plasma by immunoextraction, digestion and liquid chromatography-mass spectrometry. *J Chromatogr B-Anal Technol Biomed Life Sci* 878:213–221.
72. Magdeldin S, Moser A (2012) *Affinity Chromatography: Principles and Applications*. *Affin Chromatogr*. doi: 10.5772/39087
73. Rivasseau C, Hennion M-C (1999) Potential of immunoextraction coupled to analytical and bioanalytical methods (liquid chromatography, ELISA kit and phosphatase inhibition test) for an improved environmental monitoring of

- cyanobacterial toxins. *Anal Chim Acta* 399:75–87. doi: 10.1016/S0003-2670(99)00578-4
74. Schiel JE, Mallik R, Soman S, Joseph KS, Hage DS (2006) Applications of silica supports in affinity chromatography. *J Sep Sci* 29:719–737.
 75. Hage M.J.Y.a.D.S Monolithic chromatography and its modern applications, P.G. Wang, ILM Publications, 2010, p. 3.
 76. Mallik R, Hage DS (2006) Affinity monolith chromatography. *J Sep Sci* 29:1686–1704. doi: 10.1002/jssc.200600152
 77. Pfaunmiller EL, Paulemond ML, Dupper CM, Hage DS (2013) Affinity monolith chromatography: a review of principles and recent analytical applications. *Anal Bioanal Chem* 405:2133–2145. doi: 10.1007/s00216-012-6568-4
 78. Tetala KKR, van Beek TA (2010) Bioaffinity chromatography on monolithic supports. *J Sep Sci* 33:422–438. doi: 10.1002/jssc.200900635
 79. Brne P, Lim Y-P, Podgornik A, Barut M, Pihlar B, Strancar A (2009) Development and characterization of methacrylate-based hydrazide monoliths for oriented immobilization of antibodies. *J Chromatogr A* 1216:2658–2663. doi: 10.1016/j.chroma.2008.11.005
 80. Delmotte N, Kobold U, Meier T, Gallusser A, Strancar A, Huber CG (2007) Miniaturized monolithic disks for immunoadsorption of cardiac biomarkers from serum. *Anal Bioanal Chem* 389:1065–1074. doi: 10.1007/s00216-007-1515-5
 81. Calleri E, Marrubini G, Brusotti G, Massolini G, Caccialanza G (2007) Development and integration of an immunoaffinity monolithic disk for the on-line solid-phase extraction and HPLC determination with fluorescence detection of aflatoxin B1 in aqueous solutions. *J Pharm Biomed Anal* 44:396–403. doi: 10.1016/j.jpba.2007.01.030
 82. Jiang T, Mallik R, Hage DS (2005) Affinity monoliths for ultrafast immunoextraction. *Anal Chem* 77:2362–2372. doi: 10.1021/ac0483668
 83. Li L, Wang J, Zhou S, Zhao M (2008) Development and characterization of an immunoaffinity monolith for selective on-line extraction of bisphenol A from environmental water samples. *Anal Chim Acta* 620:1–7. doi: 10.1016/j.aca.2008.05.036
 84. Liang Y, Zhou S, Hu L, Li L, Zhao M, Liu H (2010) Class-specific immunoaffinity monolith for efficient on-line clean-up of pyrethroids followed by high-performance liquid chromatography analysis. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 878:278–282. doi: 10.1016/j.jchromb.2009.06.007
 85. Brothier F (2014) Développement d’outils bioanalytiques miniaturisés greffage de biomolécules sur monolithes en capillaire couplés à la nanochromatographie pour l’analyse d’échantillons complexes. Thèse de l’université Paris 6 (UPMC)

86. Whiteaker JR, Zhao L, Zhang HY, Feng L-C, Piening BD, Anderson L, Paulovich AG (2007) Antibody-based enrichment of peptides on magnetic beads for mass-spectrometry-based quantification of serum biomarkers. *Anal Biochem* 362:44–54. doi: 10.1016/j.ab.2006.12.023
87. Peng H, Brimijoin S, Hrabovska A, Targosova K, Krejci E, Blake TA, Johnson RC, Masson P, Lockridge O (2015) Comparison of 5 monoclonal antibodies for immunopurification of human butyrylcholinesterase on Dynabeads: KD values, binding pairs, and amino acid sequences. *Chem Biol Interact* 240:336–345. doi: 10.1016/j.cbi.2015.08.024
88. Hendrix PG, Hoylaerts MF, Nouwen EJ, Van de Voorde A, De Broe ME (1992) Magnetic beads in suspension enable a rapid and sensitive immunodetection of human placental alkaline phosphatase. *Eur J Clin Chem Clin Biochem J Forum Eur Clin Chem Soc* 30:343–347.
89. Welter BH, Price TM (1999) Magnetic separation to concentrate the estrogen receptor from adipose tissue for western analysis. *BioTechniques* 27:282–286.
90. Tubbs KA, Kiernan UA, Niederkofler EE, Nedelkov D, Bieber AL, Nelson RW (2006) Development of recombinant-based mass spectrometric immunoassay with application to resistin expression profiling. *Anal Chem* 78:3271–3276. doi: 10.1021/ac060013g
91. Gam L-H, Tham S-Y, Latiff A (2003) Immunoaffinity extraction and tandem mass spectrometric analysis of human chorionic gonadotropin in doping analysis. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 792:187–196.
92. Thevis M, Bredehöft M, Geyer H, Kamber M, Delahaut P, Schänzer W (2006) Determination of Synacthen in human plasma using immunoaffinity purification and liquid chromatography/tandem mass spectrometry. *Rapid Commun Mass Spectrom RCM* 20:3551–3556. doi: 10.1002/rcm.2774
93. Hoos JS, Sudergat H, Hoelck J-P, Stahl M, de Vlieger JSB, Niessen WMA, Lingeman H, Irth H (2006) Selective quantitative bioanalysis of proteins in biological fluids by on-line immunoaffinity chromatography-protein digestion-liquid chromatography-mass spectrometry. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 830:262–269. doi: 10.1016/j.jchromb.2005.11.002
94. Janis LJ, Regnier FE (1988) Immunological-Chromatographic Analysis. *J Chromatogr A* 444:1–11. doi: 10.1016/S0021-9673(01)94003-8
95. Sen JW, Bergen HR, Heegaard NHH (2003) On-Line Immunoaffinity-Liquid Chromatography–Mass Spectrometry for Identification of Amyloid Disease Markers in Biological Fluids. *Anal Chem* 75:1196–1202. doi: 10.1021/ac026174b
96. Guan F, Uboh CE, Soma LR, Birks E, Chen J, Mitchell J, You Y, Rudy J, Xu F, Li X, Mbuy G (2007) LC-MS/MS method for confirmation of recombinant human erythropoietin and darbepoetin alpha in equine plasma. *Anal Chem* 79:4627–4635. doi: 10.1021/ac070135o

97. Janis LJ, Grott A, Regnier FE, Smith-Gill SJ (1989) Immunological-chromatographic analysis of lysozyme variants. *J Chromatogr A* 476:235–244. doi: 10.1016/S0021-9673(01)93872-5
98. Nelson RW, Krone JR, Bieber AL, Williams P (1995) Mass Spectrometric Immunoassay. *Anal Chem* 67:1153–1158. doi: 10.1021/ac00103a003
99. Hsieh YL, Wang H, Elicone C, Mark J, Martin SA, Regnier F (1996) Automated analytical system for the examination of protein primary structure. *Anal Chem* 68:455–462.
100. Jackson AJ, Xuan H, Hage DS (2010) Entrapment of proteins in glycogen-capped and hydrazide-activated supports. *Anal Biochem* 404:106–108. doi: 10.1016/j.ab.2010.05.004
101. Marsillach J, Richter RJ, Kim JH, Stevens RC, MacCoss MJ, Tomazela D, Suzuki SM, Schopfer LM, Lockridge O, Furlong CE (2011) Biomarkers of organophosphorus (OP) exposures in humans. *NeuroToxicology* 32:656–660. doi: 10.1016/j.neuro.2011.06.005
102. Marsillach J, Hsieh EJ, Richter RJ, MacCoss MJ, Furlong CE (2013) Proteomic analysis of adducted butyrylcholinesterase for biomonitoring organophosphorus exposures. *Chem Biol Interact* 203:85–90. doi: 10.1016/j.cbi.2012.10.019
103. Knaack JS, Zhou Y, Abney CW, Prezioso SM, Magnuson M, Evans R, Jakubowski EM, Hardy K, Johnson RC (2012) High-Throughput Immunomagnetic Scavenging Technique for Quantitative Analysis of Live VX Nerve Agent in Water, Hamburger, and Soil Matrixes. *Anal Chem* 84:10052–10057. doi: 10.1021/ac3025224
104. Pantazides BG, Watson CM, Carter MD, Crow BS, Perez JW, Blake TA, Thomas JD, Johnson RC (2014) An enhanced butyrylcholinesterase method to measure organophosphorus nerve agent exposure in humans. *Anal Bioanal Chem* 406:5187–5194. doi: 10.1007/s00216-014-7718-7
105. Carter MD, Crow BS, Pantazides BG, Watson CM, deCastro BR, Thomas JD, Blake TA, Johnson RC (2014) Profiling Cholinesterase Adduction A High-Throughput Prioritization Method for Organophosphate Exposure Samples. *J Biomol Screen* 19:325–330. doi: 10.1177/1087057113497799
106. Peng H, Brimijoin S, Hrabovska A, Krejci E, Blake TA, Johnson RC, Masson P, Lockridge O (2015) Monoclonal antibodies to human butyrylcholinesterase reactive with butyrylcholinesterase in animal plasma. *Chem Biol Interact*. doi: 10.1016/j.cbi.2015.11.011
107. Graham LA, Johnson D, Carter MD, Stout EG, Erol HA, Isenberg SL, Mathews TP, Thomas JD, Johnson RC (2016) A high-throughput UHPLC-MS/MS method for the quantification of five aged butyrylcholinesterase biomarkers from human exposure to organophosphorus nerve agents: Aged Butyrylcholinesterase Biomarkers of Organophosphorus Nerve Agents. *Biomed Chromatogr*. doi: 10.1002/bmc.3830

108. Mathews TP, Carter MD, Johnson D, Isenberg SL, Graham LA, Thomas JD, Johnson RC (2017) High-Confidence Qualitative Identification of Organophosphorus Nerve Agent Adducts to Human Butyrylcholinesterase. *Anal Chem* 89:1955–1964. doi: 10.1021/acs.analchem.6b04441
109. Schopfer LM, Lockridge O, Brimijoin S (2015) Pure human butyrylcholinesterase hydrolyzes octanoyl ghrelin to desacyl ghrelin. *Gen Comp Endocrinol*. doi: 10.1016/j.ygcen.2015.05.017
110. Datta S, Christena LR, Rajaram YRS (2013) Enzyme immobilization: an overview on techniques and support materials. *3 Biotech* 3:1–9. doi: 10.1007/s13205-012-0071-7
111. Vecchione G, Casetta B, Santacroce R, Margaglione M (2001) A comprehensive on-line digestion-liquid chromatography/mass spectrometry/collision-induced dissociation mass spectrometry approach for the characterization of human fibrinogen. *Rapid Commun Mass Spectrom RCM* 15:1383–1390. doi: 10.1002/rcm.355
112. Samskog J, Bylund D, Jacobsson SP, Markides KE (2003) Miniaturized on-line proteolysis–capillary liquid chromatography–mass spectrometry for peptide mapping of lactate dehydrogenase. *J Chromatogr A* 998:83–91. doi: 10.1016/S0021-9673(03)00647-2
113. Gobom J, Nordhoff E, Mirgorodskaya E, Ekman R, Roepstorff P (1999) Sample purification and preparation technique based on nano-scale reversed-phase columns for the sensitive analysis of complex peptide mixtures by matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry. *J Mass Spectrom* 34:105–116. doi: 10.1002/(SICI)1096-9888(199902)34:2<105::AID-JMS768>3.0.CO;2-4
114. Pedroche J, del Mar Yust M, Mateo C, Fernández-Lafuente R, Girón-Calle J, Alaiz M, Vioque J, Guisán JM, Millán F (2007) Effect of the support and experimental conditions in the intensity of the multipoint covalent attachment of proteins on glyoxyl-agarose supports: Correlation between enzyme–support linkages and thermal stability. *Enzyme Microb Technol* 40:1160–1166. doi: 10.1016/j.enzmictec.2006.08.023
115. Pessela BCC, Dellamora-Ortiz G, Betancor L, Fuentes M, Guisán JM, Fernandez-Lafuente R (2007) Modulation of the catalytic properties of multimeric β -galactosidase from *E. coli* by using different immobilization protocols. *Enzyme Microb Technol* 40:310–315. doi: 10.1016/j.enzmictec.2006.04.015
116. Freije R, Klein T, Ooms B, Kauffman HF, Bischoff R (2008) An integrated high-performance liquid chromatography-mass spectrometry system for the activity-dependent analysis of matrix metalloproteases. *J Chromatogr A* 1189:417–425. doi: 10.1016/j.chroma.2007.10.059
117. Freije JR, Mulder PPMFA, Werkman W, Rieux L, Niederlander HAG, Verpoorte E, Bischoff R (2005) Chemically modified, immobilized trypsin reactor with improved digestion efficiency. *J Proteome Res* 4:1805–1813. doi: 10.1021/pr050142y

118. Vukovic J, Loftheim H, Winther B, Reubsæet JLE (2008) Improving off-line accelerated tryptic digestion. *J Chromatogr A* 1195:34–43. doi: 10.1016/j.chroma.2008.05.010
119. Kurimoto E, Harada T, Akiyama A, Sakai T, Kato K (2001) In vitro refolding of porcine pepsin immobilized on agarose beads. *J Biochem (Tokyo)* 130:295–297.
120. Cobb KA, Novotny M (1989) High-sensitivity peptide mapping by capillary zone electrophoresis and microcolumn liquid chromatography using immobilized trypsin for protein digestion. *Anal Chem* 61:2226–2231. doi: 10.1021/ac00195a003
121. Ehring H (1999) Hydrogen exchange/electrospray ionization mass spectrometry studies of structural features of proteins and protein/protein interactions. *Anal Biochem* 267:252–259. doi: 10.1006/abio.1998.3000
122. Cancilla MT, Leavell MD, Chow J, Leary JA (2000) Mass spectrometry and immobilized enzymes for the screening of inhibitor libraries. *Proc Natl Acad Sci* 97:12008–12013. doi: 10.1073/pnas.220403997
123. Malmsten M, Larsson M (2000) Immobilization of trypsin on porous glycidyl methacrylate beads: effects of polymer hydrophilization. *Colloids Surf B Biointerfaces* 18:277–284.
124. Blanco RM, Terreros P, Fernández-Pérez M, Otero C, Díaz-González G (2004) Functionalization of mesoporous silica for lipase immobilization. *J Mol Catal B Enzym* 30:83–93. doi: 10.1016/j.molcatb.2004.03.012
125. Pierre AC (2004) The sol-gel encapsulation of enzymes. *Biocatal Biotransformation* 22:145–170. doi: 10.1080/10242420412331283314
126. Homaei AA, Sariri R, Vianello F, Stevanato R (2013) Enzyme immobilization: an update. *J Chem Biol* 6:185–205. doi: 10.1007/s12154-013-0102-9
127. Koutsopoulos S, Patzsch K, Bosker WTE, Norde W (2007) Adsorption of trypsin on hydrophilic and hydrophobic surfaces. *Langmuir ACS J Surf Colloids* 23:2000–2006. doi: 10.1021/la062238s
128. Slys GW, Schriemer DC (2003) On-column digestion of proteins in aqueous-organic solvents. *Rapid Commun Mass Spectrom RCM* 17:1044–1050. doi: 10.1002/rcm.1022
129. Lim LW, Tomatsu M, Takeuchi T (2006) Development of an on-line immobilized-enzyme reversed-phase HPLC method for protein digestion and peptide separation. *Anal Bioanal Chem* 386:614–620. doi: 10.1007/s00216-006-0458-6
130. Bonneil E, Waldron KC (2000) On-line system for peptide mapping by capillary electrophoresis at sub-micromolar concentrations. *Talanta* 53:687–699.
131. Davis MT, Lee TD, Ronk M, Hefta SA (1995) Microscale immobilized protease reactor columns for peptide mapping by liquid chromatography/mass spectral analyses. *Anal Biochem* 224:235–244. doi: 10.1006/abio.1995.1035

132. Canarelli S, Fisch I, Freitag R (2002) Hyphenation of multi-dimensional chromatography and mass spectrometry for the at-line-analysis of the integrity of recombinant protein drugs. *J Chromatogr B* 775:27–35. doi: 10.1016/S1570-0232(02)00286-6
133. Han W, Yamauchi M, Hasegawa U, Noda M, Fukui K, van der Vlies AJ, Uchiyama S, Uyama H (2014) Pepsin immobilization on an aldehyde-modified polymethacrylate monolith and its application for protein analysis. *J Biosci Bioeng*. doi: 10.1016/j.jbiosc.2014.10.018
134. Hara S, Katta V, Lu HS (2000) Peptide map procedure using immobilized protease cartridges in tandem for disulfide linkage identification of neu differentiation factor epidermal growth factor domain. *J Chromatogr A* 867:151–160. doi: 10.1016/S0021-9673(99)01110-3
135. Carol J, Gorseling MCJK, de Jong CF, Lingeman H, Kientz CE, van Baar BLM, Irth H (2005) Determination of denaturated proteins and biotoxins by on-line size-exclusion chromatography–digestion–liquid chromatography–electrospray mass spectrometry. *Anal Biochem* 346:150–157. doi: 10.1016/j.ab.2005.08.023
136. Riggs L, Sioma C, Regnier FE (2001) Automated signature peptide approach for proteomics. *J Chromatogr A* 924:359–368.
137. Green MM, Gladner JA, Cunningham LW, Neurath H (1952) The effects of divalent cations on the enzymatic activities of trypsin and of α -chymotrypsin. *J Am Chem Soc* 74:2122–2123. doi: 10.1021/ja01128a523
138. Cingoz A, Hugon-Chapuis F, Pichon V (2008) Evaluation of various immobilized enzymatic microreactors coupled on-line with liquid chromatography and mass spectrometry detection for quantitative analysis of cytochrome c. *J Chromatogr A* 1209:95–103.
139. Nachon F, Nicolet Y, Viguié N, Masson P, Fontecilla-Camps JC, Lockridge O (2002) Engineering of a monomeric and low-glycosylated form of human butyrylcholinesterase: expression, purification, characterization and crystallization. *Eur J Biochem FEBS* 269:630–637.
140. Yanagisawa N, Morita H, Nakajima T (2006) Sarin experiences in Japan: acute toxicity and long-term effects. *J Neurol Sci* 249:76–85. doi: 10.1016/j.jns.2006.06.007
141. Li H, Schopfer LM, Nachon F, Froment M-T, Masson P, Lockridge O (2007) Aging pathways for organophosphate-inhibited human butyrylcholinesterase, including novel pathways for isomalathion, resolved by mass spectrometry. *Toxicol Sci Off J Soc Toxicol* 100:136–145. doi: 10.1093/toxsci/kfm215
142. Read RW, Riches JR, Stevens JA, Stubbs SJ, Black RM (2010) Biomarkers of organophosphorus nerve agent exposure: comparison of phosphorylated butyrylcholinesterase and phosphorylated albumin after oxime therapy. *Arch Toxicol* 84:25–36. doi: 10.1007/s00204-009-0473-4

143. Jiang W, Cashman JR, Nachon F, Masson P, Schopfer LM, Lockridge O (2013) Mass Spectrometry Method to Identify Aging Pathways of Sp- and Rp-Tabun Adducts on Human Butyrylcholinesterase Based on the Acid Labile P-N Bond. *Toxicol Sci* 132:390–398. doi: 10.1093/toxsci/kft011
144. Grob D, Harvey JC (1958) Effect in man of the anticholinesterase compound sarin (isopropyl methyl phosphonofluoridate). *J Clin Invest* 37:350–368. doi: 10.1172/JCI103615
145. Schechter WP (2004) Cholinergic symptoms due to nerve agent attack: a strategy for management. *Anesthesiol Clin N Am* 22:579–590, viii. doi: 10.1016/j.atc.2004.04.005
146. Black RM, Read RW (2013) Biological markers of exposure to organophosphorus nerve agents. *Arch Toxicol* 87:421–437. doi: 10.1007/s00204-012-1005-1
147. Sporty JLS, Lemire SW, Jakubowski EM, Renner JA, Evans RA, Williams RF, Schmidt JG, Schans MJ van der, Noort D, Johnson RC (2010) Immunomagnetic Separation and Quantification of Butyrylcholinesterase Nerve Agent Adducts in Human Serum. *Anal Chem* 82:6593–6600. doi: 10.1021/ac101024z
148. Fidder A, Hulst AG, Noort D, de Ruyter R, van der Schans MJ, Benschop HP, Langenberg JP (2002) Retrospective Detection of Exposure to Organophosphorus Anti-Cholinesterases: Mass Spectrometric Analysis of Phosphylated Human Butyrylcholinesterase. *Chem Res Toxicol* 15:582–590. doi: 10.1021/tx0101806
149. Safdar M, Sproß J, Jänis J (2014) Microscale immobilized enzyme reactors in proteomics: Latest developments. *J Chromatogr A* 1324:1–10. doi: 10.1016/j.chroma.2013.11.045
150. Hedström M, Andersson M, Galaev IY, Mattiasson B (2005) Fast on-column protein digestion with subsequent peptide mapping using tandem mass spectrometry with information dependent acquisition. *J Chromatogr A* 1080:117–123. doi: 10.1016/j.chroma.2005.04.069
151. Chui WK, Wainer IW (1992) Enzyme-based high-performance liquid chromatography supports as probes of enzyme activity and inhibition: the immobilization of trypsin and alpha-chymotrypsin on an immobilized artificial membrane high-performance liquid chromatography support. *Anal Biochem* 201:237–245.
152. Xu F, Wang W-H, Tan Y-J, Bruening ML (2010) Facile trypsin immobilization in polymeric membranes for rapid, efficient protein digestion. *Anal Chem* 82:10045–10051. doi: 10.1021/ac101857j
153. Palm AK, Novotny MV (2004) Analytical characterization of a facile porous polymer monolithic trypsin microreactor enabling peptide mass mapping using mass spectrometry. *Rapid Commun Mass Spectrom* 18:1374–1382. doi: 10.1002/rcm.1500
154. Geiser L, Eeltink S, Svec F, Fréchet JM (2008) In-line system containing porous polymer monoliths for protein digestion with immobilized pepsin, peptide preconcentration and nano-liquid chromatography separation coupled to electrospray

- ionization mass spectroscopy. *J Chromatogr A* 1188:88–96. doi: 10.1016/j.chroma.2008.02.075
155. Hahn HW, Rainer M, Ringer T, Huck CW, Bonn GK (2009) Ultrafast microwave-assisted in-tip digestion of proteins. *J Proteome Res* 8:4225–4230. doi: 10.1021/pr900188x
 156. Nicoli R, Bartolini M, Rudaz S, Andrisano V, Veuthey J-L (2008) Development of immobilized enzyme reactors based on human recombinant cytochrome P450 enzymes for phase I drug metabolism studies. *J Chromatogr A* 1206:2–10. doi: 10.1016/j.chroma.2008.05.080
 157. Nicoli R, Rudaz S, Stella C, Veuthey J-L (2009) Trypsin immobilization on an ethylenediamine-based monolithic minidisk for rapid on-line peptide mass fingerprinting studies. *J Chromatogr A* 1216:2695–2699. doi: 10.1016/j.chroma.2008.10.046
 158. Lin S, Yao G, Qi D, Li Y, Deng C, Yang P, Zhang X (2008) Fast and Efficient Proteolysis by Microwave-Assisted Protein Digestion Using Trypsin-Immobilized Magnetic Silica Microspheres. *Anal Chem* 80:3655–3665. doi: 10.1021/ac800023r
 159. Kato M, Sakai-Kato K, Toyo'oka T (2005) Silica sol-gel monolithic materials and their use in a variety of applications. *J Sep Sci* 28:1893–1908. doi: 10.1002/jssc.200500225
 160. Cingöz A, Hugon-Chapuis F, Pichon V (2008) Evaluation of various immobilized enzymatic microreactors coupled on-line with liquid chromatography and mass spectrometry detection for quantitative analysis of cytochrome c. *J Chromatogr A* 1209:95–103. doi: 10.1016/j.chroma.2008.08.120
 161. Luk VN, Fiddes LK, Luk VM, Kumacheva E, Wheeler AR (2012) Digital microfluidic hydrogel microreactors for proteomics. *Proteomics* 12:1310–1318. doi: 10.1002/pmic.201100608
 162. Jiang B, Yang K, Zhao Q, Wu Q, Liang Z, Zhang L, Peng X, Zhang Y (2012) Hydrophilic immobilized trypsin reactor with magnetic graphene oxide as support for high efficient proteome digestion. *J Chromatogr A* 1254:8–13. doi: 10.1016/j.chroma.2012.07.030
 163. Vlakh EG, Tennikova TB (2013) Flow-through immobilized enzyme reactors based on monoliths: II. Kinetics study and application. *J Sep Sci* 36:1149–1167. doi: 10.1002/jssc.201201090
 164. Ma J, Zhang L, Liang Z, Zhang W, Zhang Y (2007) Monolith-based immobilized enzyme reactors: recent developments and applications for proteome analysis. *J Sep Sci* 30:3050–3059. doi: 10.1002/jssc.200700362
 165. Calleri E, Ambrosini S, Temporini C, Massolini G (2012) New monolithic chromatographic supports for macromolecules immobilization: challenges and opportunities. *J Pharm Biomed Anal* 69:64–76. doi: 10.1016/j.jpba.2012.01.032

166. Carol J, Gorseling MCJK, de Jong CF, Lingeman H, Kientz CE, van Baar BLM, Irth H (2005) Determination of denaturated proteins and biotoxins by on-line size-exclusion chromatography-digestion-liquid chromatography-electrospray mass spectrometry. *Anal Biochem* 346:150–157. doi: 10.1016/j.ab.2005.08.023
167. Hage DS *Handbook of Affinity Chromatography*, 2nd ed.
168. Narayanan SR, Crane LJ (1990) Affinity chromatography supports: a look at performance requirements. *Trends Biotechnol* 8:12–16.
169. Leonard M (1997) New packing materials for protein chromatography. *J Chromatogr B Biomed Sci App* 699:3–27.
170. Boschetti E (1994) Advanced sorbents for preparative protein separation purposes. *J Chromatogr A* 658:207–236. doi: 10.1016/0021-9673(94)80017-0
171. Cingöz A, Hugon-Chapuis F, Pichon V (2010) Total on-line analysis of a target protein from plasma by immunoextraction, digestion and liquid chromatography-mass spectrometry. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 878:213–221. doi: 10.1016/j.jchromb.2009.07.032
172. Urban PL, Goodall DM, Bruce NC (2006) Enzymatic microreactors in chemical analysis and kinetic studies. *Biotechnol Adv* 24:42–57. doi: 10.1016/j.biotechadv.2005.06.001
173. Keil B (1992) Specificity of proteolysis.
174. John H, Breyer F, Schmidt C, Mizaikoff B, Worek F, Thiermann H (2015) Small-scale purification of butyrylcholinesterase from human plasma and implementation of a μ LC-UV/ESI MS/MS method to detect its organophosphorus adducts: Butyrylcholinesterase for OP adducts. *Drug Test Anal* n/a-n/a. doi: 10.1002/dta.1792
175. Lockridge O, Bartels CF, Vaughan TA, Wong CK, Norton SE, Johnson LL (1987) Complete amino acid sequence of human serum cholinesterase. *J Biol Chem* 262:549–557.
176. Bonichon M, Combès A, Desoubries C, Bossée A, Pichon V (2016) Development of immobilized-pepsin microreactors coupled to nano liquid chromatography and tandem mass spectrometry for the quantitative analysis of human butyrylcholinesterase. *J Chromatogr A* 1461:84–91. doi: 10.1016/j.chroma.2016.07.058
177. Jiang W, Murashko EA, Dubrovskii YA, Podolskaya EP, Babakov VN, Mikler J, Nachon F, Masson P, Schopfer LM, Lockridge O (2013) Matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry of titanium oxide-enriched peptides for detection of aged organophosphorus adducts on human butyrylcholinesterase. *Anal Biochem* 439:132–141. doi: 10.1016/j.ab.2013.04.018
178. Knaack JS, Zhou Y, Abney CW, Prezioso SM, Magnuson M, Evans R, Jakubowski EM, Hardy K, Johnson RC (2012) High-Throughput Immunomagnetic Scavenging Technique for Quantitative Analysis of Live VX Nerve Agent in Water, Hamburger, and Soil Matrixes. *Anal Chem* 84:10052–10057. doi: 10.1021/ac3025224

179. Phillips DJ, Bell-Alden B, Cava M, Grover ER, Mandeville WH, Mastico R, Sawlivich W, Vella G, Weston A (1991) Purification of proteins on an epoxy-activated support by high-performance affinity chromatography. *J Chromatogr A* 536:95–106. doi: 10.1016/S0021-9673(01)89239-6
180. Beyer NH, Hansen MZ, Schou C, Højrup P, Heegaard NHH (2009) Optimization of antibody immobilization for on-line or off-line immunoaffinity chromatography. *J Sep Sci* 32:1592–1604. doi: 10.1002/jssc.200800702
181. Matsumoto I, Ito Y, Seno N (1982) Preparation of affinity adsorbents with toyopearl gels. *J Chromatogr A* 239:747–754. doi: 10.1016/S0021-9673(00)82034-8
182. Gam L-H, Tham S-Y, Latiff A (2003) Immunoaffinity extraction and tandem mass spectrometric analysis of human chorionic gonadotropin in doping analysis. *J Chromatogr B* 792:187–196. doi: 10.1016/S1570-0232(03)00264-2
183. Barricklow J, Blatnik M (2013) 2-Arachidonoylglycerol is a substrate for butyrylcholinesterase: A potential mechanism for extracellular endocannabinoid regulation. *Arch Biochem Biophys* 536:1–5. doi: 10.1016/j.abb.2013.05.003
184. TOSOH Biosciences, Affinity chromatography, Toyopearl resin for AFC, technical document available at : <http://www.separations.eu.tosohbioscience.com>.
185. Wang J, Timchalk C, Lin Y (2008) Carbon nanotube-based electrochemical sensor for assay of salivary cholinesterase enzyme activity: an exposure biomarker of organophosphate pesticides and nerve agents. *Environ Sci Technol* 42:2688–2693.
186. Raveh L, Grunwald J, Marcus D, Papier Y, Cohen E, Ashani Y (1993) Human butyrylcholinesterase as a general prophylactic antidote for nerve agent toxicity. In vitro and in vivo quantitative characterization. *Biochem Pharmacol* 45:2465–2474.
187. Williams NH, Harrison JM, Read RW, Black RM (2007) Phosphorylated tyrosine in albumin as a biomarker of exposure to organophosphorus nerve agents. *Arch Toxicol* 81:627–639. doi: 10.1007/s00204-007-0191-8
188. Marsillach J, Hsieh EJ, Richter RJ, MacCoss MJ, Furlong CE (2013) Proteomic analysis of adducted butyrylcholinesterase for biomonitoring organophosphorus exposures. *Chem Biol Interact* 203:85–90. doi: 10.1016/j.cbi.2012.10.019
189. Carletti E, Aurbek N, Gillon E, Liodice M, Nicolet Y, Fontecilla-Camps J-C, Masson P, Thiermann H, Nachon F, Worek F (2009) Structure-activity analysis of aging and reactivation of human butyrylcholinesterase inhibited by analogues of tabun. *Biochem J* 421:97–106. doi: 10.1042/BJ20090091
190. Black RM, Clarke RJ, Read RW, Reid MTJ (1994) Application of gas chromatography-mass spectrometry and gas chromatography-tandem mass spectrometry to the analysis of chemical warfare samples, found to contain residues of the nerve agent sarin, sulphur mustard and their degradation products. *J Chromatogr A* 662:301–321. doi: 10.1016/0021-9673(94)80518-0
191. Fredriksson S-Å, Hammarström L-G, Henriksson L, Lakso H-Å (1995) Trace determination of alkyl methylphosphonic acids in environmental and biological

- samples using gas chromatography/negative-ion chemical ionization mass spectrometry and tandem mass spectrometry. *J Mass Spectrom* 30:1133–1143. doi: 10.1002/jms.1190300810
192. Tørnes JA (1996) Identification of Some Alkyl Methylphosphonic Acids by Thermospray Tandem Mass Spectrometry. *Rapid Commun Mass Spectrom* 10:878–882. doi: 10.1002/(SICI)1097-0231(19960610)10:8<878::AID-RCM596>3.0.CO;2-B
 193. Black RM, Read RW (1998) Analysis of degradation products of organophosphorus chemical warfare agents and related compounds by liquid chromatography–mass spectrometry using electrospray and atmospheric pressure chemical ionisation. *J Chromatogr A* 794:233–244. doi: 10.1016/S0021-9673(97)00611-0
 194. Swaim LL, Johnson RC, Zhou Y, Sandlin C, Barr JR (2008) Quantification of Organophosphorus Nerve Agent Metabolites Using a Reduced-Volume, High-Throughput Sample Processing Format and Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry. *J Anal Toxicol* 32:774–777. doi: 10.1093/jat/32.9.774
 195. Adams TK, Capacio BR, Smith JR, Whalley CE, Korte WD (2004) The application of the fluoride reactivation process to the detection of sarin and soman nerve agent exposures in biological samples. *Drug Chem Toxicol* 27:77–91.
 196. Wang L, Du D, Lu D, Lin C-T, Smith JN, Timchalk C, Liu F, Wang J, Lin Y (2011) Enzyme-linked immunosorbent assay for detection of organophosphorylated butyrylcholinesterase: A biomarker of exposure to organophosphate agents. *Anal Chim Acta* 693:1–6. doi: 10.1016/j.aca.2011.03.013
 197. Ashani Y (2000) Prospective of human butyrylcholinesterase as a detoxifying antidote and potential regulator of controlled-release drugs. *Drug Dev Res* 50:298–308. doi: 10.1002/1098-2299(200007/08)50:3/4<298::AID-DDR13>3.0.CO;2-X
 198. Carter MD, Crow BS, Pantazides BG, Watson CM, Thomas JD, Blake TA, Johnson RC (2013) Direct Quantitation of Methyl Phosphonate Adducts to Human Serum Butyrylcholinesterase by Immunomagnetic-UHPLC-MS/MS. *Anal Chem* 85:11106–11111. doi: 10.1021/ac4029714
 199. Mehrani H (2004) Simplified procedures for purification and stabilization of human plasma butyrylcholinesterase. *Process Biochem* 39:877–882. doi: 10.1016/S0032-9592(03)00195-X
 200. P. Masson, A. Sussmilch, J.P. Charlet Purification of butyrylcholinesterase from human plasma *CR Seances Acad. Sci. D.* 290 (13) (1980), pp. 857–903.
 201. Liyasova M, Li B, Schopfer LM, Nachon F, Masson P, Furlong CE, Lockridge O (2011) Exposure to tri-o-cresyl phosphate detected in jet airplane passengers. *Toxicol Appl Pharmacol* 256:337–347. doi: 10.1016/j.taap.2011.06.016
 202. Noort D, Fiddler A, van der Schans MJ, Hulst AG (2006) Verification of Exposure to Organophosphates: Generic Mass Spectrometric Method for Detection of Human Butyrylcholinesterase Adducts. *Anal Chem* 78:6640–6644. doi: 10.1021/ac060954t

203. Li H, Tong L, Schopfer LM, Masson P, Lockridge O (2008) Fast affinity purification coupled with mass spectrometry for identifying organophosphate labeled plasma butyrylcholinesterase. *Chem Biol Interact* 175:68–72. doi: 10.1016/j.cbi.2008.04.027
204. Ronco C, Foucault R, Gillon E, Bohn P, Nachon F, Jean L, Renard P-Y (2011) New Huprine Derivatives Functionalized at Position 9 as Highly Potent Acetylcholinesterase Inhibitors. *ChemMedChem* 6:876–888. doi: 10.1002/cmdc.201000523
205. <https://www.opcw.org/fr/fr/>, Fiche documentaire 4, Qu'est-ce qu'une arme chimique? Consulté le 16/06/2017.

RESUME

L'objectif de ce travail était de développer une méthode de traitement de l'échantillon permettant l'analyse par LC-MS² d'adduits formés entre des composés neurotoxiques organophosphorés (OPNA) et la butyrylcholinestérase, protéine plasmatique. En vue d'une automatisation totale du processus analytique, une étape d'immunoextraction a été couplée à un réacteur de digestion enzymatique (IMER), suivie d'une analyse par microLC-MS² afin de détecter le peptide adduit par l'OPNA. Tout d'abord, la synthèse d'IMER de pepsine a été optimisée. L'IMER le plus performant a été appliqué à la digestion de la BuChE afin d'analyser le peptide biomarqueur d'intoxication, par nanoLC-MS². Un IMER de pepsine, de dimensions supérieures a pu être rapidement intégré à un système d'analyse microLC-MS², permettant la digestion de la BuChE et l'analyse en ligne du peptide cible. Dans un second temps, une méthode d'extraction sélective a été développée par immobilisation de différents anticorps anti-BuChE sur un support solide appelé immunoadsorbant. Le protocole d'immunoextraction a été mis au point, puis les immunoadsorbants ont été caractérisés en termes de sélectivité et de rendement d'extraction avant d'envisager son couplage au digesteur enzymatique. La faisabilité du couplage a pu être clairement démontrée et ce dispositif automatisable a été appliqué à l'analyse de la BuChE de plasma humain, dopé par des OPNA. Cela a permis la détection rapide et sensible des adduits OPNA-BuChE, à partir de très faibles quantités de plasma.

ABSTRACT

The objective of this work was to develop a sample treatment method for the LC-MS² analysis of adducts formed between organophosphorus nerve agent (OPNA) and butyrylcholinesterase, a plasmatic protein. In order to fully automate the analytical process, an immunoextraction step was coupled to an enzymatic digestion reactor (IMER), followed by microLC-MS² analysis to detect the OPNA-peptide adduct. First, the synthesis of pepsin-based IMER was optimized. The most powerful pepsin-based IMER was applied to the digestion of HuBuChE to generate the peptide used as biomarker of OPNA intoxication that was further analyzed by nanoLC-MS². This pepsin-based IMER was then integrated into a microLC-MS² analytical system, allowing the on-line digestion of HuBuChE and the analysis of the target peptide. In a second step, a selective extraction method was developed by immobilizing anti-HuBuChE antibodies on a solid support, called immunosorbent. The immunoextraction protocol was developed and the immunosorbents were characterized in terms of selectivity and extraction yield before being coupled to the IMER. The feasibility of the coupling was clearly demonstrated and this automatable device was used for the analysis of HuBuChE from human plasma, spiked with OPNA. This allowed the fast and sensitive detection of OPNA-BuChE adducts in very small amounts of plasma.