



HAL
open science

Développement et validation de méthodes de protéomique innovantes pour des applications de biochimie clinique

Jerome Vialaret

► **To cite this version:**

Jerome Vialaret. Développement et validation de méthodes de protéomique innovantes pour des applications de biochimie clinique. Sciences agricoles. Université Montpellier, 2019. Français. NNT : 2019MONTT038 . tel-02479366

HAL Id: tel-02479366

<https://theses.hal.science/tel-02479366v1>

Submitted on 14 Feb 2020

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.

**THÈSE POUR OBTENIR LE GRADE DE DOCTEUR
DE L'UNIVERSITÉ DE MONTPELLIER**

PAR LA VALIDATION DES ACQUIS DE L'EXPERIENCE

Année universitaire 2018-2019

En Biologie Santé

École doctorale CBS2 – Sciences Chimiques et Biologiques pour la Santé

Unité de recherche – IRMB

Cellule souches, plasticité cellulaire, régénération tissulaire et immunothérapie des maladies

SYNTHÈSE DES TRAVAUX DE RECHERCHE :

Développement et validation de méthodes de protéomique
innovantes pour des applications de biochimie clinique

Présentée par Jérôme VIALARET

Le 26 Novembre 2019

Sous la direction du Pr. Christophe HIRTZ

Devant le jury composé de

Pr. Sylvain LEHMANN, Professeur des Universités– Praticien hospitalier, Université de Montpellier

Pr. Jérôme LEMOINE, Professeur des Universités, Université Claude Bernard Lyon 1

Dr. Pierre LESCUYER, Docteur, Université de Genève

Pr. Christine ENJALBAL, Professeur des Universités, Université de Montpellier

Dr. Jean-Marc BUSNEL, Docteur, Beckman Coulter Life Sciences

Pr. Christophe HIRTZ, Professeur des Universités, Université de Montpellier

Pr. Dominique DEVILLE DE PERIERE, Professeur des Universités – Praticien hospitalier, Université de Montpellier

Mr Stéphane MOREAU, Ingénieur, Shimadzu Europe

Mme Carole RAABON, Responsable pôle VAE du service de formation continue, Université de Montpellier

Représentant de l'école doctorale

Président du jury

Rapporteur

Rapporteur

Examineur

Examineur

Réfèrent

Invité

Invité

Invité



**UNIVERSITÉ
DE MONTPELLIER**

Table des matières

RESUME	5
ABSTRACT.....	6
REMERCIEMENTS	7
LISTE DES FIGURES	9
LISTE DES TABLEAUX.....	12
1 PROBLEMATIQUE.....	13
1.1 Le contexte.....	13
1.2 Le dosage de biomarqueurs protéiques.....	13
2 CHAPITRE I : INTRODUCTION GENERALE A LA PROTEOMIQUE	15
2.1 Les biomarqueurs.....	17
2.1.1 Définition d'un biomarqueur	17
2.1.2 Les différents types de biomarqueurs.....	17
2.2 Les biomarqueurs protéiques	19
2.2.1 Définition d'une protéine	19
2.2.2 La régulation des protéines.....	20
2.2.3 Les principales sources de diversité moléculaire des protéines.....	21
2.2.4 Bilan : la diversité moléculaire des protéines (les protéoformes).....	26
2.3 La spectrométrie de masse et son utilisation en biologie clinique	27
2.3.1 Le principe de la spectrométrie de masse	27
2.3.2 Les systèmes de spectrométrie de masse en biologie clinique	28
2.3.3 Les différents modes d'acquisition en biologie clinique.....	29
2.3.4 Les avantages et les inconvénients de la spectrométrie de masse en biologie clinique	30
2.3.5 Conclusion.....	31
2.4 La spectrométrie de masse pour identifier les protéines et leurs modifications	33
2.4.1 Définition des deux grands concepts en analyse protéomique: bottom-up vs top-down	33
2.4.2 L'approche bottom-up.....	34
2.4.3 L'approche top-down	36
2.4.4 Comparaison de ces deux types d'approches	38
2.5 Les fluides biologiques utilisés en biochimie clinique	40
2.5.1 Le sang total, le plasma et le sérum	40
2.5.2 Les échantillons sanguins en protéomique clinique	41
2.5.3 La préparation d'échantillons sanguins en protéomique clinique	42
2.5.4 Conclusion.....	47
2.6 La quantification de protéines et de leurs modifications par une approche bottom-up.....	48
2.6.1 Méthodes de quantification relatives	49

2.6.2	Méthodes de quantification absolues.....	53
2.6.3	Conclusions	59
2.7	La quantification absolue des protéoformes	60
2.7.1	La quantification absolue des protéoformes par une approche bottom-up.....	60
2.7.2	La quantification absolue des protéoformes par une approche top-down	62
2.8	Les sources de variabilité dans une approche bottom-up pouvant induire des échecs dans la validation de méthode.....	65
2.8.1	La préparation d'échantillon	65
2.8.2	L'analyse LC-MS	65
2.8.3	Le standard utilisé	66
2.9	Validation analytique d'une méthode de dosage de biomarqueurs protéiques par LC-MS	73
2.9.1	Définition des standards et réactifs critiques.....	73
2.9.2	Définir la droite d'étalonnage.....	76
2.9.3	Évaluation de la sensibilité	77
2.9.4	Évaluation de la sélectivité et de la spécificité	77
2.9.5	Évaluation de la contamination des échantillons.....	77
2.9.6	Évaluation de la répétabilité et de la fidélité intermédiaire	78
2.9.7	Évaluation de la justesse	79
2.9.8	Évaluation du taux de récupération	79
2.9.9	Évaluation de la stabilité de l'analyte	79
3	CHAPITRE 2 : LE PHENOTYPAGE DE L'APOLIPOPROTEINE E, FACTEUR DE RISQUE DE LA MALADIE D'ALZHEIMER	83
3.1	Introduction	83
3.2	Résultats	85
3.2.1	Introduction	85
3.2.2	Article scientifique :	86
3.3	Conclusions et nouveaux éléments.....	93
4	CHAPITRE 3 : LA QUANTIFICATION ABSOLUE DE L'HEPCIDINE DANS LE CADRE DES PATHOLOGIES LIEES AU METABOLISME DU FER.....	95
4.1	Présentation du biomarqueur « Hepcidine »	95
4.2	Résultats obtenus sur le dosage de l'hepcidine 25	98
4.2.1	Introduction	98
4.2.2	Article Scientifique	99
4.3	Conclusions et nouveaux éléments.....	108
5	CHAPITRE 4 : LA QUANTIFICATION SERIQUE D'UN ANTICORPS MONOCLONAL THERAPEUTIQUE, LE BEVACIZUMAB AVEC IMMUNO-ENRICHISSEMENT	112
5.1	Le dosage des anticorps monoclonaux thérapeutiques. Cas particulier du Bevacizumab.....	112
5.2	Résultats	115
5.2.1	Introduction	115
5.2.2	Article Scientifique	115

5.3	Conclusions et nouveaux éléments	128
6	CHAPITRE 5 : DEVELOPPEMENT ET VALIDATION DE METHODES DE PROTEOMIQUE INNOVANTES POUR DES APPLICATIONS DE BIOCHIMIE CLINIQUE : DISCUSSIONS/CONCLUSIONS 131	
6.1	Le phénotypage de l'Apolipoprotéine E, facteur de risque de la maladie d'Alzheimer	131
6.2	La quantification absolue de l'hepcidine dans le cadre des pathologies liées au métabolisme du fer	134
6.3	La quantification sérique du Bevacizumab (mAb) par LC-MRM avec immuno-enrichissement	136
6.4	La validation analytique d'une méthode LC-MS	138
6.5	Conclusions	143
7	CONCLUSION GENERALE	144
8	REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	146

Résumé

Depuis quelques années, la spectrométrie de masse est considérée comme la méthode de référence en chimie analytique. La « protéomique », concept qui a émergé dans les années 2000, consiste en l'identification et/ou la quantification d'un ensemble de peptides et protéines présents dans un échantillon donné (cellules, tissus, ou prélèvements biologiques), à un instant donné. Un champ plus spécifique de ce concept, la « protéomique clinique » concerne plus particulièrement l'étude du protéome pour la recherche d'une part, de marqueurs diagnostiques, pronostiques et de suivi thérapeutique des pathologies humaines et, d'autre part, d'acteurs physiopathologiques pouvant servir de cible thérapeutique.

Actuellement, les techniques de choix utilisée pour l'analyse des protéines en biochimie clinique sont des techniques d'immunoanalyses incluant le dosage immuno-enzymatique de type ELISA. Les inconvénients majeurs mêmes s'ils sont dépendants des techniques utilisées sont les limitations en multiplexage, la variabilité potentielle associée aux essais, pas de standardisation interne, et une difficulté à doser spécifiquement des protéoformes d'une même protéine.

La protéomique ciblée de type Liquid Chromatography-Multiple Reaction Monitoring (LC-MRM) permet de dépasser ces inconvénients car elle est multiplexable (>200 protéines/expérimentations), robuste, permet l'utilisation de standard protéique/peptidique interne, et l'identification d'une grande variété de modifications post traductionnelles.

Ce projet de thèse consiste donc à évaluer et valider des techniques de spectrométrie de masse ciblées de type LC-MRM pour la quantification de protéines d'intérêt cliniques. Dans ce cadre, trois développements de méthode de protéomique clinique vont être présentés : le phénotypage de l'Apolipoprotéine E, facteur de risque de la maladie d'Alzheimer ; la quantification sérique d'un anticorps monoclonal thérapeutique (Bevacizumab) avec immuno-enrichissement ; et la quantification absolue de l'hepcidine dans le cadre des pathologies liées au métabolisme du fer.

Abstract

In recent years, mass spectrometry has been considered in the analytical chemistry field as the reference method. "Proteomics", a concept that emerged in the 2000s, consists in the identification and/or quantification of peptides and proteins in different type of samples (cells, tissues, or biological samples), under various conditions. A more specific field of this concept, the "clinical proteomics" specifically concerns the study of proteome for the research in one hand, diagnostic markers, prognostic and therapeutic follow-up of human pathologies and, in the other hand, of pathophysiological actors that can serve as a therapeutic target.

Currently, the technology of choice used for the analysis of proteins in clinical biochemistry is the immunoassay including ELISA (Enzyme-linked immunosorbent assay) method. In general way, the major drawbacks of these techniques was a low multiplex capability, potential high variability, no internal standard, and the weak capability to distinguish proteoforms of one protein. The targeted proteomics by Liquid Chromatography-Multiple Reaction Monitoring (LC-MRM) allows to surpass these disadvantages because is highly multiplexable (> 200 proteins/analysis), robust, compatible to the use of protein/peptide standards, and is able to distinguish a wide variety of post translational modifications.

In this thesis project, evaluation and validation of the targeted mass spectrometry (LC-MRM) will be perform for the quantification of proteins with clinical interest. In this context, three clinical proteomics developments will be presented: apolipoprotein E phenotyping, considered as the best risk factor for Alzheimer's disease; monoclonal therapeutic antibody (Bevacizumab) quantification in patient serum; and absolute quantification of hepcidin-25 in the context of diseases related to iron metabolism.

Remerciements

Je remercie le Professeur Sylvain Lehmann, directeur du laboratoire de biochimie et Protéomique Clinique, d'avoir accepté mon projet de VAE de thèse de doctorat au sein de son laboratoire. De plus, j'exprime ma plus grande gratitude envers mon directeur de thèse, le Professeur Hirtz, directeur de la Plateforme de Protéomique Clinique qui a accepté de diriger cette thèse au format inhabituel.

Je voudrais ensuite remercier les rapporteurs Professeur Jérôme Lemoine et Monsieur Pierre Lescuyer pour leur travail de correction et pour avoir accepté d'évaluer ce travail de thèse.

Je remercie également le Professeur Christine Enjalbal pour encore une fois m'évaluer et cela depuis ma licence 3 ; Monsieur Jean-Marc Busnel, un expert en CE-MS, de prendre le temps de venir débattre de LC-MS; et enfin je remercie Monsieur Stéphane Moreau de faire le déplacement pour débattre « applications ». Je voudrai aussi remercier le Professeur Dominique Deville De Perrière pour son soutien permanent au cours de toutes ces années.

Ce travail de thèse réalisé en validation des acquis de l'expérience n'aurait jamais été possible sans le soutien du CHU et plus particulièrement du secteur plateforme, le service formation et le support de l'ANFH ; le service commun de formation continue de l'université de Montpellier et entre autres Mesdames Andreea Robu et Carole Raabon, ainsi que Madame Sylvie Pellizza du « Dispositif Académique de Validation des Acquis » de l'Académie de Montpellier.

Avant de parler de mon laboratoire, je voudrais citer quelques noms qui ont impacté ma vie professionnelle : Aurore Fauré et Anne Courteix ; Christine Enjalbal et Mr Aubagnac ; Diego Chiappe ; Michel Rossignol ; et aujourd'hui Christophe et Sylvain.

Je voudrais maintenant remercier tous les membres du LBPC pour leur support depuis 8 ans dont Christophe, mon directeur de thèse, sans qui toute cette aventure n'aurait pas été possible. Je pourrai citer par ordre d'ancienneté Constance, Monique, Carole, Cécile, Laurent, Sylvain, Christophe, Marine, Justine, Laura, Anaïs, Pauline, Nelly, et les petits nouveaux Jana, Marie-Laure, Laura, Aurore, Yuzo, Martin, et Sussanna.

Christophe et Sylvain m'ont recruté et m'ont fait confiance pour monter, faire grandir et prospérer la « Plateforme de Protéomique Clinique » qui a déjà parcouru un long chemin depuis ces 8 dernières années. D'une plateforme fantôme sans machine avec deux personnes, Christophe et moi, dans un bureau exilé à l'accueil de l'IRB ; nous avons évolué à une plateforme de 70 mètre carré composé de 4 systèmes LC-MS, 7 personnes, un site web et un compte LinkedIn ...

D'un point de vue scientifique, c'est la stimulation permanente grâce à Sylvain. Cela m'a permis de m'intéresser à de nombreux domaines, de construire énormément de collaborations, de réaliser « plein » de publications et de participer à de multiples conférences à des endroits comme Lisbonne, Barcelone, San Diego, San Antonio, Atlanta, Saint Louis, Saint Jacques de Compostelle, Dublin... Et de nombreux nouveaux projets ont déjà débuté ou sont sur le point de le faire : donc l'aventure n'est pas finie !

Mon épanouissement professionnel ne serait pas le même sans un bien être personnel. Christophe m'a initié au tennis pendant les pauses déjeuners pour me défouler des frustrations

professionnelles. Après quatre années de progrès modérés, surtout sur mon service, je me suis orienté vers la course à pied pour rejoindre ma femme dans ce challenge. Aujourd'hui, j'essaie de courir avec Alexandre ce qui me permet de discuter de modifications d'ARN entre deux courses fractionnées.

Pour revenir à ma femme Aurélie, tu es mon épicentre. On se soutient dans nos projets respectifs et je peux dire avec un peu de recul que cette thèse en VAE était un des projets qui a impacté notre vie de famille pendant toute cette année 2019. Merci de toute ton aide et de ton support.

Merci à Emma et Mathieu pour avoir été sages et compréhensifs pendant toutes les heures que j'ai passées devant mon ordinateur à écrire « mon livre », comme ils disent.

Il va bien falloir finir et arrêter de dire merci. Merci à toute la famille Vialaret et en particulier Nadine, Luc et Cédric ; merci à mes amis; merci aux collègues passés et actuels ; et encore merci Aurélie.

Liste des Figures

Figure 1: Illustration de la complexité protéique produit lors du processus d'expression (source : ThermoFisher)	19
Figure 2: Illustration des protéoformes possibles avec les sources de modifications créant cette diversité [7].	20
Figure 3: PTMs décrites sur les 20245 protéines humaines présentes dans la base de données SwissProt. Une répartition par PTM (a), ou par nombre de résidus modifiés par protéine (b) est réalisée [16].	22
Figure 4: Structure des acylations qui sont présentes sur les lysines [25].	23
Figure 5: Influence du degré de méthylation d'une lysine sur l'hydrophobicité et leur capacité à former des liaisons hydrogènes [26].	24
Figure 6: Principaux motifs de glycosylation [28]	25
Figure 7: Simulation du nombre théorique de protéoformes possible en ne prenant en compte que les sites les plus abondamment modifiés [16].....	26
Figure 8: Principe de fonctionnement d'une mesure en mode Multiple Reaction Monitoring (MRM) sur un triple quadripôle (TQ) Les ions générés par la source sont sélectionnés dans le premier quadripôle (Q1), sont fragmentés dans la cellule de collision et les ions fils produits sont sélectionnés dans le troisième quadripôle (Q3). Source : MRM atlas.	29
Figure 9: Profil chromatographique d'un peptide analysé avec différents Dwell Time [40].	30
Figure 10: Différentes approches d'identification et de caractérisation des protéines par spectrométrie de masse [44]	33
Figure 11: Différentes possibilités de fragmentation d'une chaîne peptidique et leurs nomenclatures.	35
Figure 12: Processus d'exploitation des données par les logiciels Bruker [60]	37
Figure 13: Analyse bottom-up d'un mélange de protéoformes d'une protéine conduisant à une perte d'information après l'étape de digestion des protéines.	38
Figure 14: Diagramme représentant la distribution différentielle des protéines majoritaires du plasma [70].	40
Figure 15: La gamme de concentration de 70 protéines plasmatiques [74].	41
Figure 16: Évaluation de la déplétion des protéines abondantes pour l'analyse de la protéine TAU	42
Figure 17: Gammes d'étalonnage du Bevacizumab (BV) obtenues avec 3 préparations d'échantillon différentes [124] modifiée pour ce manuscrit.(nSMOL : nano-Surface and Molecular Orientation Limited proteolysis)	45
Figure 18: gel 1D SDS-PAGE en condition dénaturante et coloration au bleu de Coomassie. Dépôt de sérum dilué, de sérum après capture protéine A et de marqueurs de taille. Sur la piste après capture protéine A, la bande correspondant à l'albumine (66kDa) a complètement disparu, et les bandes majoritaires correspondant aux chaînes légères (28kDa) et lourdes (51kDa) des anticorps de l'échantillon sont majoritaires.....	46
Figure 19: Les principales méthodes de quantification utilisées en spectrométrie de masse..	48
Figure 20: Principe du marquage SILAC [160].	49
Figure 21: Réactif ICAT utilisé pour le marquage des peptides	50
Figure 22: Les réactifs TMT utilisés pour les analyses multiplexes. Les atomes portant un marquage isotopique sont indiqués par un astérisque.	51
Figure 23: Schéma réactionnel d'insertion de H ₂ ¹⁸ O lors de la digestion à la trypsine d'une protéine [163]	51

Figure 24: Représentation du mode de balayage DIA. Le schéma d'acquisition de données SWATH-MS pour un spectromètre de masse Q-TOF utilise 32 balayages MS2 avec des incréments définis de 25 m/z, débutant à 400 m/z et se terminant à 1200 m/z. Une analyse MS1 complète est enregistrée au début (C). En appliquant un temps d'acquisition de 100 ms par balayage, on obtient un temps de cycle total d'environ 3,3 s (B) [174]. Dans la figure, le segment 925-950m/z est isolé et fragmenté (D) [175].....	52
Figure 25: Principe de réalisation d'une gamme d'étalonnage par dilution isotopique	53
Figure 26: Principe des ajouts d'étalons en gamme et en échantillon	53
Figure 27: Illustration de la justesse et de la fidélité d'une méthode.....	54
Figure 28: Stratégie de quantification absolue des protéines par bottom-up. Les étapes d'ajouts des étalons internes dépendent de la stratégie utilisée.....	54
Figure 29: Processus de la sélection d'une cible protéique à l'obtention d'une méthode quantitative de LC-MRM	56
Figure 30: Analyse des séquences protéique entre la Serum Amyloid A1 et A2. Les amino-acides spécifiques d'une isoforme sont notés en bleu (pour SAA1) ou en rouge (pour SAA2)	61
Figure 31: Comparaison des séquences protéiques de l'alpha synucléine et ses variants, et la beta synucléine. En vert sont notés les peptides protéotypiques pour chaque espèce	61
Figure 32: Représentation des protéoformes de la protéine Sérum Amyloïde A. Deux isoformes (SAA 1 et) et différents variants sont détectés (SAA 1.1, 1.2, 1.3, 2.1, 2.2). Ces différentes formes sont identifiées en forme intacte (wild), avec une troncation du premier aminoacide (des-R), ou des deux premiers (des-RS) [106].....	63
Figure 33: Variabilité des différentes protéoformes de SAA1.1 sur 80 patients dosés. Les portions relatives ont été tracées pour tous les échantillons et triées par ordre de concentrations mesurées [106].....	63
Figure 34: Sites de modifications post-traductionnelles identifiées et positionnées sur la séquence de l'Apo AI [229].	64
Figure 35: Courbes d'étalonnage représentant les déviations par rapport à la concentration théorique. Les trois transitions d'un même peptide sont représentées de trois couleurs différentes. Des conditions de spray instables ont entraîné une augmentation du CV.	66
Figure 36: Courbes d'étalonnage représentant les déviations par rapport à la concentration théorique. A : Interférence sur la transition rouge. B : Saturation des transitions Bleu et rouge aux fortes concentrations.....	66
Figure 37: CV (A) et exactitude (Accuracy) (B) obtenus sur la quantification de différents peptides de l'alpha synucléine en utilisant différents étalons [232].....	68
Figure 38: Evolution de l'aire de différents peptides au cours du temps, dans des conditions de digestion (37°C, pH 8,5) (A); et dans les conditions du passeur d'échantillon (4°C, pH 2,8) (B) [234].	69
Figure 39: Illustration d'un peptide stable dans le temps (bleu), et instable (rouge)	70
Figure 40: Effet des conditions de digestion sur la récupération de différents peptides. Le ratio de la protéine endogène digérée contre la protéine ¹⁵ N pré-digérée [235].	70
Figure 41: Cinétique de digestion de différents peptides. Le peptide avec le symbole "cercle" représente le produit de la digestion. Le peptide avec le symbole "carré" représente la coupure partielle. Le peptide avec le symbole "triangle" est un contrôle de digestion [241].	71
Figure 42: Structure tertiaire (A) et secondaire (B) de l'ApoE. Avec une étoile rouge sont représentés les deux sites de mutations d'amino-acides.....	83
Figure 43: Séquence protéique de l'apolipoprotéine E (P02649). En gras, les amino acides en position 112 et 158.....	85

Figure 44: Chromatogramme LC-MRM d'une analyse ApoE. Les 4 peptides analysés élurent dans l'ordre suivant : LAV ... (LAVYQAGAR), LGA ...DVR (LGADMEDVR), cLA (C[CAM]LAVYQAGAR), LGA...cGR (LGADMEDVC[CAM]GR).	93
Figure 45: Protocole optimisé pour une utilisation routinière au LBPC.	94
Figure 46: Différentes formes d'hepcidine [263].	95
Figure 47: Structure tridimensionnelle de l'hepcidine 25	96
Figure 48: Comparaison des résultats de dosages obtenus par LC-MRM et par ELISA. A: comparaison directe des valeurs de concentration. B: Représentation Bland-Altman pour comparer les concentrations obtenues dans les deux méthodes.	98
Figure 49: Répartition des dosages d'hepcidine en fonction des programmes de recherche. Les analyses sont principalement réalisées dans le sérum hormis la mise au point, la valorisation, et le dosage de quelques échantillons de LCR (CSF) du laboratoire.	108
Figure 50: Suivi de la stabilité d'hepcidine sur un échantillon QC à 50 ng/mL après extraction conservé à 4°C. En bleu est représenté l'aire d'hepcidine endogène, et en rouge l'aire de l'hepcidine marquée. Le début des analyses a commencé le 13 janvier à 19h58 pour finir le 14 janvier à 11h15.	109
Figure 51: Suivi de la stabilité d'hepcidine sur un échantillon QC à 50 ng/mL après extraction conservé à 4°C. Le ratio d'aire (aire d'hepcidine endogène / aire de l'hepcidine marquée) est représenté. Le début des analyses a commencé le 13 janvier à 19h58 pour finir le 14 janvier à 11h15.	110
Figure 52: Suivi du biais sur l'hepcidine endogène (A) et marquée (B) sur 8 échantillons préparés et stockés à -20°C.	110
Figure 53: Suivi du biais analytique sur l'hepcidine endogène (A), marquée (B), et le ratio des aires (C) sur 7 points de gamme préparés et stockés à -20°C.	110
Figure 54: Concentrations théoriques du modèle à l'état d'équilibre après administration de Bevacizumab à 5 mg / kg toutes les 2 semaines [294].	113
Figure 55: Représentation Bland-Altman des valeurs de dosage obtenues par Bioplex et par MRM.	129
Figure 56: Concentration de Bevacizumab sérique en fonction des cycles de traitements. Le carré correspond à la médiane des patients avec effets secondaires (n=5); le triangle correspond à la médiane des patients avec rechute (n=4) ; le losange correspond à la médiane des patients répondant favorablement au traitement (n=4).	130
Figure 57: Exemple de rapport fourni pour montrer la présence du peptide cible (en rouge) confronté au peptide standard (bleu). La coche verte indique si la présence du peptide a été validée, et la croix rouge indique l'opposé.	131

Liste des tableaux

Tableau 1: Guide de sélection d'un peptide pour une analyse LC-MRM.....	58
Tableau 2: Différentes formes d'alpha synucléine détectées par spectrométrie de masse [62].	62
Tableau 3: Qualification d'un peptide standard [212].	74
Tableau 4: Synthèse des paramètres analytiques à valider lors d'une validation de méthode. 80	
Tableau 5: Différentes combinaisons possibles en fonction des 4 peptides détectés pour élucider le génotype du patient	85
Tableau 6: Etude de corrélation des différents peptides dosés sur 94 échantillons.....	129
Tableau 7: Ratio de transition pour les différents peptides d'ApoE. Le ratio de transition a été calculé sur les peptides marqués spikés dans 30 plasmas de patients différents.....	132
Tableau 8: Tableau récapitulatif de tous les paramètres analytiques évalués pour les trois différentes applications. En gris clair, les performances qui sont hors des seuils d'acceptation	139

1 PROBLEMATIQUE

1.1 *Le contexte*

La Plateforme de Spectrométrie de Masse Clinique (PPC) est située au CHU de Montpellier (CHU Saint Eloi), localisée au sein de l'Institut de recherche en Médecine Régénératrice et Biothérapie (IRMB). La plateforme a émergé en 2008 du Laboratoire de Biochimie et Protéomique Clinique (LBPC) dirigé par le Pr. Sylvain Lehmann. La Plateforme de Spectrométrie de Masse Clinique vise à exploiter les derniers développements technologiques en spectrométrie de masse pour la découverte, la validation et l'utilisation de biomarqueurs dans de nombreuses pathologies humaines (protéines, ARN, ADN, métabolites). Intégrée au Pôle Protéome de Montpellier depuis sa création et labellisée IBISA, son but est également de rendre disponible aux équipes académiques et industrielles, une expertise médicale, biologique et technique en Protéomique Clinique. La PPC est labélisée ISO 9001 depuis 2014.

Ce doctorat est effectué au sein de la PPC hébergée au sein du LBPC dirigé par le Pr. Lehmann. Ce laboratoire est un site annexe du Laboratoire de Biologie Médicale du CHU de Montpellier. L'étude des biomarqueurs protéiques se fera dans ce projet de thèse, comme dans l'activité journalière du laboratoire, sous l'angle d'une utilisation future en usage clinique.

1.2 *Le dosage de biomarqueurs protéiques*

La définition physico-chimique proprement dite du biomarqueur est une étape complexe car un organisme vivant est comme toute chose dans la nature, un processus à adaptation permanente. L'expertise développée au cours de cette thèse se focalise sur l'étude des biomarqueurs protéiques. Cependant, les protéines sont-elles mêmes régulées en amont au niveau génétique ou transcriptomique.

Un biomarqueur est une seule espèce protéique clé. Dans le cas où la méthode d'analyse n'est pas assez spécifique, le dosage portera sur un mélange d'espèces de la même protéine présentant différentes modifications que l'on définira comme « protéoformes ». Dans le cas le plus spécifique, les méthodes analytiques seront capables de doser une protéoforme.

Pour être certain de la spécificité de dosage d'une protéoforme, la méthode d'analyse directe des protéines (top-down) est la plus performante. Dans les approches les plus utilisées de « bottom-up », la digestion de la protéine cible conduit souvent à une perte d'information. Le choix entre les deux approches semble donc facile à réaliser mais les approches « top-down » sont aujourd'hui encore trop peu sensibles et trop complexes pour être mise en œuvre pour tous les projets.

Dans les chapitres suivants, il sera successivement détaillé le dosage top-down d'une petite protéine qui est l'hepcidine 25. Les deux autres chapitres s'appuieront sur une approche bottom-up pour détecter les différents allèles du gène de l'apolipoprotéine E, ou pour doser la quantité totale de Bevacizumab.

La spectrométrie de masse étant particulièrement spécifique, elle est considérée comme la

méthode de référence. Cependant, sa reproductibilité constitue une des limitations par rapport à des automates d'immuno-essais par exemple. En effet, la procédure d'analyse est dépendante de la qualité de l'échantillon et de sa composition (effet matrice). Pour atteindre des performances analytiques optimales, une préparation d'échantillon adéquate doit être mise en œuvre.

Ainsi, nous aborderons une préparation d'échantillon minimale pour la détection des différents allèles du gène de l'apolipoprotéine E, une préparation basée sur de la précipitation de protéine pour la quantification de l'hepcidine 25 et enfin une préparation basée sur de l'affinité avec de la protéine A pour le dosage du Bevacizumab.

La quantification ciblée est aujourd'hui très majoritairement utilisée dans les laboratoires de biologie médicale mais d'autres approches sont également possibles. A l'intérieur de la quantification ciblée, de nombreuses variables sont encore présentes et dépendantes des biomarqueurs protéiques cibles. Dans le cas d'une approche bottom-up, la quantification d'une protéine est réalisée à partir d'un peptide qui doit représenter la quantité de celle-ci le plus fidèlement possible. Dans le cas d'une approche top-down, le standard utilisé doit être identique à la protéine cible pour refléter exactement son comportement physico-chimique. Les cas d'étude présentés détailleront l'utilisation de protéines standards pour le dosage de l'hepcidine 25 et du Bevacizumab, et l'utilisation de peptides standards pour la quantification des différents allèles du gène de l'apolipoprotéine E.

Les méthodes analytiques nouvellement développées doivent démontrer leurs capacités à donner des résultats robustes quelles que soient les conditions opératoires. Différentes normes ont été éditées par les sociétés savantes pour évaluer les performances analytiques. Enfin, les normes de validations cliniques permettent d'assurer que la méthode dans un laboratoire produit des résultats fiables c'est-à-dire qu'ils soient comparables à d'autres méthodes ou à d'autres sites d'analyse, et avec un niveau d'incertitude maîtrisé.

Les validations réalisées pour l'apolipoprotéine E, l'hepcidine 25 et le Bevacizumab seront présentées et discutées dans les chapitres suivants.

2 Chapitre I : INTRODUCTION GENERALE A LA PROTEOMIQUE

Les innovations récentes en spectrométrie de masse permettent l'utilisation de cette technologie en pratique analytique courante dans les laboratoires de biologie clinique.

- **Les applications en bactériologie-mycologie** sont incontournables et toujours en expansion. L'identification rapide des micro-organismes par MALDI-TOF (Matrix Assisted Laser Desorption Ionisation / Time Of Flight) repose sur l'analyse des protéines ribosomales et des protéines associées aux membranes, après transfert d'une colonie ou extraction des protéines. Elle passe par une comparaison des spectres obtenus avec des spectres de référence validés. Au niveau des performances, les publications font état d'au moins 90 % de concordance avec les méthodes d'identification conventionnelles.
- **Le suivi thérapeutique-pharmacologie** est aussi un domaine d'application important. De nombreuses applications ont été publiées comme certains immunosuppresseurs (ciclosporine, tacrolimus, sirolimus, everolimus, acide mycophénolique), neuroleptiques (clozapine, haloperidol, penfluridol, thioridazine, flupenthixol, zuclopenthixol), hypnotiques dont les benzodiazépines (lorazepam, bromazepam, flunitrazepam, clonazepam, alprazolam, zopiclone, zolpidem), antimycosiques (posaconazole), antihistaminiques, antirétroviraux.
- **Les applications en toxicologie** (toxiques, dopage, stupéfiants) sont aussi très répandues. Les applications peuvent être divisées en trois catégories avec le dosage des toxiques (jusqu'à 34 métaux dosés), les applications sur le dopage avec la détection et l'identification de stéroïdes anabolisants (nandrolone et métabolites : norandrostérone et noréthiocholanolone) et le dosage de stupéfiants comme les opiacés, cocaïniques, buprénorphine et norbuprénorphine, cannabis, LSD, dérivés de l'ecstasy, GHB, et la kétamine.
- La dernière grande catégorie concerne **les applications en biochimie** dont certaines sont devenues des méthodes de référence. Par exemple, le dosage des formes de vitamine D qui comprend la forme D2 d'origine médicamenteuse, et la forme D3 d'origine endogène ou alimentaire. Un autre exemple est le dosage des stéroïdes par LC-MS/MS pour les formes conjuguées. Grâce aux capacités de multiplexage, le suivi de désordres métaboliques est essentiellement réalisé par spectrométrie de masse. Le diagnostic et le suivi des maladies héréditaires du métabolisme tel que les aminoacidopathies, déficits du cycle de l'urée, aciduries organiques, déficits de la β -oxydation des acides gras (dont le profil des acylcarnitines) sont aussi réalisés par LC-MS. Dans les applications de biochimie, si une grande partie des biomarqueurs sont des protéines, elles restent absentes de la liste des analytes cliniques dosés par spectrométrie de masse. Cette classe de biomarqueurs clinique est aujourd'hui dosée

principalement par des méthodes d'immuno-dosages, les applications par spectrométrie de masse restant encore confidentielles.

Nous présenterons dans cette thèse les limitations et les challenges qu'il reste à relever pour envisager le remplacement des immuno-dosages des biomarqueurs protéiques par la spectrométrie de masse à large échelle.

2.1 Les biomarqueurs

2.1.1 Définition d'un biomarqueur

La découverte de nouveaux biomarqueurs est d'un intérêt tout particulier dans le domaine clinique que ce soit comme outils de diagnostic ou pour suivre l'effet d'un traitement.

Selon la définition proposée par le National Institute of Health, un biomarqueur est : « une caractéristique qui est objectivement mesurée et évaluée comme un indicateur de processus biologiques normaux ou pathologiques, ou de réponses pharmacologiques à une intervention thérapeutique ».

Un biomarqueur doit avoir certaines caractéristiques : (i) une grande sensibilité et sélectivité ; (ii) des performances reproductibles dans le temps ; (iii) un cut-off clair entre deux situations ; (iv) des résultats faciles à obtenir dans un délai rapide et un coût raisonnable.

2.1.2 Les différents types de biomarqueurs

Le terme "Omics" se réfère à l'analyse des différents domaines de la biologie. Les 4 principaux « Omics » sont la génomique qui est consacrée aux techniques d'étude du génome entier, la transcriptomique qui est l'analyse de l'ARNm et du niveau d'expression des gènes dans un tissu, la protéomique qui étudie la composition des protéines dans un tissu, et la métabolomique qui étudie les produits métaboliques.

Ces analyses permettent donc d'identifier des biomarqueurs qui fournissent des indices quant à la présence d'une maladie existante ou à la possibilité d'en développer une dans le futur. Ainsi, le terme biomarqueur peut désigner par exemple une mutation dans l'ADN, certains produits métaboliques (métabolites) ou la présence de cellules modifiées au sein d'un tissu.

Gènes et ARN

Les mutations des gènes sont impliquées dans un certain nombre de pathologies. Dans le cas des pathologies Alzheimer, des mutations dans les gènes PSEN1, PSEN2 et APP sont responsables des formes précoces familiales de la maladie. D'autres mutations sur le gène APOE induisent un risque plus élevé de développer une forme tardive de la maladie d'Alzheimer d'un facteur 3 avec un allèle APOEε4 et d'un facteur 12 avec deux allèles [1].

Les ARN (Acide RiboNucléique) peuvent aussi être utilisés comme biomarqueurs. La dérégulation de l'expression des microARN dans le sang est une source intéressante en cours d'évaluation pour le diagnostic de la maladie d'Alzheimer et d'autres troubles neurologiques. Schipper *et al.* [2] ont identifié un certain nombre de miARN régulés (miR-34a, miR-81b et let-7f) en comparant des patients atteints de maladie d'Alzheimer sporadique et des patients témoins utilisant une puce à microarray.

Aussi bien au niveau de l'ADN (Acide DésoxyriboNucléique) que de l'ARN, des modifications peuvent intervenir pour réguler les gènes. On parle respectivement d'épi-génétique et d'épi-transcriptomique. La méthylation des bases est la modification majoritaire de l'ADN/ARN qui joue un rôle important dans le contrôle des gènes.

Les protéines

Les protéines sont impliquées dans tous les processus cellulaires majeurs. Chez *Homo sapiens*,

Le protéome plasmatique est composé d'une très grande diversité protéique. Ces dernières sont issues d'environ 20000 gènes et la diversité des protéines provient par exemple de l'épissage alternatif ou des modifications post-traductionnelles qui seront décrites dans la partie suivante. Des biomarqueurs protéiques sont aussi couramment utilisés en clinique pour le diagnostic/confirmation de la maladie d'Alzheimer [3] grâce à la quantification dans le liquide céphalo-rachidien (LCR) de A β -42, tau et p-tau dont leurs taux sont impactés.

Les métabolites

Le métabolome correspond à l'ensemble des métabolites contenus dans un milieu biologique donné. Les métabolites sont des composés organiques de faibles masses moléculaires issus des différents processus métaboliques. La métabolomique est l'analyse semi quantitative ou quantitative du métabolome. Les outils d'analyses de choix pour les analyses métabolomique sont la résonance magnétique nucléaire (RMN) et la spectrométrie de masse. Par exemple, Shaham *et al.* ont mis en évidence par spectrométrie de masse des biomarqueurs métaboliques dans le plasma pour une maladie liée à un dysfonctionnement de la chaîne respiratoire [4]. En effet, le lactate, l'alanine et la créatine sont significativement augmentés dans le plasma des patients en comparaison des contrôles. Les analyses métabolomiques ont aussi permis de mettre en évidence des biomarqueurs pour les cancers [5] et pour les maladies neurodégénératives [6].

2.2 Les biomarqueurs protéiques

2.2.1 Définition d'une protéine

Les protéines, découvertes en 1838, correspondent à toute substance polymère complexe et ayant une activité biologique, composée d'acides aminés liés par des liaisons peptidiques. D'autres types de liaisons sont responsables de la création d'une structure tridimensionnelle caractéristique des protéines qui peut être fibreuse, globulaire ou plissée. Les protéines sont essentielles pour tous les organismes vivants. Sous forme d'enzymes, elles régulent certains aspects du métabolisme. Les protéines structurales telles que la kératine et le collagène fabriquent la peau, les griffes, les os, les tendons et les ligaments ; les protéines des muscles produisent le mouvement ; l'hémoglobine transporte l'oxygène ; et les protéines des membranes régulent le mouvement de substances à travers les cellules.

Les protéines sont issues d'environ 20000 gènes chez l'humain. La complexité du protéome, dont la taille estimée est comprise entre 20000 (20399 entrées dans la base neXtprot du 22 août 2019) et plusieurs millions, ne provient pas d'un grand nombre de gènes mais plutôt de modifications au niveau des protéines. Cette complexité peut être créée au niveau de l'ADN, ARN ou directement au niveau des protéines et est représentée par un terme, introduit en 2013, englobant toutes les modifications possibles d'une protéine : les PROTEOFORMES [7] (Figure 1).

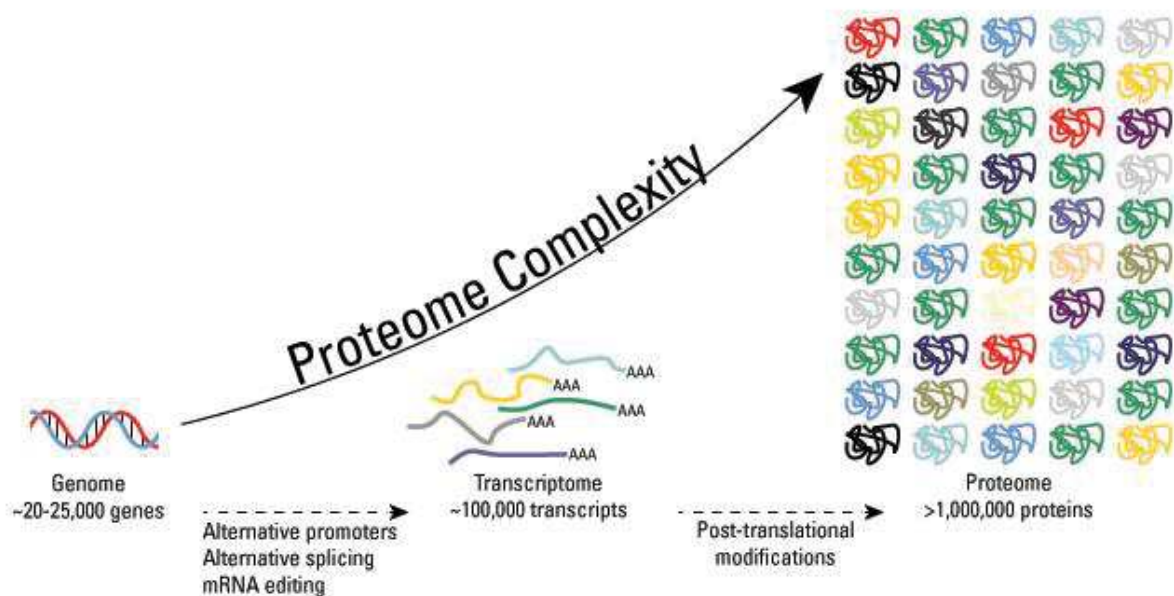


Figure 1: Illustration de la complexité protéique produit lors du processus d'expression (source : ThermoFisher)

2.2.2 La régulation des protéines

Une entité protéique provient d'un seul gène. L'ensemble des modifications que peut présenter cette protéine est regroupé sous le terme protéoforme. La séquence protéique de « référence » peut subir des modifications grâce à des régulations au niveau de son expression (polymorphismes nucléotidiques et mutations au niveau de l'ADN, épissage alternative, substitutions de base nucléosidiques, décalage des cadres de lectures, et erreurs lors de l'étape de traduction), ou au niveau protéique (modifications post-traductionnelles, et clivages) (Figure 2).

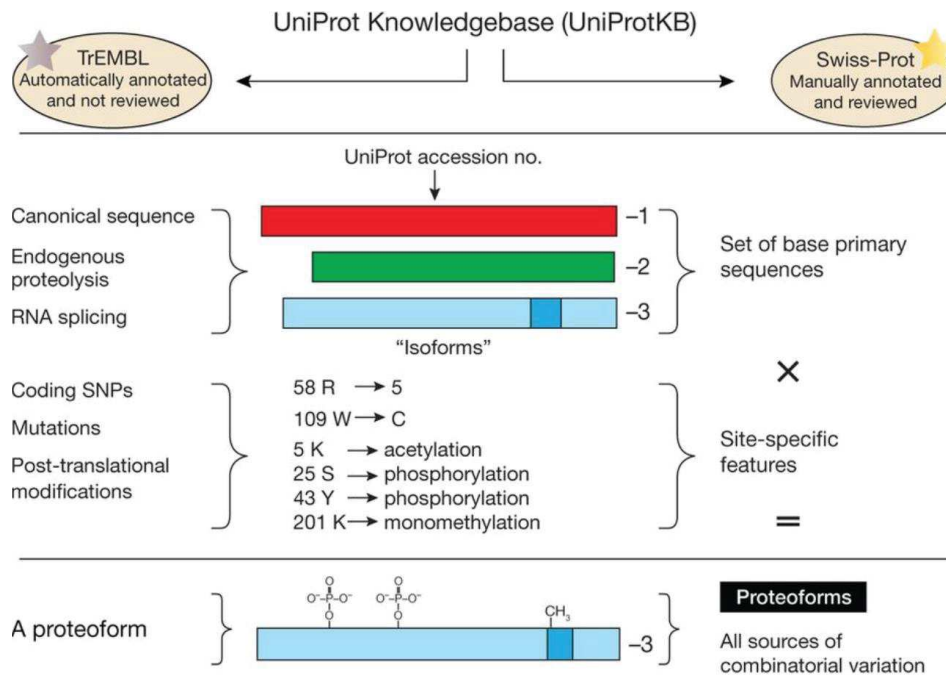


Figure 2: Illustration des protéoformes possibles avec les sources de modifications créant cette diversité [7].

Plus de 33000 isoformes issues d'épissage alternatif, 78000 mutations d'un acide aminé et environ 53000 modifications post-traductionnelles (PTMs) sont répertoriés dans la base de données humaine Swissprot; ce qui représente un grand nombre de protéoformes théoriquement observables. Ponomarenko *et al.* [8], l'ont évalué à 6,13 millions mais il est probable que ce nombre soit réévalué dans les années à venir.

Ces chiffres posent la question de la diversité et du nombre réel des protéoformes ainsi que de la complexité de l'analyse à mettre en œuvre. Par exemple, pour l'histone H4 en ne prenant seulement en compte que les 13 modifications post-traductionnelles les plus fréquentes, le nombre théorique de protéoformes est de 98304 alors que seulement 75 protéoformes ont été observées [9].

2.2.3 Les principales sources de diversité moléculaire des protéines

- Polymorphismes nucléotidiques et mutations au niveau de l'ADN

La régulation de l'expression des protéines peut se faire au niveau de l'ADN par les polymorphismes nucléotidiques et les mutations non synonymes présents dans les régions codantes de l'ADN. Actuellement, 135000 sont décrits et validés dans la base de données SwissProt chez l'humain. Dans la base de données dbSNP (The Single Nucleotide Polymorphism Database) contenant des variations de nucléotides simples, des microsatellites et des insertions et délétions à petite échelle, 4,7 millions de polymorphismes sont prédits dont environ 670000 ont été identifiés comme codant. Le corps humain ne présente bien sûr pas toutes ces modifications de façon simultanées mais cela donne un ordre de grandeur des possibles.

- L'épissage alternatif

L'épissage alternatif permet la production de plusieurs ARNm matures à partir d'un seul ARN pré-messager, et les séquences codantes peuvent varier entre les différents ARNm matures. Un gène peut ainsi coder plusieurs protéines. Si les protéines produites à partir d'un gène sont différentes mais qu'elles conservent entre elles des grandes régions identiques, on les qualifie d'isoformes.

L'épissage alternatif permet d'ajouter un niveau de contrôle supplémentaire dans l'expression des gènes et d'augmenter la diversité des protéines [10]. En effet, d'après une étude RNAseq, l'épissage alternatif concerne environ 93% des gènes, mais seulement 86% des gènes produisent une isoforme à une fréquence supérieure à 15% c'est-à-dire à un niveau d'expression non négligeable [11].

- Les substitutions de base nucléosidiques

Au moment de l'édition, l'ARN peut incorporer de l'inosine (I à la place de A). Plus de 4,5 millions de substitution adénine/inosine ont été détectés dans les transcrits dont environ 4400 donnent lieu à des modifications d'expression d'aminoacides [12]. Un remplacement de C par U a aussi été observé dans les ARN de transfert [13].

- Décalage des cadres de lectures

Dans les ARNm, la région codante ou séquence codante (aussi appelée CDS pour Coding DNA Sequence), code pour une protéine spécifique. Il y a quelques années encore une seule séquence codante était attribuée à chaque ARNm mature, et donc une seule protéine. Les « protéines de référence » sont répertoriées dans des bases de données telles qu'Uniprot. Des séquences codantes alternatives ont récemment été décrites [14].

- Erreur lors de l'étape de traduction

Cette étape est aussi une source d'erreur et donc une source de variabilité pour le protéome. Un taux d'erreur entre 0,01 et 0,1% a été estimé pour qu'un amino-acide soit incorporé à la place d'un autre pendant l'étape de traduction [15].

- **Les modifications post-traductionnelles**

La base de données SwissProt, en octobre 2017, référençait environ 53000 PTMs dont la plus représentée est la phosphorylation (Figure 3a).

Un nombre important de protéines n'ont pas de PTMs décrites dans cette base de données, alors que d'autres protéines sont très modifiées avec plus de 11 PTMs annotées sur leurs séquences (Figure 3b).

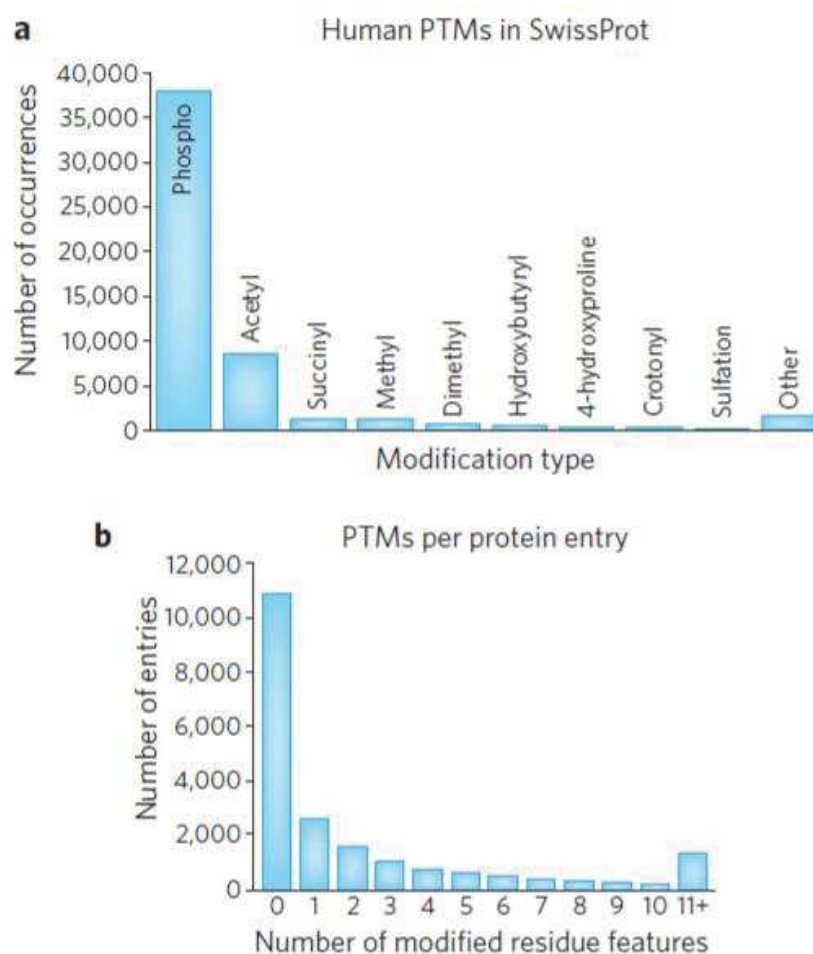


Figure 3: PTMs décrites sur les 20245 protéines humaines présentes dans la base de données SwissProt. Une répartition par PTM (a), ou par nombre de résidus modifiés par protéine (b) est réalisée [16].

Les modifications post-traductionnelles peuvent être classées en deux groupes en fonction de leurs complexités structurales [17]: de structures simples, ou de structures complexes comprenant des ramifications sur la modification (polymère protéique ou glycosidique).

- **Les modifications post-traductionnelles simples**

Il s'agit de modifications linéaires des amino-acides. Elles sont à opposer aux modifications post-traductionnelles complexes ou branchées qui sont des polymères protéiques ou glycosidiques.

- **La phosphorylation**

La phosphorylation est une modification post-traductionnelle réversible qui se caractérise par l'ajout d'un groupement phosphate (PO_3^{2-}) principalement sur les sérines, thréonines et dans une moindre mesure les tyrosines. Le groupement phosphate possède à pH physiologique deux charges négatives.

La phosphorylation est un processus dynamique. Les protéines sont phosphorylées par l'intermédiaire des kinases et sont dé-phosphorylées par l'intermédiaire des phosphatases.

- Acétylation

L'acétylation consiste en l'ajout d'un groupement $\text{CO}(\text{CH}_3)$ sur l'amine N-terminale d'une protéine ou bien sur l'amine de la chaîne latérale des lysines. Le groupement acétyl neutralise alors la charge présente sur ce groupement. L'acétylation des protéines en N-terminal et des lysines est un processus distinct n'impliquant pas les mêmes enzymes [18].

Contrairement à l'acétylation des lysines, l'acétylation en N-terminale semble être un processus non-réversible. En effet, aucune enzyme permettant une désacétylation de l'amine N-terminale n'a été encore découverte. L'acétylation est un cas particulier d'acylation qui correspond à l'ajout d'un groupement acétyle.

- Acylation

D'autres acylations ont plus récemment été identifiées comme la formylation [19], succinylation [20], malonylation [21], butyrylation [22], propionylation [22], glutarylation [23] et crotonylation [24] (Figure 4).

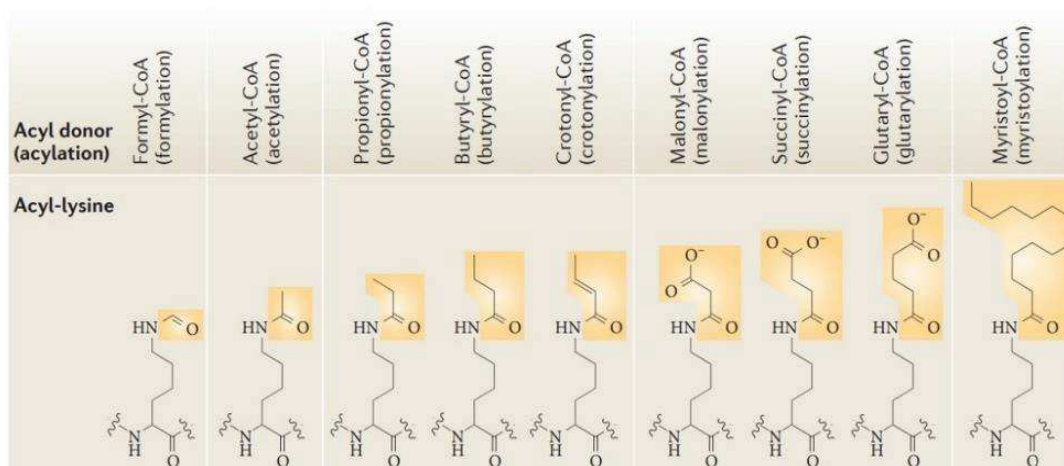


Figure 4: Structure des acylations qui sont présentes sur les lysines [25].

L'acylation est une modification post-traductionnelle qui est supposée réversible et entraînant la neutralisation de la charge initialement présente sur la lysine.

- Méthylation

La méthylation des protéines consiste en l'ajout d'un ou plusieurs groupements méthyle (CH_3) sur les acides aminés suivants : lysine, arginine, acide aspartique, acide glutamique, méthionine, cystéine, histidine, glutamine et asparagine. Bien que la méthylation puisse se produire sur ces 9 acides aminés, la lysine et l'arginine sont les principaux acides aminés concernés et seront ceux abordés. La lysine et l'arginine peuvent être modifiées par plusieurs groupements méthyl (Figure 5).

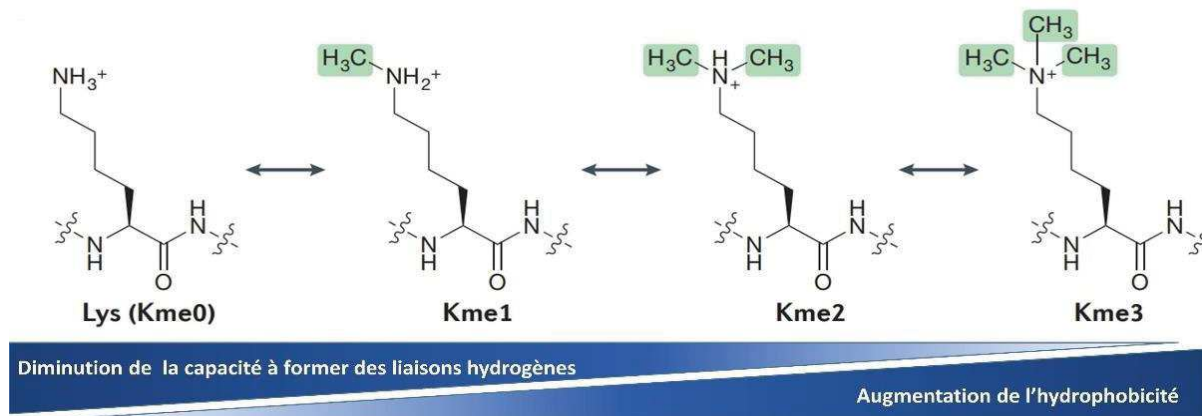


Figure 5: Influence du degré de méthylation d'une lysine sur l'hydrophobicité et leur capacité à former des liaisons hydrogènes [26].

Plus de 5500 protéines humaines correspondant à plus 16000 lysines et arginines méthylées ont été observés par spectrométrie de masse montrant l'importance de cette modification post-traductionnelle [27].

- Les modifications post-traductionnelles complexes

Il s'agit de modifications polymériques c'est-à-dire des monomères (peptides ou glycanes) qui s'assemblent sur eux-mêmes en différentes positions.

- Glycosylation

Ils existent chez homo sapiens deux types de glycosylation principale, la N-glycosylation et la O-glycosylation. La N-glycosylation consiste en l'ajout d'un N-acétyl-glucosamine sur une asparagine incluse dans le motif est N-X-S/T ($X \neq P$). En revanche, la O-glycosylation correspond à l'ajout de glucides sur le groupement hydroxyle des acides aminés suivants : sérine, thréonine et tyrosine. La structure classique des oligosaccharides [28] est représentée sur la figure 6.

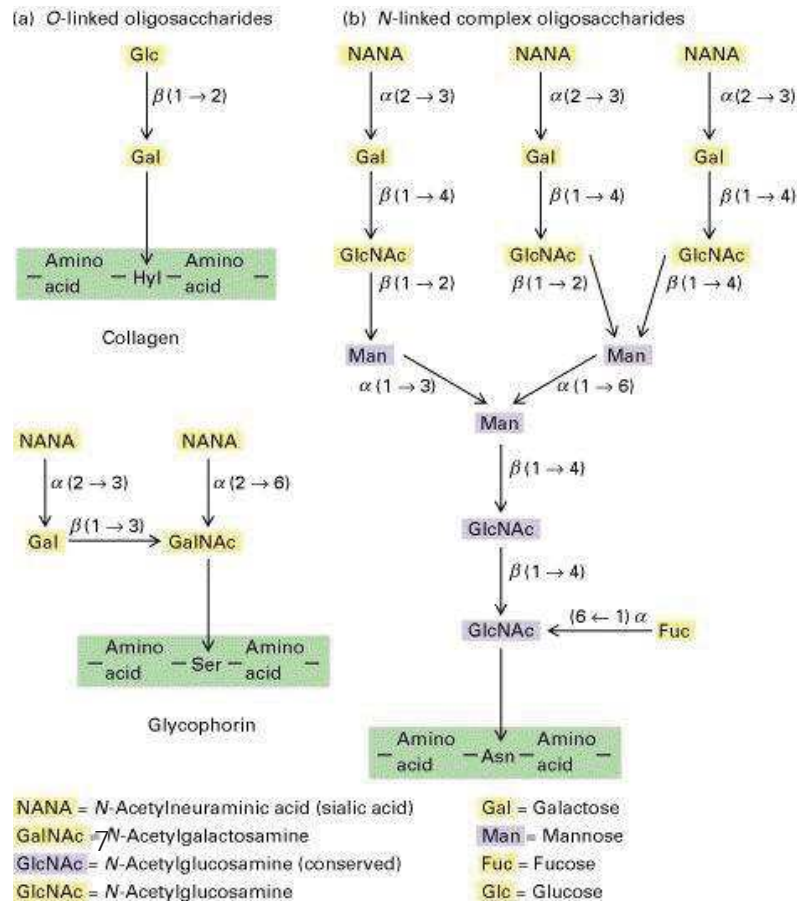


Figure 6: Principaux motifs de glycosylation [28]

La chaîne glucidique est impliquée dans plusieurs mécanismes : interactions protéines-protéines, assure le contrôle qualité du repliement des protéines [29].

- Ubiquitination

L'ubiquitine est une protéine composée de 76 acides aminés (8,5 kDa) localisée dans toutes les cellules humaines. L'ubiquitine est conjuguée aux protéines par l'intermédiaire d'une liaison polypeptidique entre sa glycine terminale et une lysine de la protéine à marquer.

Les protéines peuvent être mono ou polyubiquitinylées. Dans le cas d'une seule protéine d'ubiquitine, cette modification est utilisée par le contrôle cellulaire pour modifier les interactions de la protéine cible avec d'autres protéines. Une ubiquitination plus complexe peut avoir lieu en conjuguant les ubiquitines entre elles en liant une des sept lysines ou la méthionine N-terminale avec la glycine d'une autre ubiquitine. Cette architecture complexe permet d'induire une réponse spécifique de la cellule [30, 31].

- Sumoylation

Très proche de l'ubiquitination, la SUMOylation (small ubiquitin-like modifiers ≈ 12 kDa) est un processus servant principalement à contrôler les interactions de la protéine cible avec d'autres protéines [32]. Elles sont au nombre de 4 : SUMO1, SUMO2, SUMO3 et SUMO4. Les SUMO forment comme l'ubiquitine des liaisons covalentes avec les lysines d'autres protéines et peuvent aussi se lier entre elles pour former des chaînes. La SUMOylation se passe principalement dans le noyau des cellules, en opposition avec l'ubiquitination qui a lieu dans

tous les compartiments de la cellule. La SUMOylation est un processus dynamique [33]. Le motif préférentiel de SUMOylation est [IV]-K-X-E, bien qu'en conditions de stress la SUMOylation devient moins spécifique.

- Les clivages protéiques

La liaison peptidique peut être enzymatiquement clivée irréversiblement, ce qui génère des protéines tronquées ainsi que des peptides issus du clivage. D'après Perez-Silva *et al.* en 2016, le nombre de gènes codant pour les protéases humaines s'élève à 588, soit plus de 2% des gènes, divisés en 5 classes en fonction de leur activité catalytique : Aspartique (21), cystéine (164), métallo (192), sérine (184), et thréonine (27) [34].

2.2.4 Bilan : la diversité moléculaire des protéines (les protéoformes)

La régulation des protéines et les multiples modifications qui en résultent, représentent un ensemble complexe regroupé sous le terme de protéoforme.

Par modélisation mathématique, en ne prenant en compte que les amino-acides modifiables et les modifications post-traductionnelles possibles, le nombre de protéoformes théoriques peut atteindre 10^{27} [16]. Dans le contexte cellulaire, un nombre minime de ces « événements » peuvent co-exister.

Les protéoformes de l'histone H4 ont été largement étudiées. Dans les bases de données, 58 différentes PTMs peuvent être présentes sur cette protéine, sur 17 sites déjà démontrés. Cette combinatoire conduit à plus de 10^{10} protéoformes théoriques [16].

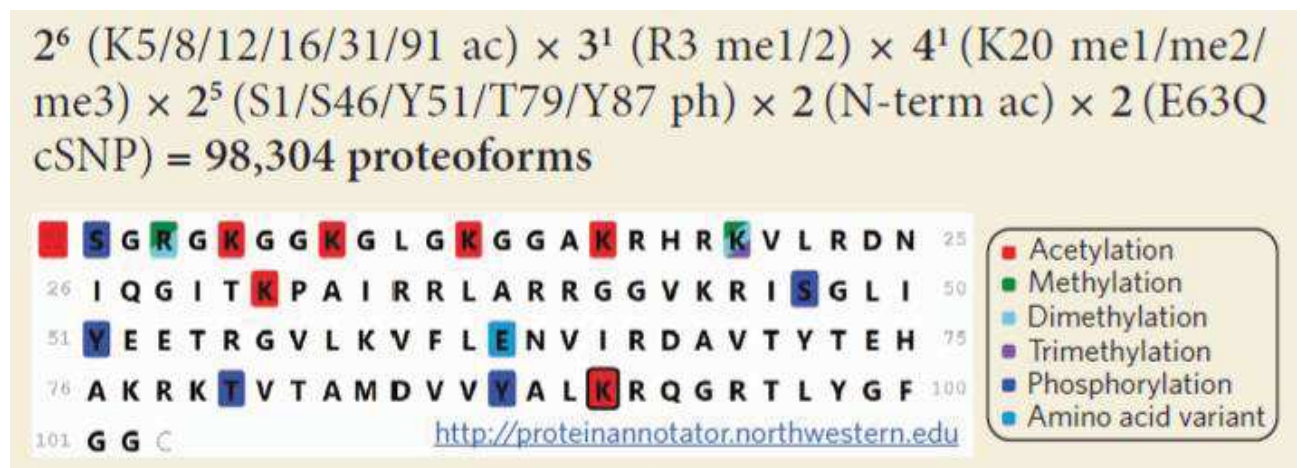


Figure 7: Simulation du nombre théorique de protéoformes possible en ne prenant en compte que les sites les plus abondamment modifiés [16].

En réduisant cette étude aux PTMs et aux 13 sites caractérisés dans la littérature, ainsi qu'au variant E64Q, le nombre de protéoformes calculé est d'environ 100000 (Figure 7). Cette simulation est uniquement basée sur des évidences expérimentales. L'étude la plus complète sur les protéoformes de l'histone H4 a permis d'identifier 75 espèces [9].

L'exemple de l'histone H4 montre les capacités limitées des méthodes d'analyses actuelles. A l'opposé, le calcul théorique du nombre de protéoformes possible donne des résultats sur-évalués par rapport à la réalité biologique.

2.3 La spectrométrie de masse et son utilisation en biologie clinique

2.3.1 Le principe de la spectrométrie de masse

La spectrométrie de masse introduite au début du 20^{ème} siècle par J.J Thomson [35] permet la mesure du rapport masse sur charge (m/z) d'ions en phase gazeuse. Un spectromètre de masse se compose de plusieurs parties, disposées en série, permettant successivement : l'introduction de l'échantillon ; l'évaporation et l'ionisation des molécules dans un élément appelé source (passage des molécules de l'état naturel, en ions à l'état gazeux) ; l'accélération des ions formés ; la séparation de ces ions dans un élément appelé analyseur de masse, en fonction de leur rapport m/z (masse sur charge) ; et la détection, c'est-à-dire l'obtention du spectre de masse.

- L'introduction de l'échantillon

Le spectromètre de masse peut être utilisé seul en mode injection directe ou infusion. Les sources MALDI travaillant sur un échantillon solide opèrent en mode injection directe. Tous les autres systèmes travaillent principalement en couplage ce qui permet de bénéficier des capacités analytiques de la partie amont de la partie MS.

Le spectromètre de masse peut-être couplé à des chromatographies en phase gazeuse pour les molécules vaporisées par effet thermique et entraînées par un gaz neutre ; des chromatographies liquides, ou à de l'électrophorèse capillaire, avec une ionisation directe réalisée en sortie de colonne analytique.

- L'ionisation des molécules dans la source

Il existe de nombreuses sources d'ionisation disponibles en fonction des composés à analyser mais aussi selon les conditions de vide. Sous un vide limité sont disponibles les sources à impact électronique ; à ionisation chimique ; ou à ionisation-désorption par impulsion laser assistée par une matrice (MALDI = matrix assisted laser desorption ionisation). Les sources à pression atmosphérique sont l'ionisation par électronebulisation (ESI = electrospray nebulization) ; ou l'ionisation chimique à pression atmosphérique (APCI).

Aujourd'hui, les deux méthodes d'ionisation les plus répandues en bio-analyse sont le MALDI et l'ESI. Le MALDI est une méthode dite douce, utilisant une plaque métallique recevant un mélange co-cristallisé (molécule matrice + analyte), utilisée pour l'analyse des molécules organiques de masse supérieure à 500 daltons (en dessous de ce seuil, les ions de matrice sont prépondérants). Pour éviter cet écueil, des méthodes de dépôt sans matrice sont en cours de développement [36]. L'ESI est la source de choix pour les analytes introduits après une chromatographie en phase liquide ou après électrophorèse capillaire.

- Le transfert des ions formés

Les ions ainsi générés dans la source, sont transférés dans le spectromètre de masse grâce à des différences de potentiels. Différents filtres (quadripôles, octopôles, ion funnel, filtre à mobilité ionique) sont mis en œuvre pour optimiser la transmission tout en diminuant la contamination par des molécules non-chargées de l'analyseur de masse.

- La séparation des ions dans l'analyseur de masse

Il y a différentes technologies d'analyseurs de masse qui peuvent être classées selon leurs performances analytiques. Les analyseurs basse résolution (LR : Low Resolution) sont les quadripôles ou les trappes à ions présentant des résolutions $\leq 10\,000$ à un m/z de 508 [37]. Les analyseurs haute résolution (HR : High Resolution) sont entre autre de type TOF (TOF = time of flight – temps de vol) ou à transformée de Fourier. Ces analyseurs présentent des largeurs de pic à mi-hauteur (résolution) de $>40\,000$ à un m/z de 1222.

Pour les analyseurs à temps de vol (TOF), l'application d'un champ électrique implique que la distance parcourue par un ion jusqu'au détecteur (temps de vol) dépend du rapport m/z .

Les analyseurs utilisant un champ électrique oscillant sont les analyseurs à filtre quadripolaire et à trappe d'ions. Dans les analyseurs à filtre quadripolaire, la sélection des ions ayant un rapport m/z déterminé, qui peuvent parvenir au détecteur sans être déchargés au contact des barres du quadripôle, se fait grâce à un champ électrique oscillant. Pour les analyseurs à pièges à ions ou à trappe à ions, les champs électriques assurent le confinement dans l'analyseur, des ions de différents rapports m/z ; le spectre est obtenu en expulsant ces ions en fonction du rapport m/z .

Le mode MS permet de déterminer la masse des ions. Sur certain système très précis ou la distribution isotopique est conservée, l'ion peut être identifié seulement avec sa masse. Dans tous les autres cas, une fragmentation est réalisée dans le mode MS/MS. La spectrométrie de masse en tandem (MS/MS) combine en général plusieurs étages de filtration des ions, à l'exception des trappes ioniques où tout se fait dans celle-ci. Les ions formés dans la source entrent dans le premier analyseur MS1, d'où seuls les ions ayant un rapport m/z déterminé pourront sortir. Dans une cellule de collision, ces ions sélectionnés sont dissociés en ions fragments qui seront analysés dans le second analyseur MS2.

- La détection des ions

Le détecteur converti un courant ionique en courant électrique. Le signal est ensuite traité et représenté par son intensité en fonction du rapport m/z . Pour les appareils à transformée de Fourier, c'est l'image du courant formé par la fréquence d'oscillation des ions qui est mesurée et convertie en rapport masse sur charge.

2.3.2 Les systèmes de spectrométrie de masse en biologie clinique

À l'heure actuelle, différents analyseurs de masse sont présents dans les laboratoires hospitaliers (simple quadripôle, triples quadripôles, MALDI-TOF, ...). Cependant les instruments triples quadripolaires sont les outils les plus utilisés pour l'analyse LC-MS dans les laboratoires cliniques. Les progrès de la technologie triple quadripôle permettent de quantifier des dizaines voire des centaines de molécules dans une seule analyse LC-MS/MS.

Une séparation par chromatographie liquide est ajoutée en amont du spectromètre de masse pour séparer les molécules des échantillons complexes tels que le sérum ou le plasma. La quantification précise des protéines à faible concentration (ng/mL) est réalisée en utilisant un couplage LC pour séparer les peptides cibles, avant la mesure par spectrométrie de masse en mode MRM [38]. L'introduction de l'ultra haute performance chromatographie liquide (UHPLC) et l'amélioration des colonnes chromatographiques ont aussi permis d'améliorer les performances des couplages LC-MS.

2.3.3 Les différents modes d'acquisition en biologie clinique.

Les différents modes d'acquisition d'un triple quadripôle sont le balayage du spectre MS complet (Full scan), suivi d'un seul ion (Single Ion Monitoring), et le suivi de transition « ion parent »/ « ion fils » (MRM « Multiple Reaction Monitoring » ou SRM « Selected Reaction Monitoring »).

En mode MRM (Figure 8), uniquement les ions sélectionnés (ions précurseurs ou ions parents) sont transférés à travers le premier quadripôle. Les ions sélectionnés sont fragmentés dans la cellule de collision et certains ions fragments, appelés ions produits ou ions fils, sont transférés à travers le deuxième quadripôle. La transition des ions précurseurs/parents aux ions produits/fils est suivie en mode MRM.

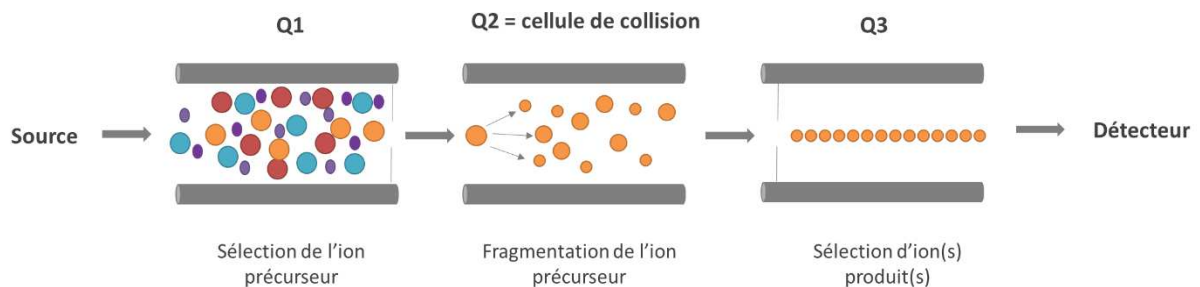


Figure 8: Principe de fonctionnement d'une mesure en mode Multiple Reaction Monitoring (MRM) sur un triple quadripôle (TQ). Les ions générés par la source sont sélectionnés dans le premier quadripôle (Q1), sont fragmentés dans la cellule de collision et les ions fils produits sont sélectionnés dans le troisième quadripôle (Q3). Source : MRM atlas.

Les expériences MRM permettent de suivre en simultané un grand nombre de transitions, donc plusieurs analytes dans une même analyse. Il est ainsi possible d'analyser plusieurs dizaines voire centaines de peptides sur une seule analyse chromatographique [39].

La grande spécificité d'une analyse MRM est liée à l'association du rapport m/z d'un peptide spécifique, du rapport m/z des transitions ainsi que du temps de rétention du peptide. De plus, plusieurs transitions relatives à un peptide et plusieurs peptides par protéines sont analysés, ce qui permet d'accroître encore la spécificité de l'analyse.

Cependant, il existe une limite au nombre de transitions qui peuvent être mesurées simultanément avec une sensibilité, une précision et une reproductibilité élevées. En mode MRM, le spectromètre parcourt de façon répétée une liste de transitions en passant un temps défini sur chaque transition, c'est le "dwell time". Le temps de cycle (« cycle time ») dépend du nombre de transition et du « dwell time » associé à chaque transition [40]. Un compromis entre ces trois paramètres (nombre de transitions, dwell time, et cycle time) doit être trouvé pour maintenir des analyses sensibles et reproductibles. Un temps de cycle trop élevé entraîne une mauvaise description du pic chromatographique (Figure 9).

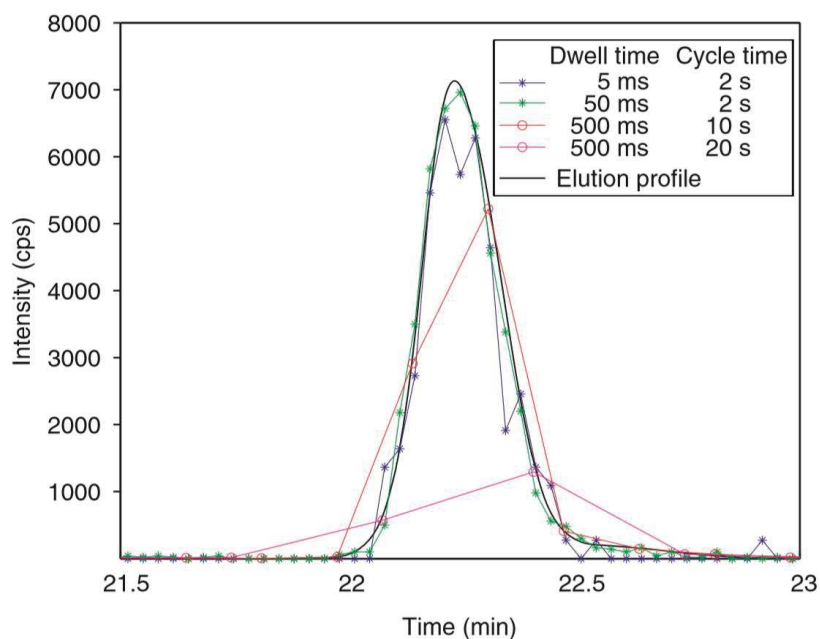


Figure 9: Profil chromatographique d'un peptide analysé avec différents Dwell Time [40].

Afin d'avoir un compromis entre sensibilité et nombre de candidats analysés, Lange *et al.* ont introduit le terme de MRM en mode fenêtre (« dynamic MRM », ou « scheduled MRM », ou « timed SRM »). Ce mode correspond à l'acquisition de transitions uniquement à une fenêtre de temps définie autour de leurs temps d'élution (temps de rétention). Ainsi le "dwell time" dépend du nombre de transitions ciblées dans une fenêtre de temps donné. En joignant plusieurs fenêtres temporelles, correspondant à des temps de rétention différents, le nombre de peptides mesuré sera augmenté sans compromettre la qualité de l'analyse [40, 41].

Une autre approche (« intelligent-MRM » ou « triggered-MRM ») consiste à balayer un nombre limité de transitions (transitions primaires) qui lorsqu'elles dépassent une certaine intensité MS, déclenchent l'acquisition d'autres transitions complémentaires dans un mode MRM classique. Ces transitions secondaires ne sont donc acquises qu'à un temps bien précis dans le but de confirmer l'identité de la molécule.

Le mode MRM en mode fenêtre est temps dépendant et donc exige une bonne résolution chromatographique et des temps de rétention reproductible. Le système LC complet et plus spécifiquement la colonne, peuvent perdre en performances avec des pics qui s'élargissent, ou se décalent dans le temps. L'augmentation des fenêtres de balayage est la première solution adoptée au détriment du cycle time ou du dwell time. Pour maintenir les performances analytiques, des méthodes de surveillance des temps d'élution ont été mise en place. Elles s'appuient sur l'élution de standards internes [42] ou de peptides exogènes spikés [43].

2.3.4 Les avantages et les inconvénients de la spectrométrie de masse en biologie clinique

La spectrométrie de masse est une méthode analytique qui peut être comparée aux immunodosages classiquement utilisés en biologie clinique. Dans cette optique-là, les avantages et les inconvénients vont être énoncés.

Les principaux avantages de la spectrométrie de masse sont :

- Une très **grande spécificité**, surtout en mode MRM, et une grande gamme dynamique qui permet de simplifier la préparation d'échantillon (analyses rapides et moins coûteuses).
- Des analyses qui sont généralement **très sensibles** permettant l'utilisation d'une quantité d'échantillon limitée.
- De grandes **capacités de multiplexage** pour doser plusieurs molécules même avec une faible prise d'essai.
- **Versatilité** : De nombreuses classes de molécules peuvent être analysées en jouant sur le couplage LC-MS et la source en amont du spectromètre de masse. Les nouveaux spectromètres de masse permettent de transférer des ions de très hautes masses avec de nombreuses applications récentes en caractérisation d'anticorps monoclonaux, par exemple.
- Un temps **d'analyse court** (de 5 à 15 minutes).
- Les couplages LC/MS sont des systèmes relativement **automatisés**. Les étapes demandant l'intervention d'un opérateur sont les contrôles systématiques (arrivée des différents gaz, niveau des différentes phases mobiles) et l'ajout d'échantillons dans le passeur. La préparation peut être simplifiée/automatisée en mettant en œuvre l'extraction des analytes en ligne.

Les principales limitations de la spectrométrie de masse sont :

- Le **coût** de l'appareillage : Une fois l'investissement initial amorti, le coût d'utilisation de ces systèmes est relativement limité. La consommation de différents fluides est peu onéreuse. En ce qui concerne les consommables, les colonnes chromatographiques ont un coût non négligeables mais elles sont rapidement amortis sur des milliers d'analyses.
- La **durée totale de l'analyse** (extraction, analyse, traitement informatique des données) reste peu compétitive en termes de débit face aux immuno-dosages (analyse directe sans extraction et totalement automatisée).
- Malgré de grande capacité de multiplexage, toutes les molécules ne peuvent **pas être analysées en simultanée** du fait de leurs propriétés physico-chimiques. Il faut donc avoir recours à des systèmes analytiques différents augmentant ainsi le temps d'opération et le coût.
- Les valeurs de références ont été établies sur des technologies plus anciennes, par exemple de la RIA (Radio-Immuno Assay), et ne correspondent souvent pas aux valeurs trouvées par spectrométrie de masse. L'obtention de valeurs de référence est fastidieuse car cela demande un volume analytique important pour être représentatif de la diversité de la population (sexes, âges, co-pathologies, médicaments, ...). Cependant, les techniques de LC-MS/MS sont aujourd'hui utilisées pour calibrer les valeurs de référence.
- La **formation du personnel** utilisateur est longue et doit être approfondie, et il est souvent préféré que le personnel soit dédié à l'activité de spectrométrie de masse.

2.3.5 Conclusion

La reproductibilité analytique est toujours une forte problématique. Malgré du personnel qualifié et des méthodes validées, les analyses de routine peuvent poser des problèmes de robustesse. Ceci, de mon point de vue, est dû aux différences entre échantillons dû à la

variabilité inter-individuelles, ou de la qualité de l'échantillon (ex : hémolyse).

Des contrôles de qualité sont inclus dans toutes les séries d'analyses pour suivre au plus près les performances et éviter tout biais analytique.

Le débit d'analyse est limité par rapport aux automates cliniques. Même si les temps d'analyses ont été diminués grâce à l'introduction de l'UHPLC, à la sensibilité et aux vitesses de scan accrues des triples quadripôles, les analyses sont toujours de l'ordre de plusieurs minutes par échantillon. Enfin, la préparation d'échantillon reste aujourd'hui réalisée par le personnel qualifié puisque les solutions automatisées ne sont pas encore développées par les constructeurs. Des tentatives d'automatisation viennent d'être commercialisées avec le CLAM de Shimadzu, ou le CASCADION de Thermo Fisher mais restent encore à être éprouvées au contexte clinique

Il reste à relever le défi de la sensibilité en LC-MS. Une préparation d'échantillon plus spécifique est généralement mise en œuvre pour améliorer la sensibilité de l'analyse LC-MS. Cette optimisation ne doit pas se faire au détriment de la reproductibilité et du coût.

Pour conclure, les systèmes LC-MS sont une bonne alternative aux immuno-dosages pour des laboratoires déjà équipés et opérationnels sur cette technologie. La seule option pour imposer le passage à un système LC-MS est de démontrer une plus-value analytique et clinique pour un biomarqueur.

Par exemple, un immuno-dosage peut donner de mauvais résultats dû à un manque de spécificité. La spectrométrie de masse apporte cette spécificité. Dans une autre situation, une question biologique porte plus précisément sur le dosage d'un biomarqueur clivé ou modifié. Dans ce cas là aussi, la spectrométrie de masse sera d'un grand apport.

2.4 La spectrométrie de masse pour identifier les protéines et leurs modifications

2.4.1 Définition des deux grands concepts en analyse protéomique: bottom-up vs top-down

L'analyse des protéines se fait de deux manières principales, soit en analysant les peptides produits par digestion enzymatique des protéines (**Bottom-up**), soit en les analysant les protéines dans leurs formes entières (**Top-down**) [44] (Figure 10). Dans les deux cas, les ions (peptides ou protéines) sont fragmentés dans le but d'identifier leurs séquences en acides aminés. Cette étape de fragmentation confère à la spectrométrie de masse une dimension de spécificité supplémentaire.

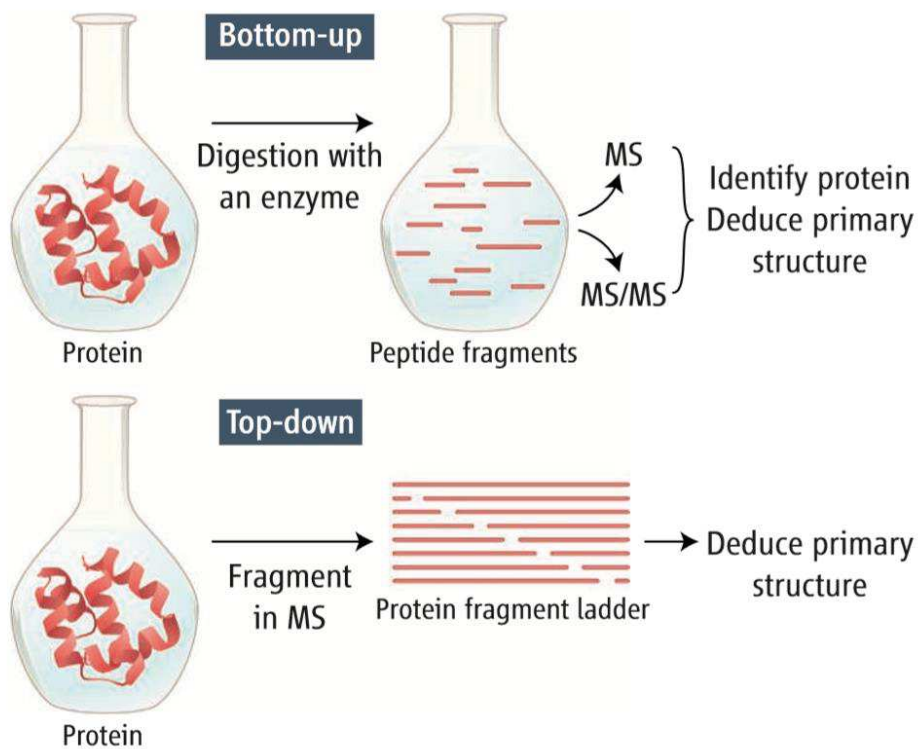


Figure 10: Différentes approches d'identification et de caractérisation des protéines par spectrométrie de masse [44].

2.4.2 L'approche bottom-up

La spectrométrie de masse s'est imposée comme l'approche analytique de référence pour l'identification, la caractérisation et la quantification des protéines dans des milieux biologiques. En effet, les analyses peuvent être réalisées sans *a priori* ce qui est particulièrement important pour la découverte de nouveaux biomarqueurs ainsi que pour l'étude des protéoformes.

L'approche bottom-up est essentiellement basée sur la digestion trypsique. La trypsine est l'enzyme la plus couramment utilisée car elle génère des peptides ayant des propriétés physico-chimiques intéressantes pour l'analyse par spectrométrie de masse. En effet, la trypsine produit des peptides d'environ 5 à 20 acides aminés soit une masse moléculaire moyenne de 1400 Da [45, 46]. De plus, la trypsine est aussi utilisée du fait de sa grande spécificité, sa disponibilité et sa robustesse d'utilisation. En effet, la trypsine est toujours active en présence de solvants organique à 80% [47], urée (1 mol/L) et jusqu'à 60°C. Elle clive avec une grande spécificité en C terminal des lysines (K) et arginines (R) sauf si une proline est l'acide aminé en C terminal : KP ou RP. Si la trypsine possède une grande spécificité, la fréquence de coupure est dépendante de l'acide aminé qui suit K et R: par exemple la fréquence de digestion est plus faible en présence d'un acide glutamique ou aspartique [48] ce qui a pour conséquence un nombre de non-clivages plus important [49].

En protéomique « bottom-up », les spectromètres de masse haute résolution de type orbitrap ou QTOF sont couramment utilisés avec des méthodes d'acquisition DDA (Data Dependant Acquisition). Cette méthode est particulièrement intéressante dans le domaine des biomarqueurs car elle permet l'identification et la quantification relative des protéines qui sont présente dans des matrices biologiques variées (tissus ou biofluides). Kim *et al.* [50], dans l'étude la plus exhaustive, ont couvert plus de 84% des protéines encodées par 17294 gènes à partir de tissus humains et de cellules souches hématopoïétiques. Cette étude a permis la détection de peptides spécifiques d'isoformes pour 2861 protéines montrant la capacité de la spectrométrie de masse à identifier à grande échelle des protéines et à pouvoir détecter certaines de leurs protéoformes.

Une méthode DDA revient à fragmenter (spectre MS/MS) un maximum d'ions parents dans un temps donné, après une première analyse MS1 permettant de connaître les masses des ions, et l'intensité des ions parents potentiels. Deux paramètres sont donc essentiels pour de bons résultats : un temps de cycle rapide pour pouvoir réaliser un maximum de MS/MS, et un taux de succès maximum sur les MS/MS réalisées, sont essentiels pour obtenir de bons résultats d'identification.

Les spectres MS et MS/MS sont ensuite confrontés à des bases de données théoriques et/ou expérimentales *via* un algorithme géré par un logiciel comme Mascot, Proteome Discoverer, ou Protein Prospector, ce qui permet l'identification de la (ou les) protéine(s). Ces logiciels génèrent des spectres MS/MS de peptides théoriques qui seront comparés aux spectres expérimentaux. L'approche, basée sur les peptides, est possible car les fragmentations peptidiques sont bien prédites. Les types d'ions fragments observés dans un spectre MS/MS dépendent de nombreux facteurs comme la séquence primaire, la quantité d'énergie interne, la manière dont l'énergie a été introduite, et l'état de charge. La nomenclature communément acceptée pour les ions fragments a été proposée pour la première fois par Roepstorff et Fohlman [51], et a ensuite été modifiée par Johnson *et al.* [52] (Figure 11).

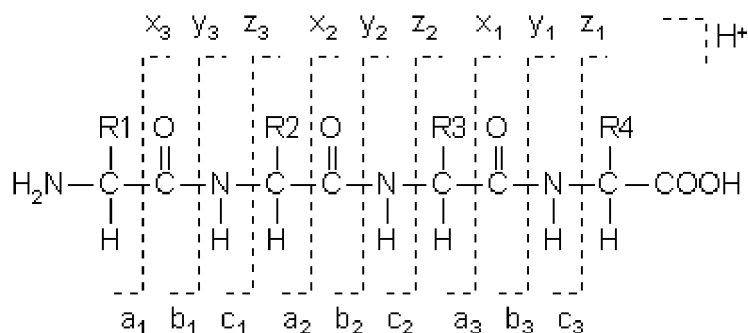


Figure 11: Différentes possibilités de fragmentation d'une chaîne peptidique et leurs nomenclatures.

Seuls les fragments chargés sont détectés en spectrométrie de masse. Si la charge est retenue sur le fragment N-terminal, les ions formés seront des ions a, b ou c. Si la charge est retenue sur le fragment C-terminal, les types d'ions seront x, y ou z. D'autres types d'ions peuvent être formés lors de réactions secondaires mais ils ne seront pas pris en compte lors de la sélection des ions fragments dans une méthode MRM. En fragmentation CID basse énergie comme dans les triples quadripôles, les ions principalement formés sont des ions b et y. Des pertes de NH₃ ou d'H₂O peuvent être aussi observées. En dissociation par transfert d'électrons (ETD ou ECD), des ions c et z sont majoritairement formés.

Un grand nombre de protéines sont identifiées avec des couvertures de séquences généralement faibles par cette approche ce qui limite la description moléculaire des protéines [53, 54]. Des enzymes alternatives produisant des peptides différents [55], et des combinaisons de plusieurs protéases [56], ont été utilisées pour augmenter la couverture de séquence. Les protéases ArgC (coupure en C terminal de l'arginine), AspN (coupure en N terminal de l'acide aspartique), chymotrypsine (coupure en C terminal des acides aminés Tyr, Phe, Trp, Leu, et Met), GluC (coupure en C terminal de l'acide aspartique et glutamique), LysC (coupure en C terminal de la lysine) et LysN (coupure en N terminal de la lysine) sont utilisées.

Nagaraj *et al.* [57] ont démontré l'intérêt de combiner la trypsine, Glu-C et Lys-C pour augmenter le nombre de protéines identifiées et la couverture du protéome de cellules HeLa. 85% des protéines identifiées par la trypsine et la Lys-C sont communes. La Glu-C apporte seulement 5% de protéines identifiées en plus. Mais le principal apport est d'augmenter la couverture de séquence des protéines identifiées et ainsi améliorer leur description.

2.4.3 L'approche top-down

L'approche top-down permet de caractériser les protéines au niveau protéique, et non au niveau peptidique comme les approches bottom-up. Cette approche a encore quelques limitations, ce qui ne permet pas de l'appliquer en routine pour toutes les protéines.

La préparation d'échantillon doit être adaptée à l'analyse des protéines intactes. Pour les analyses non-ciblées, une méthode de séparation des protéines intactes basée sur leurs poids moléculaires appelée, Gel-Eluted liquid Fraction Entrapment Electrophoresis (GeLFREE) a été récemment développée. Les fractions sont collectées et séparées par chromatographie liquide en phase inverse. Cette stratégie a été appliquée par Tran *et al.* en 2011 [58], identifiant plus de 3000 protéoformes qui appartiennent à 1043 protéines et qui proviennent de cellules Hela. D'autres méthodes de fractionnement ont aussi été appliquées avec succès comme par exemple la chromatographie d'exclusion stérique [59], ou des précipitations différentielles [60]. Concernant les méthodes ciblées, l'immunoprécipitation des protéines restent la méthode la plus sensible et de choix pour l'analyse des protéines par top-down car c'est une des méthodes les plus sélectives [61, 62].

La séparation chromatographique doit être adaptée à l'analyse de protéines intactes. Des colonnes C4 ou C8 polymériques permettent des meilleures résolutions mais surtout offrent des durées de vie plus longues (lavages dans des conditions drastiques possibles).

L'instrumentation MS doit offrir une résolution suffisante pour bien déterminer la masse de la protéine. La déconvolution du massif monoisotopique permet de déterminer la masse de la protéine. La déconvolution par les algorithmes sera facilitée par une bonne résolution du massif monoisotopique. Les spectromètres de masse utilisés sont donc ceux ayant les meilleures performances en résolution (les TOF ou les instruments à transformée de Fourier).

Le séquençage MS/MS des protéines est aussi plus délicat qu'au niveau peptidique. La qualité de la fragmentation des protéines est un élément déterminant pour leur caractérisation. Le mode de fragmentation classiquement utilisé pour les peptides est le CID. La fragmentation de type HCD (activation par collision), du fait d'une plus haute énergie de dissociation utilisée, s'est montrée plus informative que la fragmentation CID pour l'alpha-synucléine [63], et pour l'ubiquitine [64]. Afin d'accroître la couverture de séquence des protéines, d'autres modes de fragmentation ont été développés :

- le transfert d'électrons de basses énergies (< 1eV) comme l'ECD et l'ETD. L'ECD correspond à la capture d'un électron de basse énergie par un ion multichargé ce qui conduit à sa fragmentation. En ETD, un électron est transféré vers un ion multichargé par interaction entre cet ion et un anion radicalaire. Ces deux méthodes produisent des fragmentations du squelette peptidique de type N-C α . Ces méthodes ont un rendement de fragmentation assez faible.
- l'absorption d'un photon par la protéine : UVPD (ultraviolet photodissociation) qui utilise un laser ultraviolet à 193 nm. L'UVPD permet d'avoir un nombre plus important de fragments uniformément répartis sur la protéine en comparaison du CID, HCD et ETD comme montré par Cannon *et al.* [65].

Ces modes de fragmentations sont complémentaires du fait des mécanismes de fragmentation différents. En effet, une étude globale sur des cellules HeLa montre que l'UVPD permet une augmentation de la couverture de séquence jusqu'à 74% et du niveau de caractérisation des protéoformes de 9% en comparaison avec l'HCD [66].

Le retraitement des analyses top-down MS est un véritable point critique. Aujourd'hui, de nouveaux algorithmes ou des améliorations d'existants sont en développement et vont de pair avec l'amélioration des performances des spectromètres de masse. Quelques étapes clés sont illustrées en Figure 12 et peuvent être listées ci-dessous:

- calibration des données brutes
- extraction du signal protéique
- déconvolution
- détermination de la masse monoisotopique (dans le cas de données avec résolution monoisotopique) ou de la masse moyenne (dans le cas de données sans résolution monoisotopique)
- association des différents états de charge d'une protéine
- export des données
- comparaisons de profils MS1 pour effectuer une étude quantitative, (ii) ou attribution des ions de fragmentation manuellement ou automatiquement pour identifier les protéines séquencées [60].

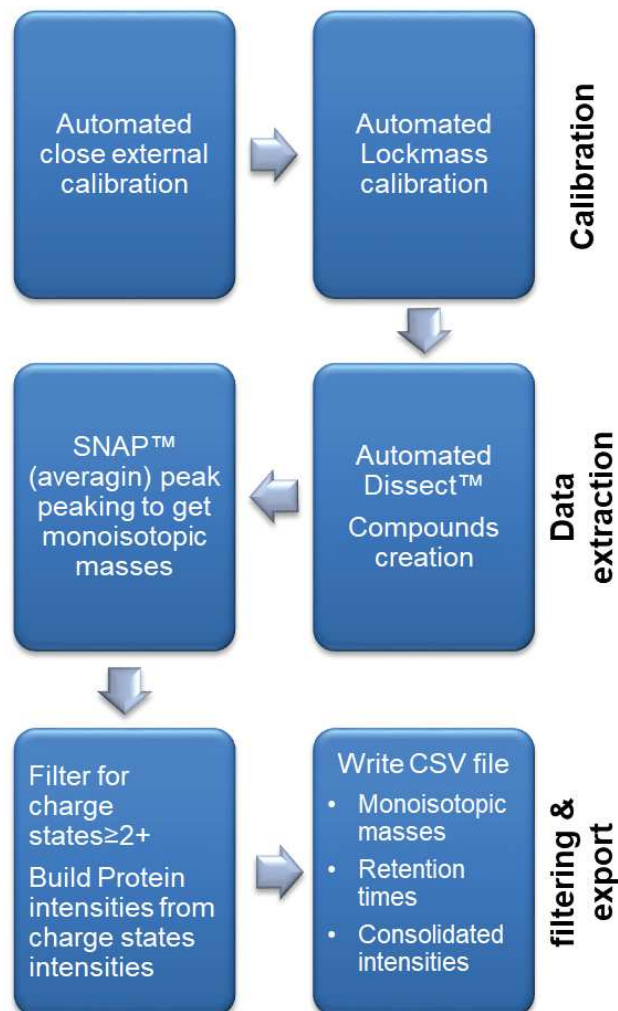


Figure 12: Processus d'exploitation des données par les logiciels Bruker [60]

L'identification des spectres MS/MS des protéines n'est pas aussi établie qu'au niveau peptidique. Schmidt *et al.* [60] ont identifié les spectres MS/MS grâce aux logiciels Byonic et

Biotoools, ou à une approche manuelle. Une multitude d'autres outils sont aussi disponibles (MASH Suite, ProSight, Protter, pTop, TopPIC, Byonic). Toutes ces étapes et leurs paramètres associés doivent être adaptés à chaque étude selon le biomarqueur cible, la qualité de la préparation d'échantillon, la séparation mise en œuvre, le spectromètre de masse, sa calibration au moment de l'étude, mais aussi en fonction de l'intensité du spectre MS/MS.

2.4.4 Comparaison de ces deux types d'approches

L'approche bottom-up est la méthode standard pour identifier et quantifier un protéome à haut débit. La digestion trypsique est très spécifique, efficace et génère des peptides avec les bonnes caractéristiques physico-chimiques pour une analyse LC-MS. Cependant, l'identification basée sur le ou les peptide(s) conduit à une perte d'informations très importantes (Figure 13). Tous les événements affectant la séquence protéique peuvent être manqués s'ils ne sont pas connus (donc absents des bases de données), ou non recherchés par l'opérateur.

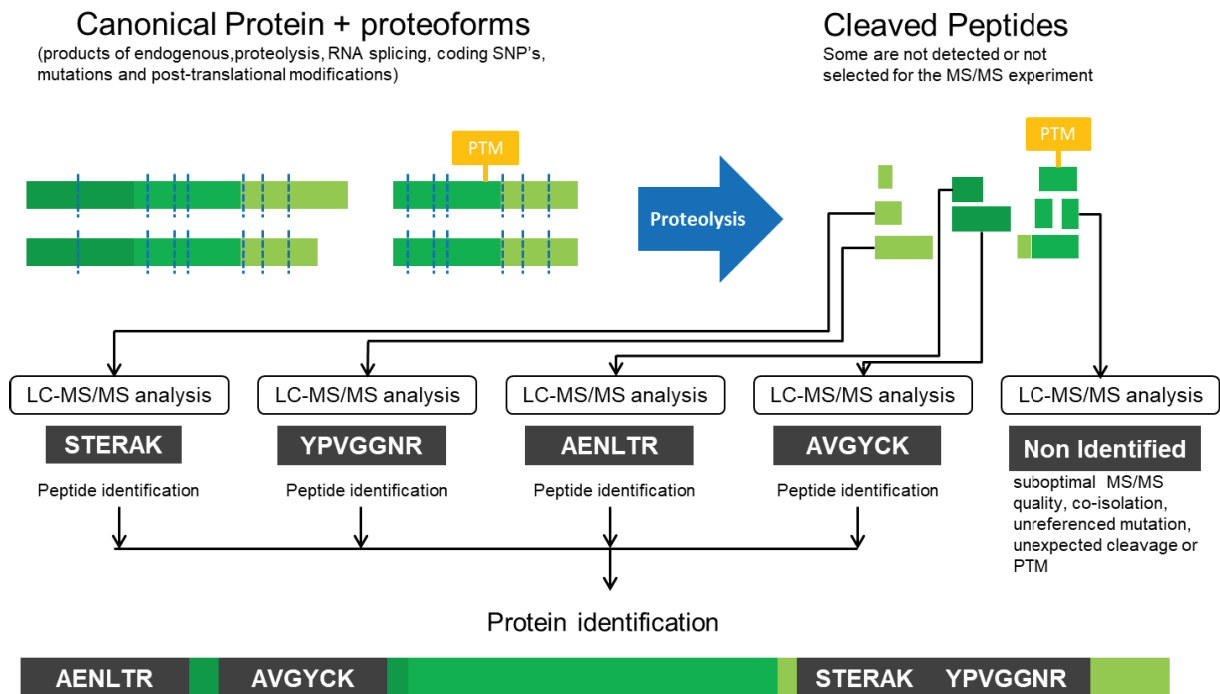


Figure 13: Analyse bottom-up d'un mélange de protéoformes d'une protéine conduisant à une perte d'information après l'étape de digestion des protéines.

Une observation directe de l'entité protéique présente dans l'échantillon est possible par une approche top-down. La caractérisation des différentes protéoformes d'une protéine et donc théoriquement réalisable. Cependant, la gamme de masse des protéoformes analysable est actuellement restreinte [60].

De nombreux défis techniques restent encore à relever concernant la préparation d'échantillon, la séparation chromatographique, les performances MS et MS/MS, et le retraitement des analyses pour atteindre les performances, la robustesse, le débit, et l'automatisation des approches bottom-up.

L'application en biochimie clinique est limitée par tous ces développements encore en cours mais aussi par la nécessité de spectromètre de masse très haute résolution peu répandue dans

les laboratoires à ce jour. Cependant, la quantification des protéoformes est particulièrement intéressante car elle permet d'être au plus près à la réalité biologique. Une application top-down sera développée dans cette thèse au Chapitre 3.

2.5 Les fluides biologiques utilisés en biochimie clinique

Les échantillons biologiques les plus répandus dans les laboratoires d'analyses sont le sang, les urines et les selles. Ces échantillons sont très utilisés en analyses cliniques car ils sont informatifs tout en étant très facile à prélever. Le sang est très majoritairement utilisé en biologie clinique et ce travail de thèse se concentrera sur ce type d'échantillon.

2.5.1 Le sang total, le plasma et le sérum

Le sang total correspond au sang frais obtenu directement après prélèvement biologique. Il est composé d'un liquide biologique, le plasma, ainsi que des cellules sanguines que sont les globules blancs, les globules rouges et les plaquettes. Cette composition rend le stockage et la manipulation du sang total difficile (lyse des cellules, coagulation). Les premières sources de variabilité pour la quantification de biomarqueurs apparaissent dès cette première étape avec le type de tube utilisé pour la collection du sang.

Après centrifugation, le sérum est obtenu ainsi qu'un culot compact composé de fibrines et de cellules sanguines. Le plasma est quant à lui isolé après ajout du sang dans un tube de prélèvement contenant un anticoagulant et après centrifugation.

Pour des raisons pratiques, il est d'usage d'éliminer les cellules sanguines pour obtenir le sérum ou le plasma. Le risque d'hémolyse étant écarté, ces fluides peuvent être stockés à -20°C ou -80°C en attendant d'être analysés. Le temps de traitement avant d'obtenir le plasma/sérum, et les conditions de centrifugation sont des paramètres importants qui peuvent induire des différences dans les résultats [67, 68]. Par conséquent, des procédures sont mises en place pour uniformiser, entre les différents sites de collection, la collecte du plasma ou du sérum [69].

Ces deux milieux biologiques complexes, présentent une large gamme dynamique de concentrations protéiques (Figure 14) [70].

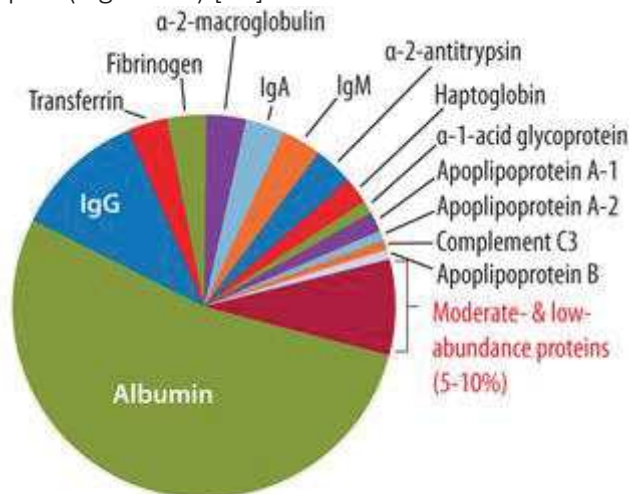


Figure 14: Diagramme représentant la distribution différentielle des protéines majoritaires du plasma [70].

Le plasma peut être obtenu en prélevant le sang dans des tubes contenant des anticoagulants comme l'EDTA (Éthylènediaminetétraacétique), l'héparine ou le citrate de sodium. L'EDTA inactive le calcium nécessaire à la coagulation, ainsi que d'autres ions comme le magnésium, en formant un complexe inactif. Le citrate de sodium inhibe également le calcium avec le même

principe. L'héparine se lie et modifie l'activité de l'antithrombine III, inhibiteur de la sérine protéase, qui inhibe les formes activées du facteur X et de la thrombine. Des travaux de Dupin *et al.* [71] montrent que 82% des protéines sont affectés par le choix de la matrice (entre sérum et plasma EDTA). Une étude similaire comparant du sérum, du plasma EDTA, et du plasma hépariné, indique que 48% des protéines sont affectées par le choix de la matrice [72]. L'« Human Proteome Organization »[73] a choisi le plasma EDTA comme matrice la plus adaptée aux études protéomiques.

2.5.2 Les échantillons sanguins en protéomique clinique

Le plasma a été décrit comme la partie circulante de tous les tissus du corps [74]. Le changement de protéome en cas d'une pathologie est donc théoriquement détectable [75, 76]. Le fluide périphérique qu'est le sang pour les différents tissus et organes, est soumis à de nombreux paramètres que sont entre autres les variations journalières (jour/nuit, avant/après repas, avant/après activité physique), les variations inter-individuelles (état de forme, métabolisme, ...), mais aussi les variations découlant d'une pathologie. Malgré de nombreux travaux déjà réalisés, le protéome plasmatique est encore en cours d'étude. Ceci s'explique principalement par la complexité de cette matrice et par la gamme dynamique de 11 ordres de magnitude entre l'albumine et des cytokines (Figure 15) [74].

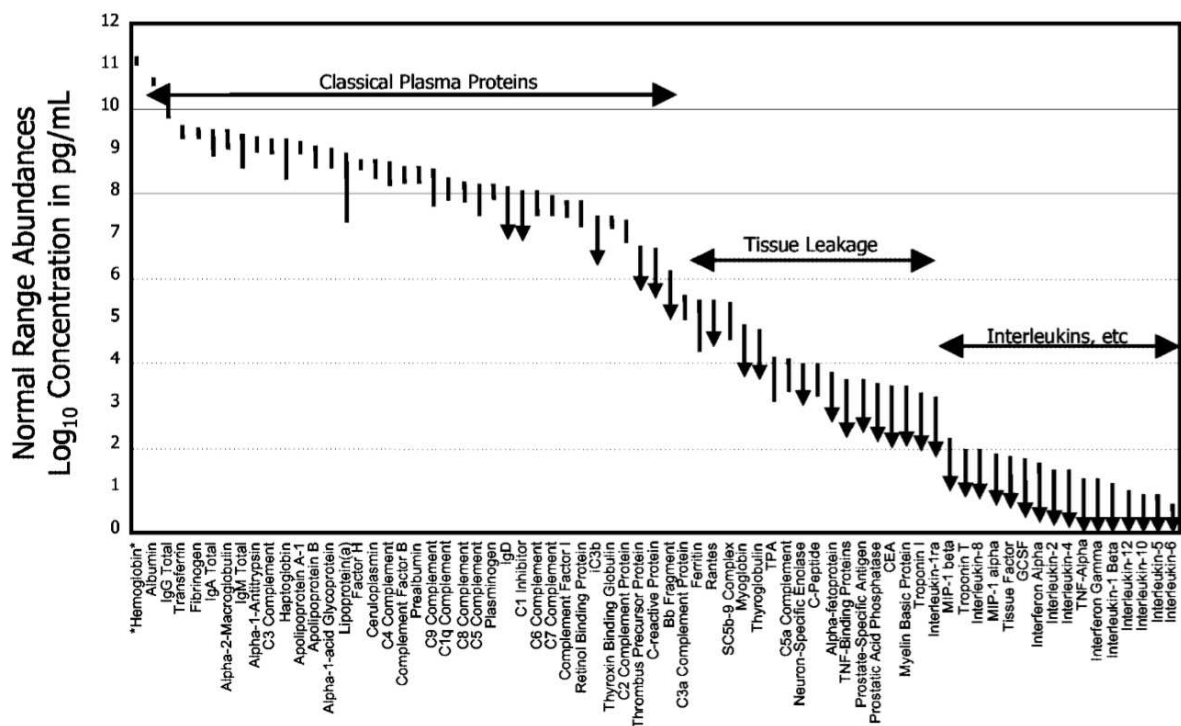


Figure 15: La gamme de concentration de 70 protéines plasmatiques [74].

Des étapes supplémentaires dans les préparations d'échantillons sont donc rajoutées pour accéder à un sous-protéome.

2.5.3 La préparation d'échantillons sanguins en protéomique clinique

La précipitation différentielle des protéines

Pour quantifier les protéines majoritaires du plasma, une simple étape de précipitation peut suffire. En effet, celle-ci permet une diminution de l'effet matrice en enlevant des métabolites, les petites protéines et certains lipides. De plus, une précipitation utilisant un dénaturant comme le méthanol améliore le rendement de digestion des protéines. Ces optimisations ont été rapportées par Ouyang *et al.* [77] qui ont obtenu un gain de sensibilité d'un facteur 15 par simple précipitation des protéines du plasma par le méthanol, suivi par une digestion du culot de protéines, en comparaison à une digestion directe du plasma. Des travaux ont été également réalisés sur des prélèvements salivaires [78, 79]. Les protéines salivaires à partir de 50 µL de prélèvement ont été précipitées à l'éthanol. Le culot a ensuite subi une approche bottom-up et une quantification de protéines par LC-MRM. Grâce à cette stratégie analytique, des protéines présentant des quantités ayant 4-Log d'écart ont pu être quantifiées dans une même analyse. Une approche opposée consiste à précipiter les grosses protéines tout en maintenant en solution les protéines de taille faible à moyenne. Une application sur la protéine Tau d'une masse moléculaire d'environ 40kDa a été publiée [80-82]. La précipitation acide (PCA : PerChloric Acid) a permis d'éliminer 93,6% des protéines de l'échantillon (Figure 16) tout en conservant la protéine Tau qui a pu être dosée avec une bonne sensibilité (150 pg/mL pour le meilleur peptide).

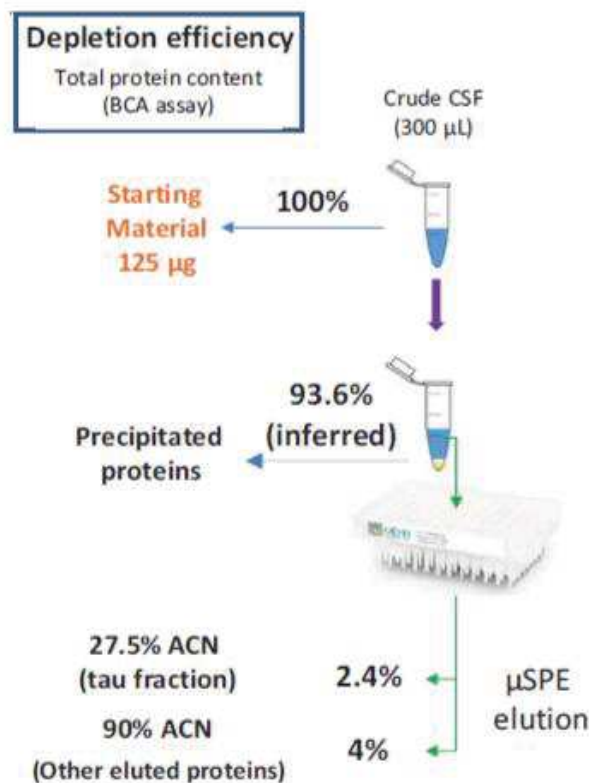


Figure 16: Évaluation de la dépletion des protéines abondantes pour l'analyse de la protéine TAU

Extraction en phase solide et fractionnement chromatographique

L'extraction en phase solide peut être faite, soit au niveau des protéines [81], soit plus couramment, au niveau des peptides [83]. La SPE permet de concentrer l'échantillon et de réduire les effets matrice. Une méthode analytique utilisant cette stratégie a récemment été validée pour un marqueur de narcolepsie, l'orexine A [84]. Cette protéine a été extraite de 500

μL de liquide céphalo-rachidien grâce à une approche SPE qui permet de concentrer l'échantillon tout en éliminant de nombreux interférents grâce à des lavages, et des grosses protéines qui ne seront pas éluées du support. La méthode de référence pour le dosage des peptides amyloïdes fait appel à une préparation à base de SPE (MCX : Mild Cation eXchange) [85, 86]. Cette préparation a remplacé une méthode d'immuno-précipitation [87], qui selon l'anticorps utilisé est indiquée comme plus sensible.

Une autre méthode est le **fractionnement par chromatographie liquide** qui correspond à une chromatographie liquide dite bidimensionnelle (2D). Les caractéristiques pour un fractionnement idéal sont (i) une capacité de pics importante, et (ii) l'orthogonalité du fractionnement avec la séparation analytique des peptides [88]. L'orthogonalité est définie comme la répartition des peptides dans un espace géométrique en 2D. Les modes chromatographiques étudiés (C18 à pH acide (2,6) ; C18 à pH basique (10,0) ; HILIC (Hydrophilic Interaction Liquid Chromatography) ; SEC (Size Exclusion Chromatography) ; SCX) présentent des orthogonalités assez semblables d'environ 54% à part le couplage HILIC/C18 pH 2,6 qui est à 69%. La largeur des pics chromatographiques en SEC est supérieure aux autres colonnes ce qui induit une capacité de pics inférieure.

Keshishian *et al.* [89, 90], ont démontré l'intérêt du fractionnement par SCX. Par déplétion des 12 protéines majoritaires du plasma au lieu des 7 majoritaires, la LOQ est divisée par 2. Par contre, un fractionnement par SCX uniquement sur 6 fractions, permet d'atteindre une sensibilité optimale en diminuant les LOD et LOQ d'un facteur 1000. Ainsi, des biomarqueurs cardiaques ont pu être quantifiés jusqu'au ng/mL selon cette stratégie. En déplaçant les 14 protéines majoritaires et en réalisant un fractionnement sur colonne C18 haut pH/ bas pH plus étendu (96 fractions combinées ensuite en 12 fractions), Shi *et al.* [91] ont atteint des limites de quantification en plasma pour la PSA (Prostate-specific antigen) de 50-100 pg/mL.

La déplétion des protéines majoritaires

La stratégie pour gagner en gamme dynamique dans le plasma consiste à **dépléter les protéines majoritaires**. La principale approche est une déplétion par immuno-affinité avec des anticorps dirigés contre l'albumine ; 6-7 protéines, 12-14 protéines, ou 20 protéines les plus abondantes. Plusieurs kits ou colonnes commerciaux sont disponibles pour cet usage. Les colonnes MARS (Multiple Affinity Removal System, Agilent) sont très répandues. Elles permettent la déplétion de 7 protéines (albumine, IgG, antitrypsine, IgA, transferrine and haptoglobine), ou 14 protéines (albumine, IgG, antitrypsine, IgA, transferrine, haptoglobine, fibrinogène, alpha 2-macroglobuline, alpha1-acid glycoprotéine, IgM, Apo lipoprotéine AI, Apo lipoprotéine AII, complément C3 and transthyretine) les plus abondantes.

La déplétion du sérum par l'albumine permet d'enlever 69% de la quantité totale des protéines du sérum. Ce chiffre est de 80% pour la déplétion de 6 protéines, et de 87% pour la déplétion de 12 ou 20 protéines les plus abondantes [92]. La déplétion du sérum des 14 protéines les plus abondantes permet sur une analyse LC-MS/MS d'augmenter le nombre d'identification de 25%. De plus, les auteurs ont pu détecter la déplétion de 19 protéines non-ciblées. La perte non désirée et inattendue de protéines lors de l'étape de déplétion par de l'absorption non spécifique au support de déplétion, ou par complexation avec des protéines abondantes qui sont déplétées est un des inconvénients majeur de ces approches [93, 94].

Une alternative à l'étape de déplétion est « **l'équalisation** » [95-100]. L'échantillon est mis en

contact de 64.10^6 billes coatées d'une librairie d'hexa-peptides qui vont être rapidement saturées par les protéines les plus abondantes. Une fois les billes saturées, l'échantillon « égalisé » passe à travers et est récupéré. Le taux de protéines retenues est d'environ 96%. Grâce à cela, 20 protéines n'ayant jamais été observées expérimentalement ont pu être validées par analyse de spectrométrie de masse [95].

D'autres techniques existent aussi pour la déplétion d'albumine comme le Cibacron bleu [101, 102] ou le kit AlbuVoid de Biotech Support [103]. Ces méthodes sont moins onéreuses et plus faciles à mettre en œuvre. Cette dernière approche permet une déplétion de 91% de l'albumine. Le taux d'identification sur une approche bottom-up avec déplétion augmente de 42%. Toutefois, dans les fractions contenant l'albumine, 77 autres protéines ont pu être identifiées. Ces approches moins coûteuses ont une spécificité limitée ce qui peut être limitant.

Purification par immuno-affinité

Les méthodes permettant généralement d'atteindre des plus grandes sensibilités sont les méthodes d'immuno-précipitation des protéines. La capture peut se faire au niveau protéique ou au niveau peptidique (technologie SISCAPA : Stable Isotope Standards with Capture by Anti-Peptide Antibodies).

L'immuno-précipitation (IP) ou MSIA (Mass Spectrometric ImmunoAssay) [104] au niveau de la protéine peut être multiplexée, et la capture normalisée en utilisant une version marquée ^{13}C et/ou ^{15}N de la protéine cible [105]. Cette méthode est tout à fait adaptée pour la quantification de protéoformes. En effet, Gao *et al.* [106] ont réalisé une immuno-précipitation multiplexe de 5 protéines, impliquées dans l'inflammation et l'insuffisance rénale, et ont quantifié leurs protéoformes grâce à la spécificité apportée par la spectrométrie de masse.

L'immuno-précipitation peut aussi se faire au niveau du peptide ce qui permet de normaliser l'immuno-capture par l'ajout d'un peptide marqué. La méthode SISCAPA a été introduite par Anderson *et al.* [107] en 2004 pour la quantification de quatre protéines du plasma.

Cette méthode a récemment été appliquée pour l'enrichissement multiplexe de 24 peptides [108], ou plus de 150 peptides pour la quantification de 41 protéines [109]. Ces résultats montrent une capacité de multiplexage plus importante qu'avec une capture faite au niveau de la protéine.

L'inconvénient majeur du SISCAPA par rapport à l'immuno-précipitation réalisée avec une protéine marquée aux isotopes stables est la non-normalisation de la digestion, une des étapes les plus variables [110]. Par exemple, la normalisation par une protéine marquée [111] dans le cas de la quantification de la protéine S100B a permis d'augmenter la justesse d'un facteur 2.

En général, seulement un à deux peptides par protéine sont quantifiés lors d'une approche SISCAPA, ce qui limite son utilisation pour l'étude des protéoformes. Toutefois, l'étude de modifications post-traductionnelles est possible, comme par exemple l'acétylation de la tubuline [112].

Des approches basées sur une analyse MALDI ont aussi été développées sous le nom d'immunoMALDI [113, 114]. Dans cette approche, les peptides immuno-capturés sont élués directement par la matrice. Des approches jumelées SISCAPA et analyse MALDI ont aussi été mises en œuvre [115].

- **L'enrichissement sur Protéine A est un cas particulier de purification par immuno-affinité des immunoglobulines.**

De nombreuses études portant sur le dosage d'anticorps utilisent une purification d'immuno-

affinité basée sur des protéines A ou des protéines G immobilisées [116-120]. La protéine A possède une grande affinité pour la région Fc de la chaîne lourde de toutes les classes d'IgG et plus spécifiquement pour les IgG1, 2 3 et 4. D'autres protéines, comme la protéine L, sont aussi disponibles pour des sélectivités différentes (source Abcam).

Une autre approche consiste en la précipitation des protéines par solvants organiques ou par des sels afin d'éliminer l'albumine dans le surnageant et de conserver les immunoglobulines dans le culot (Figure 17) [77, 121-123].

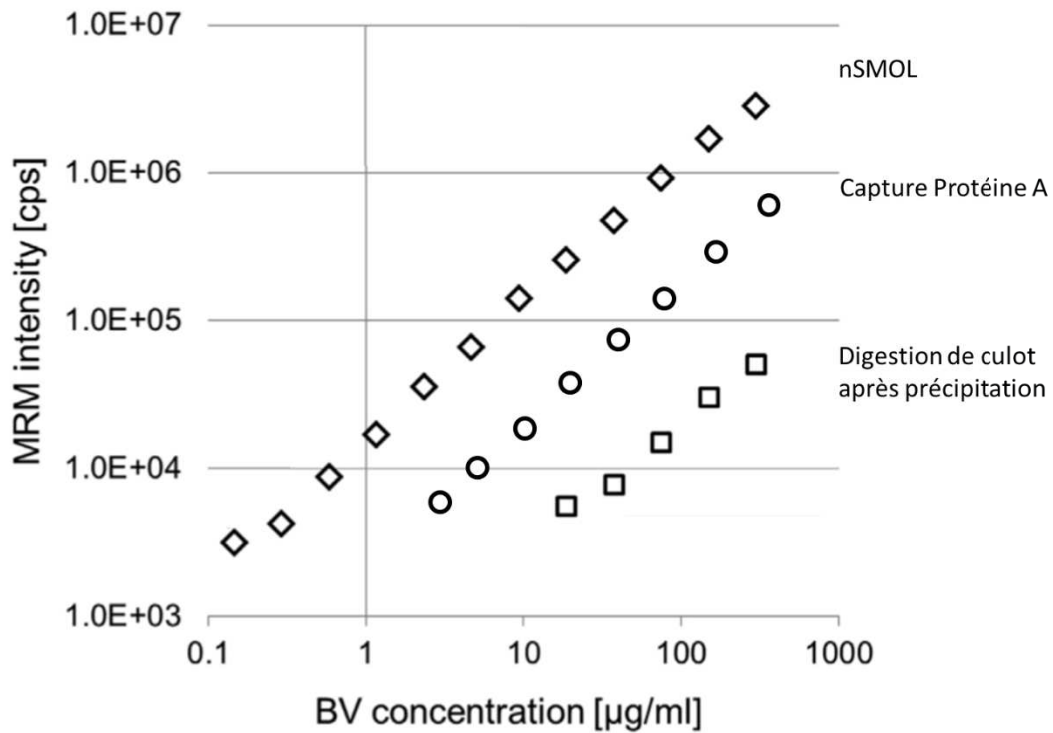


Figure 17: Gammes d'étalonnage du Bevacizumab (BV) obtenues avec 3 préparations d'échantillon différentes [124] modifiée pour ce manuscript. (nSMOL : nano-Surface and Molecular Orientation Limited proteolysis)

Une meilleure sensibilité est obtenue avec une capture protéine A en comparaison des approches basées sur la précipitation des protéines (Figure 17) grâce à une importante décomplexification de l'échantillon (Figure 18).

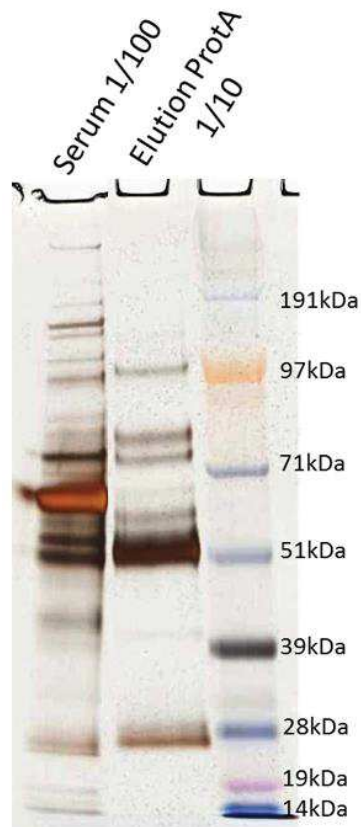


Figure 18: gel 1D SDS-PAGE en condition dénaturante et coloration au bleu de Coomassie. Dépôt de sérum dilué, de sérum après capture protéine A et de marqueurs de taille. Sur la piste après capture protéine A, la bande correspondant à l'albumine (66kDa) a complètement disparu, et les bandes majoritaires correspondant aux chaînes légères (28kDa) et lourdes (51kDa) des anticorps de l'échantillon sont majoritaires.

L'analyse des anticorps par LC-MS/MS est en pleine expansion car de plus en plus d'acteurs de la santé travaillent sur ces molécules et de meilleures performances analytiques ouvrent de nouvelles perspectives. Une application LC-MS/MS sera développée dans le chapitre 4.

2.5.4 Conclusion

L'échantillon sanguin est d'une très grande complexité pour une analyse protéomique car les protéines possèdent une gamme dynamique excessivement large (10^{11}). Des préparations d'échantillons sont nécessaires pour accéder à un sous-protéome qui pourrait être masqué sans ces étapes. Les grandes approches ont été listées dans cette partie (la précipitation différentielle des protéines, l'extraction par SPE et fractionnement chromatographique, la déplétion des protéines abondantes, la purification par immuno-affinité, et l'enrichissement sur Protéine A) mais d'autres méthodologies existent comme le fractionnement des protéines/ peptides selon leurs charges ou leurs points isoélectriques [125-158].

Selon la sensibilité nécessaire, la purification de la cible d'intérêt doit être la plus spécifique possible. Des étapes peu spécifiques (précipitation, SPE) peuvent aussi être combinées pour atteindre des sensibilités satisfaisantes [82].

La précipitation des protéines est peu spécifique mais efficace, simple et peu chère. Ce préfractionnement est très répandu en clinique car une majorité d'approche pour l'analyse des « petites » molécules procèdent par une précipitation des protéines en première intention. De ce fait, des plaques 96 puits de précipitation de protéines, ou même des automates ont été développés pour gagner en reproductibilité et surtout en débit de traitement d'échantillons. Il en est de même pour la SPE.

Le fractionnement chromatographique n'est pas spécifique d'une cible mais il est adaptable en fonction des caractéristiques physico-chimique de la cible et des nombreuses phases (stationnaires et mobiles) disponibles. Par contre, le fractionnement peut être délicat à mettre en place, et peu reproductible dans le temps. Le fractionnement chromatographique est automatisable mais toute flexibilité est alors perdue. Des robots de préparation non couplés peuvent faire le fractionnement [159], mais des solutions en ligne (2D-LC) existent aussi mais cela nécessite d'avoir des appareillages dédiés à une application en particulier.

La déplétion des protéines abondantes est très utilisée car elle permet de gagner en gamme dynamique avec une reproductibilité correcte. Dans une approche de quantification de biomarqueurs, il faut s'assurer qu'il n'y ait pas de pertes de la cible dans les fractions déplétées. Cette vérification est généralement difficile à mener. Le deuxième point limitant est le coût très élevé de ces approches.

La purification par immuno-affinité est « la » préparation d'échantillon à utiliser pour la quantification d'un biomarqueur bien défini. Ces approches sont reproductibles, automatisables, et elles permettent d'atteindre de très bonne sensibilité. Tous ces avantages sont conditionnés par le fait de disposer d'un anticorps performant mais dont le coût reste élevé.

2.6 La quantification de protéines et de leurs modifications par une approche bottom-up

Les approches protéomique bottom-up et top-down sont donc complémentaires et permettent la détection et la quantification des biomarqueurs peptidiques et protéiques. Les approches de quantification par spectrométrie de masse peuvent être classées en deux catégories : la quantification relative et la quantification absolue. Les méthodes de quantification relatives sont principalement utilisées durant la phase de découverte des biomarqueurs alors que les méthodes de quantification absolue plus précises sont utilisées dans les phases ultérieures, c'est-à-dire pour la validation des biomarqueurs. Ces deux approches utilisent le marquage isotopique (**dilution isotopique**) ou aucun marquage (**label free**) pour quantifier les protéines. Les différentes approches de quantification qui vont être abordées sont résumées dans la figure 19.

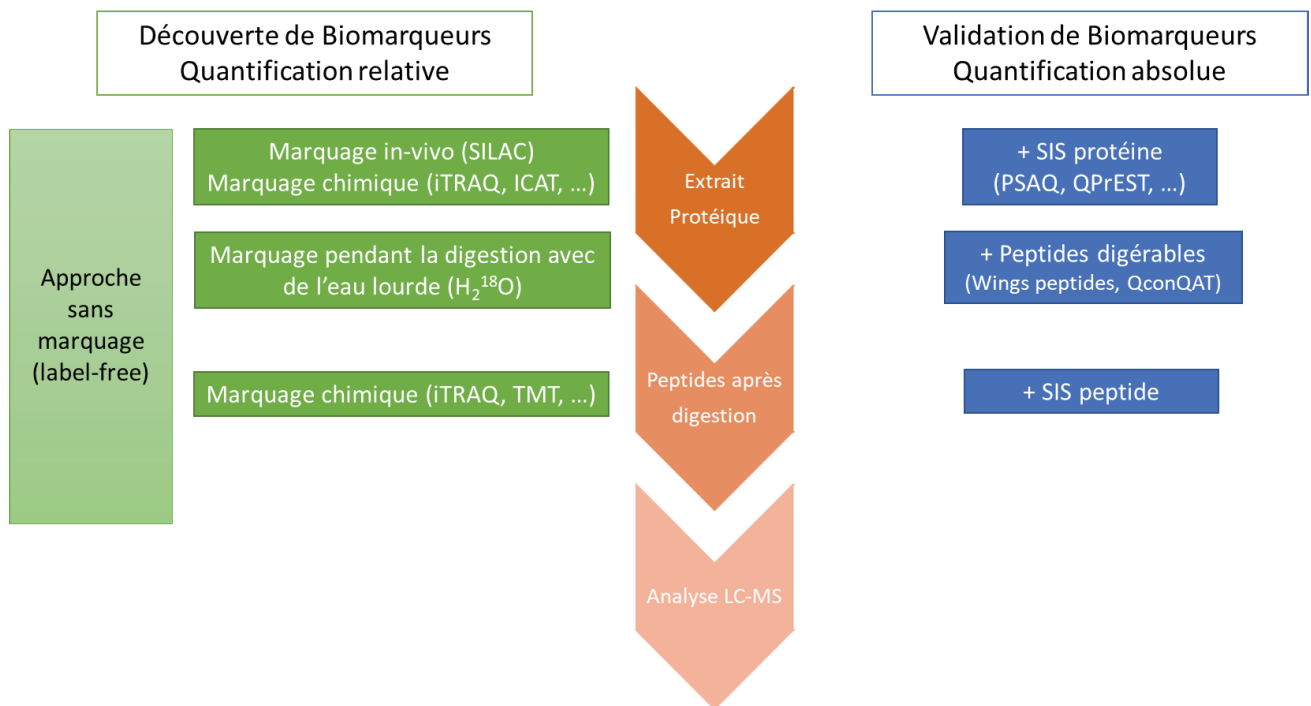


Figure 19: Les principales méthodes de quantification utilisées en spectrométrie de masse

Les méthodes de quantification relatives vont être décrites succinctement. Les méthodes de quantification absolue qui sont les méthodes utilisées en clinique et au cours de cette thèse vont être développées plus en détail.

2.6.1 Méthodes de quantification relatives

Les méthodes d'acquisition pour l'identification de protéines (DDA) ne sont pas adaptées pour des quantifications précises de protéines. Le travail en cycle avec des passages d'un mode d'acquisition à un autre (MS1 et MS/MS) diminue le nombre de point par pic, génère une variabilité importante sur la description des pics et donc diminue les performances analytiques. Pour doser les milliers de protéines identifiées dans une étude protéomique, d'autres méthodologies basées sur l'introduction d'un marquage sont mises en place.

Le marquage peut être introduit au niveau métabolique, ou par des réactions chimiques ou enzymatiques. Le **marquage métabolique** n'est pas possible chez les patients. Des études de marquage partiel à la leucine $^{13}\text{C}_6$ sont quand même menées mais leurs buts ne sont pas de quantifier un biomarqueur mais de pouvoir détecter des protéines nouvellement synthétisées [159].

La méthode la plus connue dans le domaine de la protéomique est le SILAC (Stable Isotope Labeling by Amino acids in Cell culture) (Figure 20) [160].

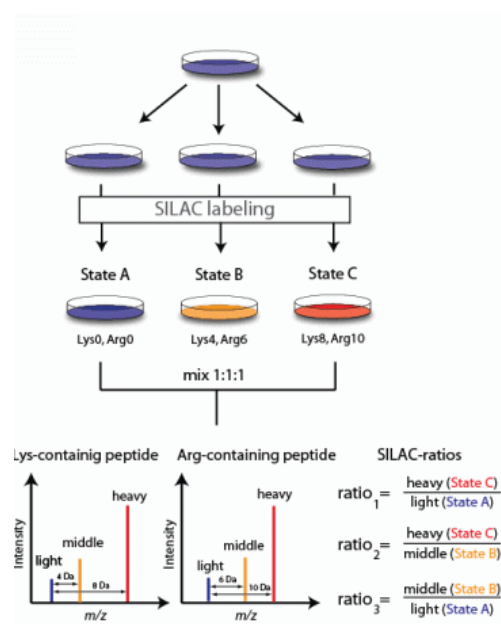


Figure 20: Principe du marquage SILAC [160].

Les cellules « SILAC » se développent dans un milieu de culture privé des acides aminés essentiels. Une version marquée aux isotopes stables (^{13}C ; ^{15}N ; ^2H) de ces derniers est ajoutée dans le milieu de culture. Introduit en 2002 par Ong *et al.* [160], le milieu de culture était dépourvu de leucine. De la leucine deutérée a été incorporée dans le milieu de culture et a permis la quantification relative de protéines impliquées dans la différenciation de cellules musculaires. Une des limites de cette approche est que tous les peptides tryptiques ne contiennent pas une leucine et ne sont donc pas marqués. De plus, le deutérium induit un décalage en temps de rétention [161]. Pour pallier au problème de marquage partiel des peptides par la leucine, les acides aminés les plus couramment utilisés, maintenant, sont la lysine et l'arginine. En effet, dans la majorité des cas, la digestion enzymatique est réalisée avec la trypsine qui laisse l'un de ces deux acides aminés en C-terminal du peptide. D'autres acides aminés ont aussi été employés tels que : sérine, glycine, méthionine, valine, leucine, histidine

et tyrosine [162].

Le **marquage isotopique** par des réactions chimiques ou enzymatiques n'est pas utilisé en clinique. Les méthodologies les plus connues sont l'oxygène ^{18}O [163], l'ICAT pour « Isotope-coded Affinity Taged » [164], le TMT pour « tandem mass tags » [165], ou l'iTRAQ pour « isotope Tags for Relative and Absolute Quantification » [166]. Ces marquages sont réalisables sur des échantillons de patients mais ils demandent une expertise supplémentaire, des protocoles qui gagnent en complexité, un coût élevé, et un retraitement des données délicat. Le principal avantage est que ces méthodologies permettent de comparer un état « A » vs. un état « B ». Elles sont donc pleinement adaptées à la recherche de biomarqueurs mais pas à leur quantification en routine.

Les réactifs ICATs ont été introduits en 1999 par Gygi *et al* [164] et développés pour se lier aux groupements thiols des cystéines présentes sur les peptides (Figure 21).

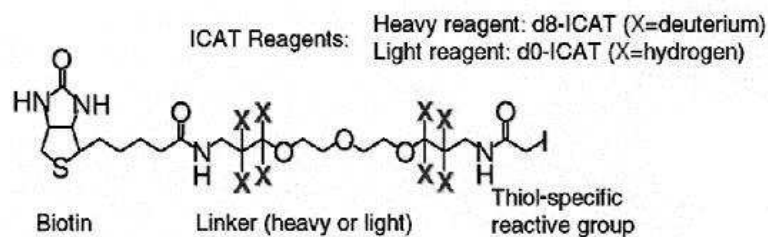


Figure 21: Réactif ICAT utilisé pour le marquage des peptides

Ils sont composés de trois parties : un tag (ou étiquette) d'affinité qui est la biotine, un élément de liaison non marqué ou marqué aux isotopes stables (^{13}C ou ^2H) et un groupement réactif qui réagit avec les thiols libres des cystéines. Après digestion, les peptides sont concentrés sur des colonnes de streptavidine, ce qui permet aussi de réduire par un facteur 10 le nombre de peptides [167]. La quantification relative de cellules saines et malades se fait par comparaison de l'intensité des peptides entre peptides marqués et non marqués. Les désavantages concernant l'ICATs sont premièrement que la biotine interfère dans l'identification des peptides, et deuxièmement l'augmentation d'hydrophobicité des peptides impliquant une élution chromatographique plus difficile et potentiellement des temps de rétention proches. Ce problème a été résolu par Yi *et al.*, en introduisant un élément de liaison clivable par l'acide permettant d'enlever la biotine [168].

Le TMT ou l'iTRAQ sont tous les deux basés sur des tags isobariques et ont été développés par Thompson *et al.* [165] en 2003 pour le TMTs (Tandem Mass Tags) et commercialisé par Thermo Scientific ; et par Ross *et al.* [169] en 2004 pour l'iTRAQ (isobaric Tag for Relative and Absolute Quantitation) et commercialisé par AB Sciex. Les tags isobariques ne sont pas différenciables dans le spectre MS1, ce qui permet de ne pas complexifier le spectre de masse en combinant différents échantillons. Les tags sont uniquement différenciables au niveau de leur spectre MS2 et la fragmentation des tags permet de remonter à l'abondance relative des peptides.

Le tag est constitué de trois parties (Figure 22) :

- Un groupement ester activé avec le N-hydroxysuccinimide (NHS) qui réagit avec les amines libres (N-terminal des peptides et lysines) pour former une liaison covalente. Un marquage non spécifique peut aussi avoir lieu principalement sur les tyrosines et les sérines.
- Un groupement central servant à contrebalancer la masse du groupement rapporteur afin d'avoir des tags isobariques.
- Un groupement rapporteur observable en MS/MS et marqué ^{13}C et/ou ^{15}N pour obtenir un delta de masse d'au moins 1Da [170, 171].

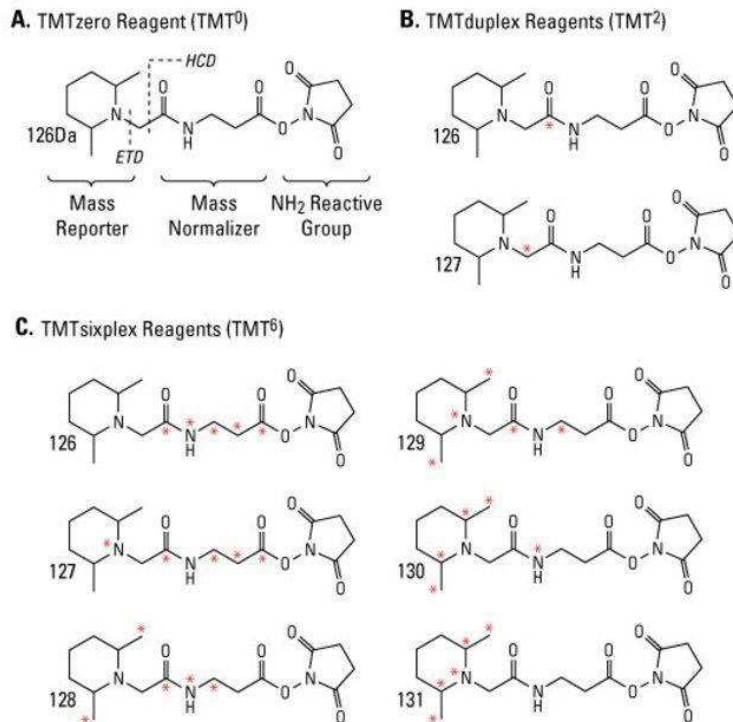


Figure 22: Les réactifs TMT utilisés pour les analyses multiplexes. Les atomes portant un marquage isotopique sont indiqués par un astérisque.

L'iTRAQ et le TMT peuvent être multiplexés jusqu'à 8 et 10 conditions respectivement. Pour le TMT 10-plex, une résolution d'au moins 50000 à 130m/z est nécessaire pour pouvoir séparer et quantifier les ions rapporteurs isotopologues séparés uniquement par 6,32mDa [170, 171]. Le marquage à l'¹⁸O est réalisé sur la partie C-terminale (Figure 23). La réaction est catalysée par les protéases à sérine comme la trypsine, glu-C ou lys-C en présence d'eau H₂¹⁸O. Cette méthode universelle applicable à tout type d'échantillon permet de marquer tous les peptides de manière uniforme et de façon économique. En revanche, seulement deux états peuvent être comparés à la fois et le marquage se fait au niveau des peptides, ce qui ne permet pas de normaliser la digestion.

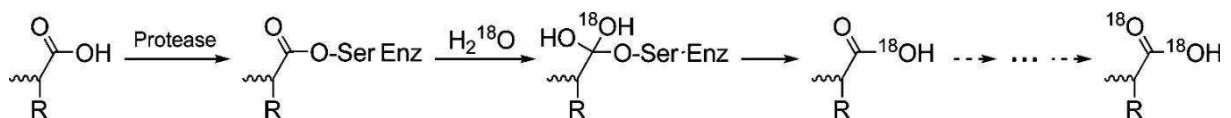


Figure 23: Schéma réactionnel d'insertion de H₂¹⁸O lors de la digestion à la trypsine d'une protéine [163]

Ces méthodologies sont à opposer aux **méthodes de quantifications sans marquage**. Dans ce cas, l'aire obtenue en spectrométrie de masse pour un peptide est comparée entre deux conditions (label-free ion intensity ; ou XIC (Extracted ion chromatogram) [172], ou par comparaison du nombre de spectres MS/MS identifiés dans chacune des deux conditions (label-free spectral counting). Plus récemment, la méthodologie DIA (Data Independent Acquisition) [173] a été introduite. Les méthodes DIA actuelles, comme le SWATH-MS, consistent en un spectre d'ions précurseur unique (MS1), suivi d'une série de spectres d'ions fragments (MS2) avec de grandes fenêtres d'isolation de précurseurs (par exemple 32 fenêtres de 25 m/z) (Figure 24) [174].

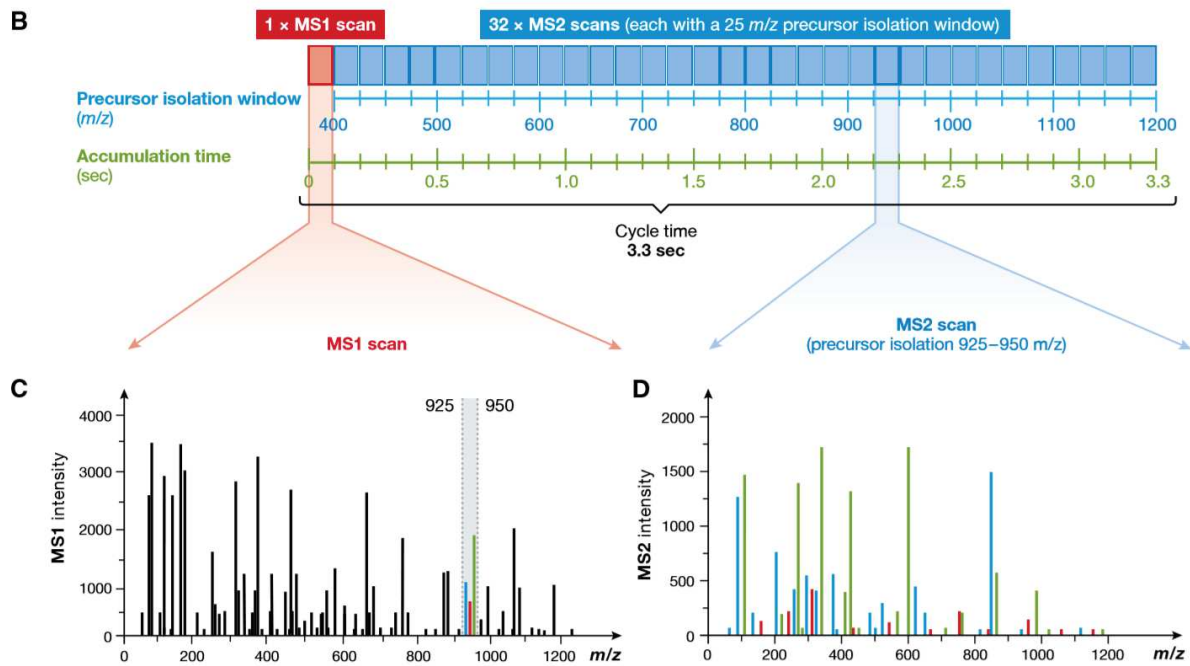


Figure 24: Représentation du mode de balayage DIA. Le schéma d'acquisition de données SWATH-MS pour un spectromètre de masse Q-TOF utilise 32 balayages MS2 avec des incréments définis de 25 m/z, débutant à 400 m/z et se terminant à 1200 m/z. Une analyse MS1 complète est enregistrée au début (C). En appliquant un temps d'acquisition de 100 ms par balayage, on obtient un temps de cycle total d'environ 3,3 s (B) [174]. Dans la figure, le segment 925-950m/z est isolé et fragmenté (D) [175].

Tous les ions rentrant dans cette fenêtre sont fragmentés simultanément créant des spectres MS2 composites. L'identification des peptides se fait à partir d'une librairie de spectres préétablis qui permet d'avoir les fragments et le temps de rétention. Cette méthode a été montrée linéaire sur une gamme dynamique de 4 logarithmes et est plus sensible qu'une quantification en label free MS1 d'un facteur 2 à 10. En revanche, en comparaison avec une méthode ciblée comme le MRM, le mode DIA est pour l'instant moins sensible même si des améliorations expérimentales sont en cours comme le diaPASEF [176].

Les approches « label-free » présentent moins de contraintes sur la préparation d'échantillon car elles ne nécessitent pas d'étapes additionnelles comme pour les méthodes s'appuyant sur du marquage chimique ou enzymatique. Cependant, les contraintes en termes de robustesse sur la préparation d'échantillon, sur le couplage LC-MS, et sur le traitement des données sont plus élevées. La préparation d'échantillon doit être très reproductible pour ne pas avoir des différences d'intensité de peptides. Le système LC-MS doit lui aussi être très stable dans le temps (temps de rétention de la séparation chromatographique, ionisation ESI, précision de masse MS).

2.6.2 Méthodes de quantification absolues

La plupart des méthodes de quantification s'appuient sur le principe de la dilution isotopique introduit dans le domaine de la protéomique en 1999 [164]. Un peptide marqué par des isotopes stables est introduit dans l'échantillon. Il aura des caractéristiques physico-chimiques très similaires au peptide endogène. Leurs temps de rétention seront donc similaires, seul le spectromètre de masse pourra détecter leur delta de m/z . C'est cette méthode qui est utilisée en spectrométrie de masse clinique car la quantité de peptide marqué rajoutée dans l'échantillon est connue et contrôlée par l'expérimentateur (Figure 25).

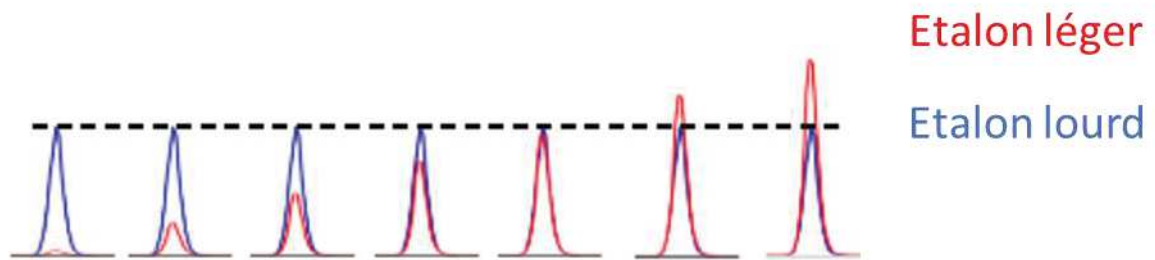


Figure 25: Principe de réalisation d'une gamme d'étalonnage par dilution isotopique

Dans une matrice exempte d'analyte ou matrice « blanche » sont ajoutées des quantités variables d'étalon léger et une quantité fixe d'étalon marqué. Le ratio des concentrations en fonction du ratio d'aires permettra de réaliser la gamme d'étalonnage. Dans un échantillon inconnu, la même quantité d'étalon marqué est rajoutée. Le ratio d'aires obtenu permettra de déterminer la concentration de la molécule dosée grâce à la gamme d'étalonnage réalisée précédemment (Figure 26).

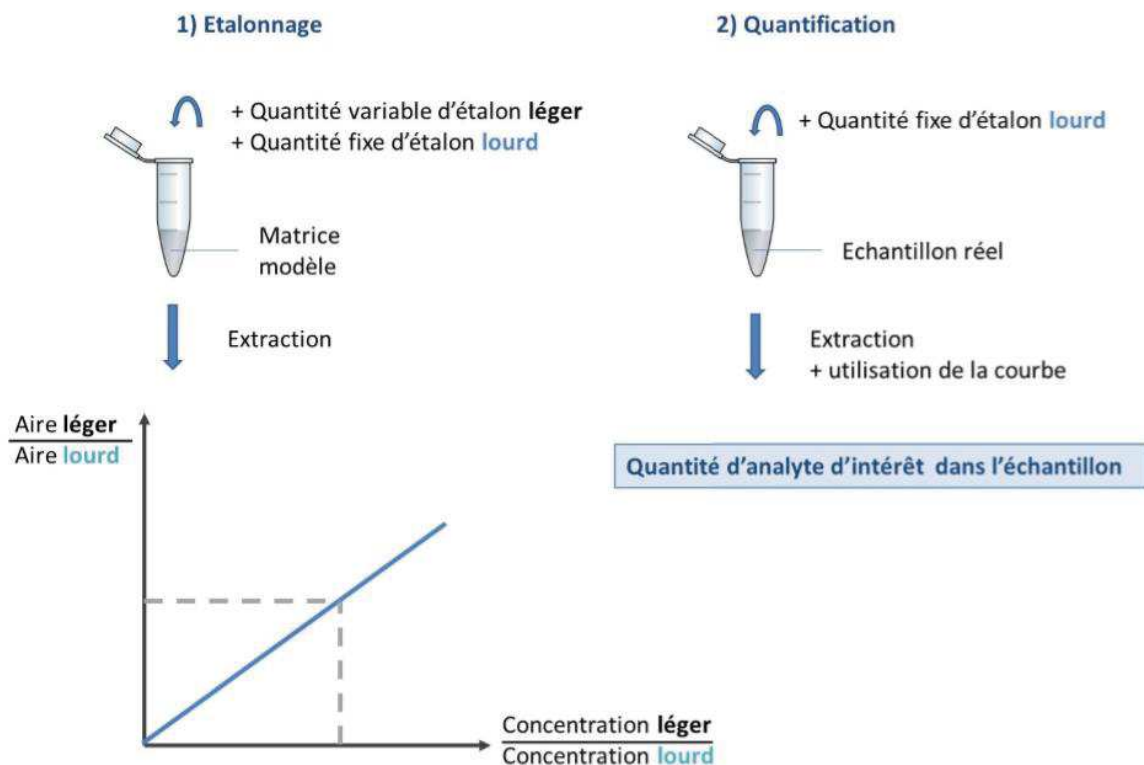


Figure 26: Principe des ajouts d'étalons en gamme et en échantillon

Cet étalon qui doit être bien caractérisé, est utilisé pour générer la gamme d'étalonnage, mais

aussi pour normaliser la préparation d'échantillon dans le but d'avoir une méthode de quantification absolue la plus juste possible. Pour qu'une méthode de quantification absolue soit validée, elle doit être exacte c'est-à-dire juste et fidèle (Figure 27).

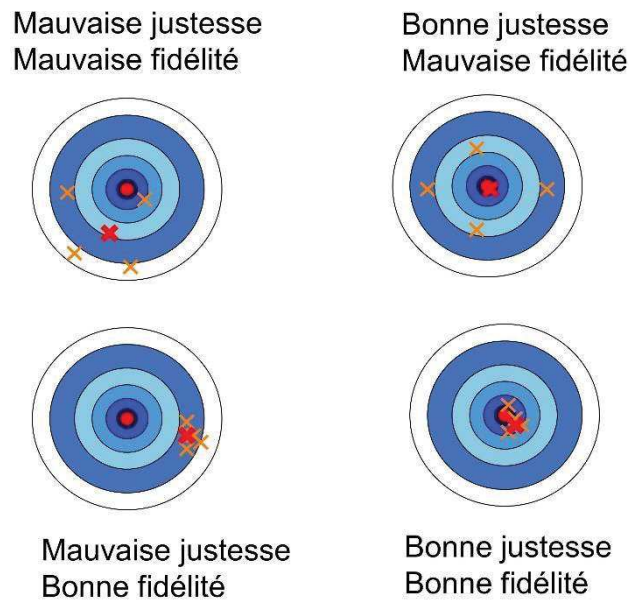


Figure 27: Illustration de la justesse et de la fidélité d'une méthode

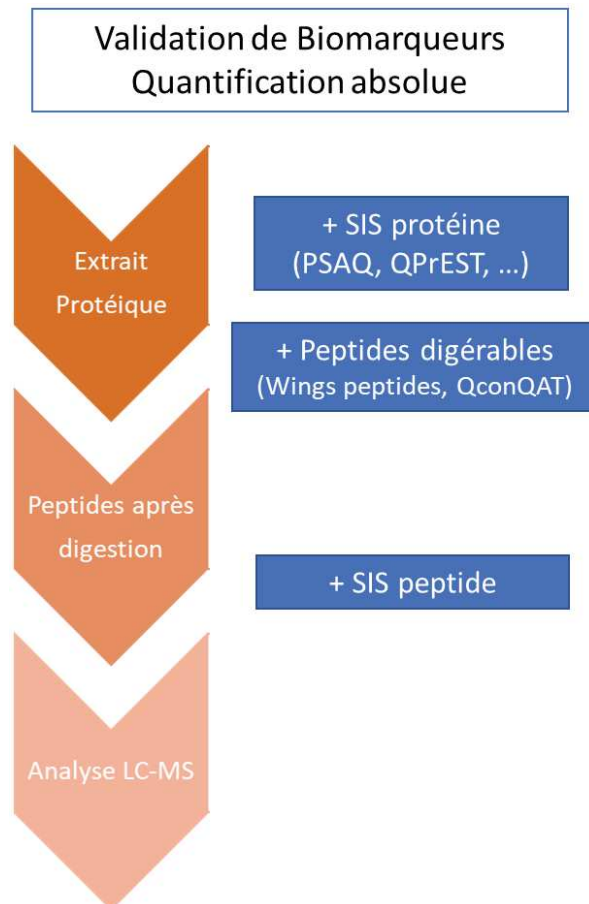


Figure 28: Stratégie de quantification absolue des protéines par bottom-up. Les étapes d'ajouts des étalons internes dépendent de la stratégie utilisée.

Le choix du standard

Les méthodes de quantification absolue par dilution isotopique utilisent un étalon interne lourd qui peut être de plusieurs types (Figure 28) [177] :

- **Etalons protéiques** : Les protéines recombinantes peuvent être utilisées comme standards pour la quantification absolue des protéines endogènes. La protéine étalon est introduite le plus en amont possible pour prendre en compte les variabilités durant les étapes de purification et digestion des protéines. Elle peut aussi être ajoutée dans les échantillons de patients à doser ce qui compense la variabilité inter-individuelle de la composition de la matrice. Cependant, les protéines marquées ne sont que peu disponibles et/ou à un coût très élevé. Plusieurs types de protéines standards sont disponibles : les protéines recombinantes qui sont entièrement marquées ^{15}N , les PSAQ [178] où seulement les arginines et lysines sont marquées ^{15}N et ^{13}C , et les QPrEST [179] où 50 à 150 acides aminés sont identiques avec la protéine à quantifier. Ces 50 à 150 acides aminés comprennent au minimum 2 peptides tryptiques marqués ^{15}N et ^{13}C sur lysine ou arginine. A cela sont ajoutés : une étiquette 6-histidine pour la purification et une étiquette de 120 acides aminés assurant la solubilité de la protéine.
- Etalons peptidiques: **SIS peptides ou peptides AQUA** (Absolute QUAntification). Ce sont généralement des peptides tryptiques marqués ^{15}N et ^{13}C au niveau de la lysine ou arginine en C-terminal. De nombreuses compagnies de synthèse peptidique proposent des synthèses à façon sur des délais de quelques semaines. La pureté des peptides est évaluée par analyse des acides aminés [180]. Des peptides standards modifiés (ex : phosphorylation) peuvent être synthétisés ce qui est très intéressant pour la quantification de protéoformes. Cependant, ce standard ne reflète pas la préparation de la protéine cible car il ne subit pas les étapes des purifications et de digestion.
- **Peptides clivables**: Winged peptide [181], ou extended SIL peptide [182], ou cleavable SIL peptide [183-185]. Ces peptides clivables sont les peptides protéotypiques rallongés en leurs extrémités de quelques amino-acides provenant de leur protéine originelle. Deux sites de clivage similaires à ceux présents sur la protéine cible sont introduits. Ces peptides clivables sont rajoutés avant la digestion. Les performances en termes de justesse et d'exactitude sont meilleures par rapport à un SIS peptide [185]. La concaténation de peptides tryptiques provenant de plusieurs protéines dans une même protéine artificielle est aussi mis en œuvre (QconCAT : Quantification conCATamers) [186-209].

Étude de faisabilité

Quelques grandes étapes pour réaliser cette étude de faisabilité sont représentées sur la Figure 29 et sont listées ci-dessous:

- Définition de la cible protéique/ le biomarqueur à doser et dans quelle matrice
- Sélection du/des peptide(s) à quantifier (peptides protéotypiques).

- Sélection des transitions optimales (les plus sensibles et sans interférences). Les paramètres dépendants de cette transition sont optimisés. Il s'agit des différentes énergies appliquées tout au long du transfert dans le triple quadripôle et surtout de l'énergie de collision.
- Sélection de la préparation d'échantillon la plus adaptée pour obtenir de bonnes performances en quantification absolue. Quel standard utiliser et à quel moment l'introduire ?

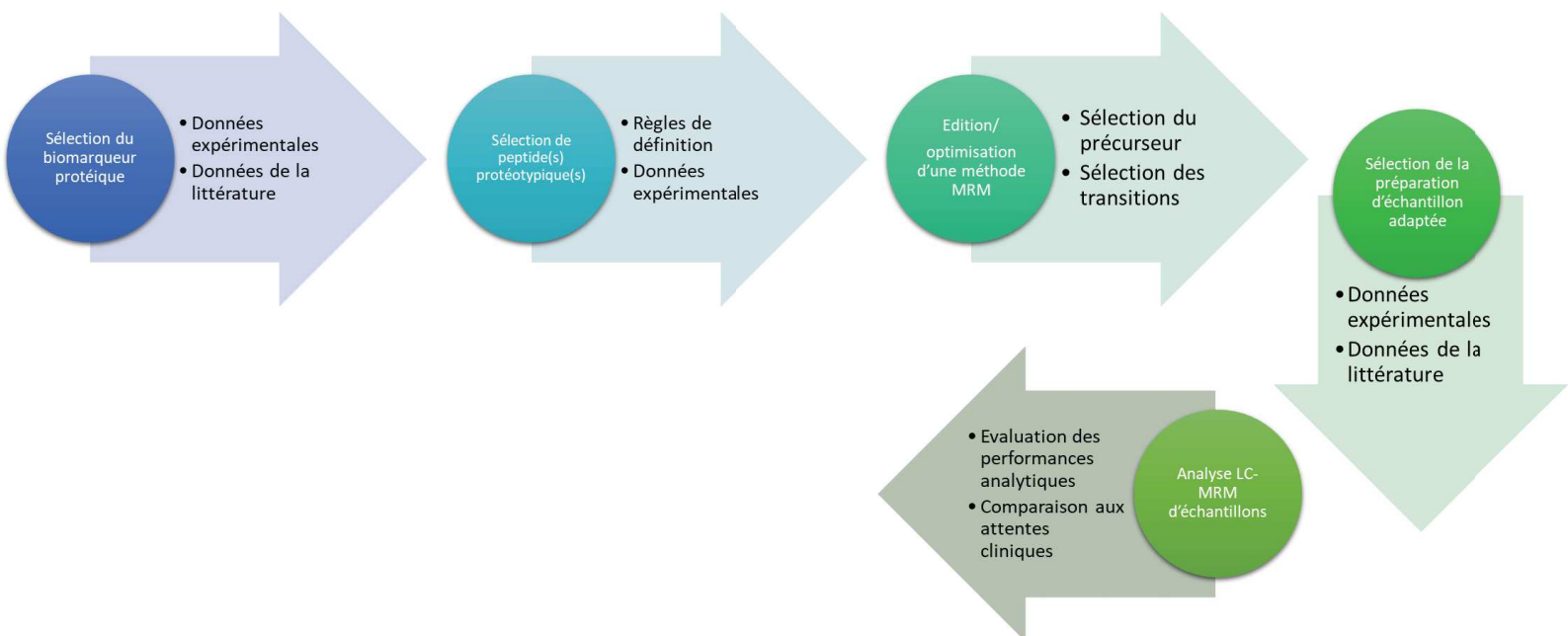


Figure 29: Processus de la sélection d'une cible protéique à l'obtention d'une méthode quantitative de LC-MRM

Définition de la cible protéique

La sélection du biomarqueur est effectuée grâce à des études préliminaires réalisées en amont en interne ou dans d'autres laboratoires.

Définition du peptide prototypique

Les peptides sélectionnés pour la quantification doivent représenter fidèlement la quantité de la protéine. Pour cela, ils doivent être prototypiques, c'est-à-dire répondant à plusieurs critères :

- ✓ Appartenir à une protéine unique

L'appartenance à une protéine unique est basée sur les données génomiques. Ces données ne reflètent pas la complexité au niveau protéique comme nous l'avons vu dans les parties précédentes avec toute la diversité de protéoformes possibles.

- ✓ Ne doivent pas être modifiables

Les peptides ne doivent pas être modifiables artificiellement ou post-traductionnellement pour ne pas introduire des erreurs de quantification. Les modifications artificielles introduites pendant la préparation d'échantillon touchent les méthionines, cystéines et tryptophanes (oxydation), glutamine en N-terminale (formation d'un pyro-glu : cyclisation), l'acide aspartique-

glycine et l'asparagine (déamidation) [210].

- ✓ Doivent être correctement libéré par la trypsine

Les peptides principalement étudiés dans une approche bottom-up sont des peptides tryptiques. Une digestion enzymatique la plus complète et reproductible possible doit être atteinte. Les peptides avec coupure partielle comme par exemple Lys-Lys ou Arg-Arg sont exclus.

- ✓ Ne doivent être ni trop hydrophiles ni trop hydrophobes, ce qui correspond généralement à des peptides d'environ 10 acides aminés [41]. La taille minimale recommandée est de 8 amino-acides [210].

Les peptides issus de la digestion tryptique vont être multiples chargés grâce à la présence de lysine ou d'arginine en position C-terminale. Cette caractéristique va permettre une bonne fragmentation CID et la détection d'ions b et y.

- ✓ Doivent avoir une bonne réponse en spectrométrie de masse

La réponse du peptide cible en spectrométrie de masse est indispensable et va conditionner la sensibilité de l'analyse finale. Entre les peptides « détectables » générés par la digestion d'une protéine, une gamme de réponse d'un facteur 100 peut être observée [211]. La réponse des peptides en spectrométrie de masse doit être vérifiée expérimentalement ou dans les données expérimentales publiques que sont PeptideAtlas, GPMDB, ou Pride.

Un tableau récapitulatif des bonnes pratiques de sélection du peptide protéotypique a été publié par Hoofnagle *et al.* [212] (Tableau 1).

Tableau 1: Guide de sélection d'un peptide pour une analyse LC-MRM

Filtering criterion	Description
Uniqueness (analyte specificity)	Peptides must be unique in sequence to the gene product or proteoform ^a of interest to enable specificity of the assay.
Peptide length	Typically 7-20 amino acids.
Observability by MS	Ideally, peptides should be empirically identified in MS experiments using the instrument on which the method is expected to be developed. Frequency of observation, selectivity, and MS signal intensity can be used to rank order in cases where multiple peptides meet the in silico selection criteria.
Hydropathy	Extremely hydrophobic peptides can be problematic owing to solubility issues, and extremely hydrophilic peptides can be problematic owing to LC retention time instability. As a general rule, it is best to select peptides within an SSRC score range of 10-45 (see http://hs2.proteome.ca/SSRCalc/SSRCalcX.html).
Reactive residues (amino acid residues that may be susceptible to modifications during sample preparation)	Avoid the following residues if possible, listed in decreasing priority (potential posttranslational/preanalytical processing issue): <ul style="list-style-type: none"> • Cysteine (carbamidomethylation, oxidation, cyclization if N-terminal); • Methionine (oxidation); • N-terminal glutamine (pyroglutamic acid formation); • Asparagine or glutamine when followed by glycine (deamidation); • Aspartic acid followed by glycine (dehydration) or proline (peptide chain cleavage); • Tryptophan (oxidation); • Histidine (additional charge states).
Digestion parameters	Tryptic peptides generally have an optimal length for analysis and usually form doubly or triply charged positive ions (depending on the sequence), which provide useful sequence information through MS/MS fragmentation. Peptide sequences containing inhibitory motifs for trypsin that commonly result in missed cleavages (e.g., Lys-Lys and Arg-Arg), may display variable digestion yields, and should be avoided if possible. ^b Avoid ragged ends (i.e., KK, KR, RR, RK) and possible miscleavage sites (i.e., KP and RP).
Modification motifs	Unless the goal is to quantify the posttranslationally modified isoform, peptides near or containing potential posttranslational modification sites [e.g., phosphorylation, N-glycosylation (NXS/T)] should be avoided if possible, since they may affect assay results by altering the recoverability or detection of the analyte peptide.

^a Smith et al. (12).
^b Riviere and Tempst (75).

2.6.3 Conclusions

La protéomique quantitative est composée de différentes approches. La majorité des approches sont utilisées pour la découverte de biomarqueurs par comparaison de deux états (quantification relative). Selon les échantillons, les protéines à doser, les spectromètres de masse, et le coût, différentes méthodes peuvent être mise en œuvre. La quantification relative peut être réalisée « sans marquage » par comparaison d'aires de pics ou de nombre de peptides identifiés. Elle peut aussi être réalisée par des approches « avec marquages ». De nombreuses méthodologies existent selon l'étape du protocole où « l'étiquette » est ajoutée. Après marquage, des comparaisons d'aires de pics sur un même spectre MS ou MS/MS sont utilisés pour obtenir une différence entre deux états.

Dans le cadre d'un laboratoire hospitalier, l'objectif est de doser un biomarqueur connu de façon reproductible et la plus exacte possible. Pour atteindre cet objectif, une stratégie de quantification absolue est mise en place par définition (i) de la cible protéique ou de la protéoforme ciblée, (ii) des peptides protéotypiques, (iii) des peptides les meilleurs répondeurs en spectrométrie de masse. Suite à cela le standard choisi peut être synthétisé et caractérisé pour réaliser une gamme de d'étalonnage.

2.7 La quantification absolue des protéoformes

2.7.1 La quantification absolue des protéoformes par une approche bottom-up

La quantification des protéoformes ne peut se faire en théorie qu'en développant une approche top-down. En effet, l'étape de digestion incluse dans les approches bottom-up induit un risque de perte d'information important : modification d'un peptide ou d'une séquence protéique par exemple. De plus, le traitement de l'échantillon biologique ne doit pas dégrader des modifications post-traductionnelles (par exemple une dé-phosphorylation) ou induire de nouvelles modifications (déamidation ou oxydation).

La caractérisation complète des protéoformes ne sera pas possible par bottom-up [213], mais cette approche a des avantages pour la quantification des modifications post-traductionnelles notamment en termes de sensibilité et de disponibilité des standards disponibles. Par rapport à l'approche de quantification absolue classique, ces approches ne feront pas appel aux peptides protéotypiques. **Le peptide dosé sera celui qui porte l'information de la protéoforme.** Une attention particulière est nécessaire sur la manipulation de ces peptides, et l'interprétation éventuellement erronée des données quantitatives. Par exemple, un peptide contenant une méthionine a de fort risque de s'oxyder pendant la préparation de l'échantillon ce qui induirait une erreur de quantification.

La phosphorylation est une des **modifications post-traductionnelles** intracellulaires les plus fréquentes avec environ 30% des protéines qui sont phosphorylées à un instant donné [214-216]. Bien que ce soit une modification fréquente, les peptides phosphorylés restent minoritaires et difficiles à détecter. Une étape de pré-concentration est généralement employée avec des colonnes IMAC (Immobilized Metal Affinity Chromatography), TiO₂, ou des anticorps anti-phosphorylation Ser, Thr ou Tyr. La quantification absolue par le biais de peptides AQUA permet de déterminer le taux d'occupation des sites de phosphorylation. Cette information est d'un intérêt particulier car une modification de la quantité d'un peptide phosphorylé ne reflète pas nécessairement un changement du taux de phosphorylation mais peut aussi indiquer une variation de quantité de la protéine [217].

D'autres modifications post-traductionnelles faiblement présentes réclament une étape d'enrichissement par immuno-capture. C'est le cas par exemple de l'acétylation de la lysine [218], la quantification de la phosphotyrosine [215] ou encore l'ubiquitination de la lysine [219]. D'autres applications ont été publiées pour la quantification de modifications post-traductionnelles comme l'oxydation des cystéines [220], les prolines hydroxylées [221], la nitration des tyrosines [222], ou même la glycosylation des protéines [169, 223].

L'abondance des **différentes isoformes** d'une protéine peut être aussi quantifiée. Sung *et al.* [224] ont quantifié pour la première fois les isoformes de Serum Amyloïde A (SAA) qui ne sont pas différenciables par immuno-essai (Figure 30).

```
Serum amyloid A 1 (IPI 00552578)
  1 MKLLTGLVFC SLVLGVSSRS FFSFLGEAFD GARDMWRAYS DMREANYIGS
  51 DKYFHARGNY DAAKRGPGG V WAAEAISDAR ENIQRFFGHG AEDSLADQAA
101 DEWGRSGKDP NHFRPAGLPE KY

Serum amyloid A2 (IPI 00006146)
  1 MKLLTGLVFC SLVLSVSSRS FFSFLGEAFD GARDMWRAYS DMREANYIGS
  51 DKYFHARGNY DAAKRGPGGA WAAEVISNAR ENIQRLTRG AEDSLADQAA
101 NKWGRSGRDP NHFRPAGLPE KY
```

Figure 30: Analyse des séquences protéique entre la Serum Amyloid A1 et A2. Les amino-acides spécifiques d'une isoforme sont notés en bleu (pour SAA1) ou en rouge (pour SAA2)

Ces deux isoformes ont été quantifiés par LC-MRM dans le cas du cancer du poumon. L'étude a révélé des concentrations différentes dans le sérum avec la forme SAA-1 qui est dix fois plus présente que la forme SAA-2, et des performances diagnostiques similaires entre ces deux isoformes.

Les **troncations des protéines** sont issues de l'activité des protéases qui génèrent des coupures peu prédictibles. Après identification des sites de coupures, une méthode de quantification absolue de la troncation peut être développée.

Une étude combinant tous ces aspects a été réalisée sur la synucléine. L'alpha synucléine est un biomarqueur des maladies neurodégénératives et en particuliers de la maladie de Parkinson. Des discordances de valeurs de dosages trouvées essentiellement par des méthodes immunologiques sont rapportées dans le LCR (liquide céphalo-rachidien). Oeck *et al.* [225] ont mis en place une méthode MRM pour quantifier l'alpha, la bêta, et la gamma synucléine et les différents modifications associées (phosphorylation, glycosylation, acétylation, variants d'épissage) (Figure 31) par suivi de multiples peptides.

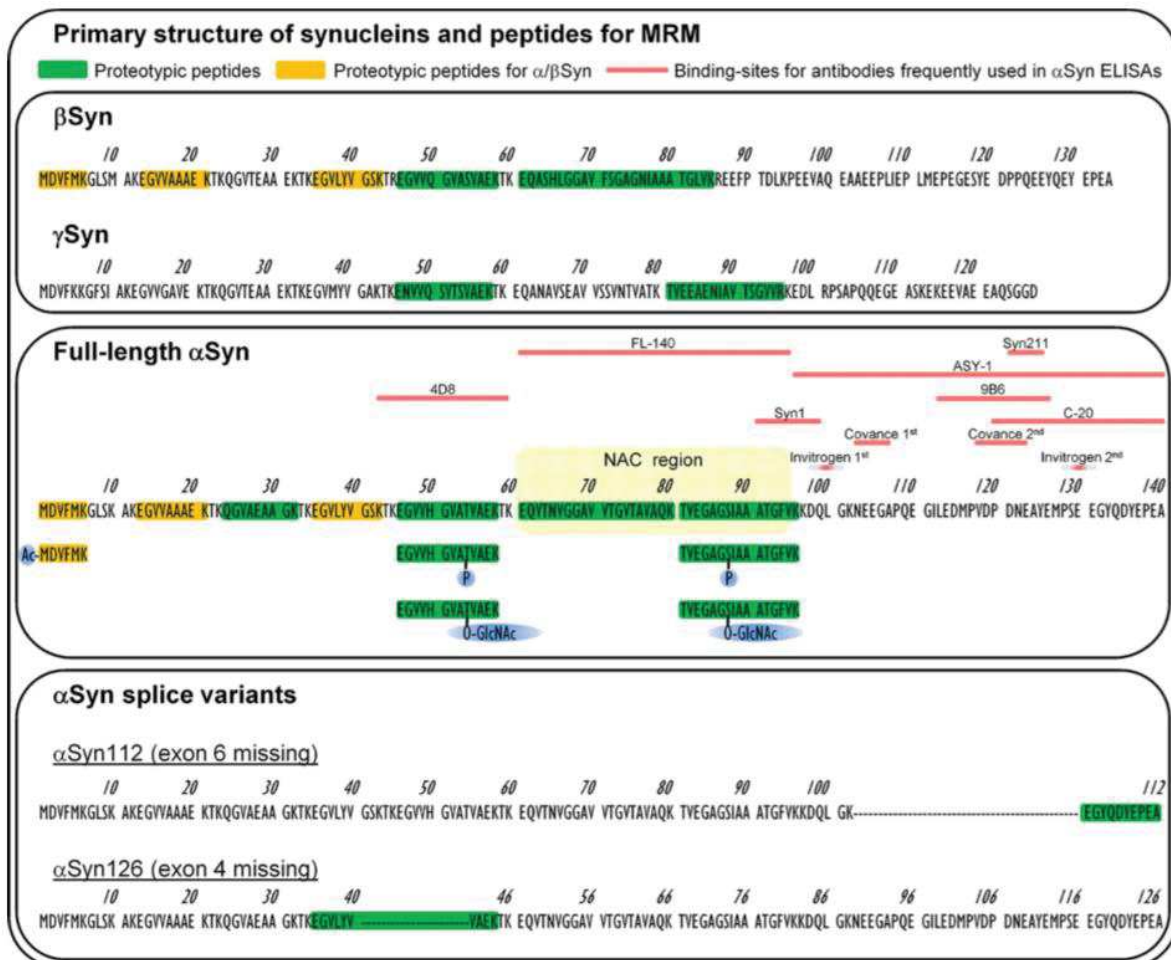


Figure 31: Comparaison des séquences protéiques de l'alpha synucléine et ses variants, et la beta synucléine. En vert sont notés les peptides protéotypiques pour chaque espèce

2.7.2 La quantification absolue des protéoformes par une approche top-down

L'approche bottom-up est la méthodologie de référence mais les protéines et leurs protéoformes peuvent être quantifiées dans leurs formes intactes.

La question du choix du standard est primordiale pour la quantification de protéoformes. Les différentes modifications présentes sur les protéoformes influencent la réponse en électrospray par rapport à la forme de référence. Par exemple, la phosphorylation modifie l'ionisation par électrospray ce qui rend la quantification directe d'un peptide avec son correspondant phosphorylé impossible [226]. Au niveau de la protéine, une monophosphorylation n'affecte pas la réponse électrospray (pour une protéine de 26 kDa) et par conséquent la quantification relative de la phosphorylation d'une protéine est possible. En revanche, pour une protéine multi phosphorylée comme la caséine β qui comprend 5 groupements phosphates, l'ionisation par électrospray est modifiée empêchant toute détermination de la caséine β phosphorylée et non phosphorylée [227].

Kellie *et al.* [62], ont quantifié la proportion des différentes formes tronquées de l'alpha-synucléine (protéine majoritaire) avec une protéine marquée, intacte et non modifiée ^{15}N , dans le cerveau humain. Onze protéoformes (troncations) de l'alpha-synucléine ont été quantifiées grâce à cette approche (Tableau 2).

Tableau 2: Différentes formes d'alpha synucléine détectées par spectrométrie de masse [62].

Alpha-synucléin Form	Theoretical	Observed	Number of	
	Mass (Da)	Delta Mass (ppm)	Matching Fragments	P-Value
71-140*†#	7369.4	0.1	36	1×10^{-42}
68-140*†#	7596.6	1.8	51	2×10^{-64}
66-140#	7752.6	1.0	14	3×10^{-15}
65-140†#	7866.7	1.8	9	3×10^{-11}
Ac 1-101#	10097.4	1.4	44	3×10^{-49}
39-140*#	10593.1	1.1	35	3×10^{-36}
Ac 1-119*	12049.3	2.0	35	2×10^{-39}
Ac 1-122 (deamidation N122)*†	12376.4	3.6	22	6×10^{-25}
Ac 1-135*	13904.0	3.5	20	1×10^{-12}
5-140*#	13959.0	1.6	30	3×10^{-24}
Ac 1-140*†	14493.2	3.9	48	5×10^{-55}

*Form also characterized in SDS-insoluble fraction.

†Site identified additionally by Glu-C digestion data.

#Form previously unreported *in vivo*.

L'immunoprécipitation mise en œuvre pour quantifier ces 11 protéoformes ne semble pas optimale. En effet, l'épitope de l'anticorps monoclonal utilisé est en position 91-99 or l'alpha-synucléine est connue pour avoir de nombreuses troncations autour de l'acide aminé 91 [228]. Les formes découlant de ce clivage ne seront donc pas captées par l'anticorps.

Des approches ciblées peuvent aussi être mise en place. La quantification multiplexe de la protéine C réactive, sérum amyloïde A, la cystatine C et les protéines S100A8/9 a été réalisé par immunoprécipitation suivie d'une analyse MALDI [106]. Dans la littérature scientifique, chaque protéine a déjà plusieurs protéoformes décrites et caractérisées mais cette approche a permis d'identifier 20 protéoformes supplémentaires de ces quatre biomarqueurs. La protéine « sérum amyloïde A » a été détecté sous 11 différentes protéoformes dans 80 plasmas de patients (Figure 32).

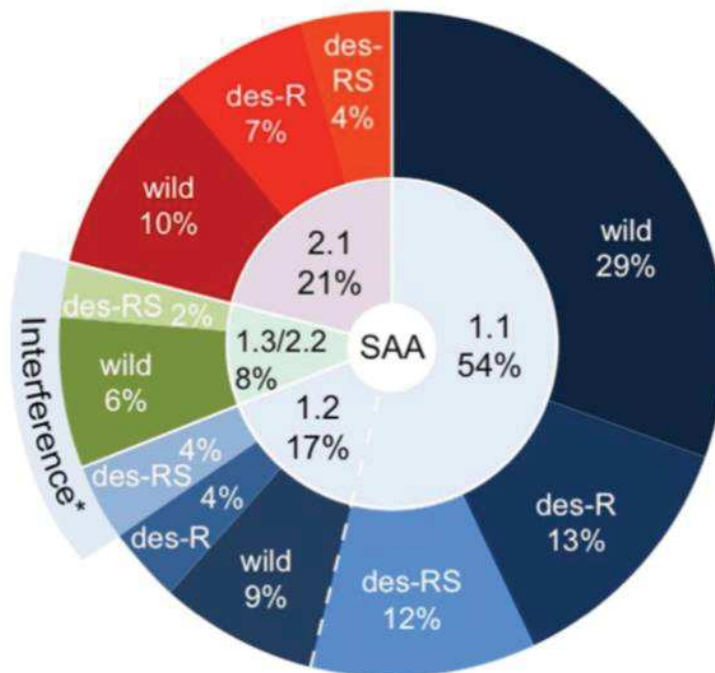


Figure 32: Représentation des protéformes de la protéine Sérum Amyloïde A. Deux isoformes (SAA 1 et) et différents variants sont détectés (SAA 1.1, 1.2, 1.3, 2.1, 2.2). Ces différentes formes sont identifiées en forme intacte (wild), avec une troncation du premier aminoacide (des-R), ou des deux premiers (des-RS) [106].

La variabilité de proportion des protéformes de SAA1 sur les 80 patients a été mesurée (Figure 33).

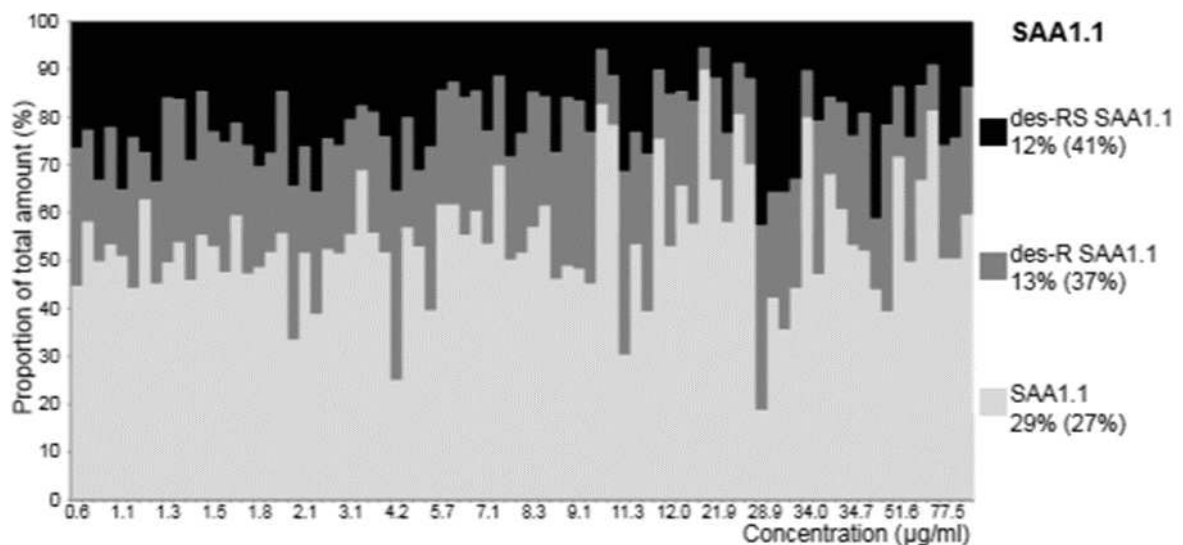


Figure 33: Variabilité des différentes protéformes de SAA1.1 sur 80 patients dosés. Les portions relatives ont été tracées pour tous les échantillons et triées par ordre de concentrations mesurées [106].

Les protéformes de SAA1 sont assez variables sur les 80 patients par rapport aux protéformes des autres protéines avec des CVs entre 27 et 41%.

Une autre étude a été réalisée sur les protéoformes de l'apolipoprotéine A-1 lors de la régulation du cholestérol dans le contexte du risque de cardiopathie coronarienne [229].

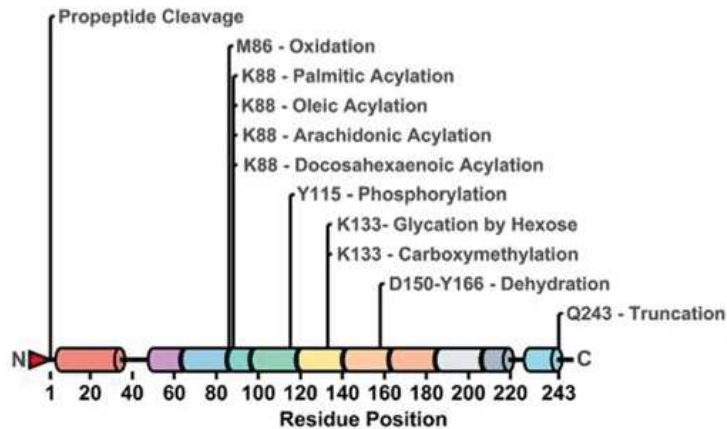


Figure 34: Sites de modifications post-traductionnelles identifiées et positionnées sur la séquence de l'Apo A1 [229].

Dix-huit protéoformes ont pu être identifiées chez 420 patients. La forme canonique est très largement la forme majoritaire par rapport à toutes les autres modifications (> 70%). Parmi les 18 protéoformes quantifiées, 6 sont régulées dans les cas d'une capacité élevée ou basse d'efflux du cholestérol (forme canonique, carboxymethylation, palmitique+truncation, plamitique, oléique, arachidonique) (Figure 34).

Ces études démontrent qu'une approche de quantification absolue sur des protéines entières est réalisable sur des échantillons de patients. L'apport d'information est très conséquent comme la co-localisation de PTMs sur une séquence protéique, ou la proportion relative de protéoformes dans un échantillon. L'analyse de protéines entières est toujours un challenge malgré des progrès sur les performances analytiques des appareillages. L'immunocapture est généralement utilisée en amont pour pouvoir atteindre les sensibilités nécessaires. Cette étape souvent incontournable, doit être bien caractérisée pour s'assurer que l'anticorps ait le même rendement de capture pour toutes les protéoformes [62]. De plus, l'accès aux standards, les protéoformes marquées, est très limité. Un ensemble de protéoformes va être généralement quantifié grâce à l'espèce canonique, non modifiée, et l'hypothèse sera faite que les autres espèces ont la même réponse en spectrométrie de masse.

Toutes ses limitations sont un frein au développement de ces approches en biochimie clinique.

2.8 Les sources de variabilité dans une approche bottom-up pouvant induire des échecs dans la validation de méthode

2.8.1 La préparation d'échantillon

La préparation d'échantillon doit offrir un haut rendement de récupération de la cible, tout en éliminant un maximum d'interférences et en étant reproductible. Dans les approches bottom-up, le mode opératoire est complexe étant donné ses nombreuses étapes.

Une étude multi-site sur le dosage de protéines sériques par LC-MRM permet d'appréhender les différentes sources de variabilité liées à ce type d'approche [230].

Les CVs inter-laboratoires de peptides additionnés dans un mélange de plasma digéré sont compris entre 4,3 et 14,1% pour une concentration de 2,92 fmol/uL.

Dans une deuxième étape, les peptides précédemment additionnés sont remplacés par les protéines équivalentes. Cela rajoute les étapes de réduction, alkylation, digestion des protéines cibles, et de dessalage des peptides tryptiques ; opérations qui sont centralisées avant envoi des échantillons aux différents laboratoires. Dans cette étape, les CVs inter-laboratoires sont entre 3,8 et 30 % pour les différents peptides à une concentration de 2,92 fmol/uL. Ces résultats démontrent un faible impact de la préparation d'échantillon sur les performances LC-MRM des différents laboratoires.

Enfin, ces mêmes protéines sont introduites directement dans le mélange de plasma, et ce mélange est préparé et analysé sur chaque site. Dans cette étape, les CVs inter-laboratoires augmentent grandement de 10,3 à 50 % pour les différents peptides à une concentration de 2,92 fmol/uL. Malgré une procédure de préparation d'échantillon fournie, il existe des différences significatives de préparation d'échantillon sur chaque site.

Ces mêmes étapes ont été comparées en fonction du biais obtenu. Nous prenons l'exemple ici du peptide ESDTSYVSLK de la C-reactive protéine. Au cours de la préparation d'échantillon le biais est de +40,5%, -39,6% et 51,1% pour les étapes 1 à 3 respectivement. La digestion des protéines cibles introduit un biais négatif. Ceci peut indiquer des pertes pendant les étapes de préparation (réduction, alkylation, digestion des protéines, dessalage des peptides), ou des problèmes de digestion de la protéine.

Cette étude détaillée montre un gros impact de la préparation d'échantillon protéique sur les résultats de quantification (CV et biais) obtenus par LC-MRM.

2.8.2 L'analyse LC-MS

Malgré une sélection minutieuse des peptides protéotypiques, des problèmes peuvent encore affecter les résultats au moment du passage à l'échantillon biologique lors de confrontation avec la gamme de concentration clinique.

Le système LC complet et plus spécifiquement la colonne, peuvent perdre en performances analytiques (diminution de la résolution, décalage des temps de rétention) ce qui est notamment problématique en scheduled MRM. Le capillaire métallique d'introduction de la source ESI peut aussi subir des dégradations dans le temps qui sont principalement des bouchages partiels conduisant à une instabilité du spray (Figure 35) [230].

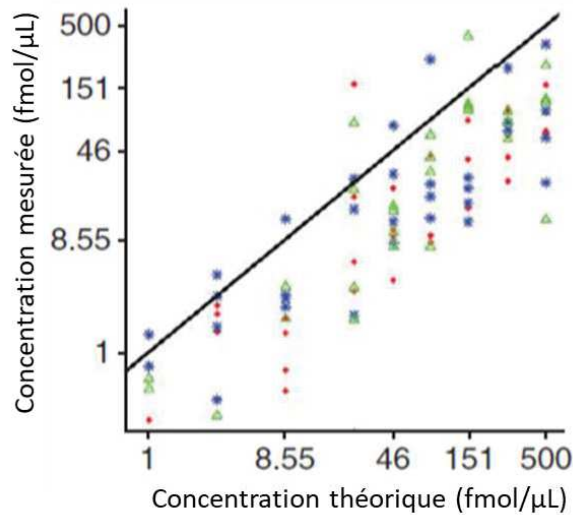


Figure 35: Courbes d'étalonnage représentant les déviations par rapport à la concentration théorique. Les trois transitions d'un même peptide sont représentées de trois couleurs différentes. Des conditions de spray instables ont entraîné une augmentation du CV.

Ces écarts qui diminuent la reproductibilité peuvent être corrigés par le standard marqué. D'autres phénomènes, quant à eux, ne pourront pas l'être. Des interférences peuvent être présentes dans les échantillons biologiques sur certaines transitions (Figure 36A) ou des transitions peuvent saturées lors de la réalisation de la gamme de calibration (Figure 36B).

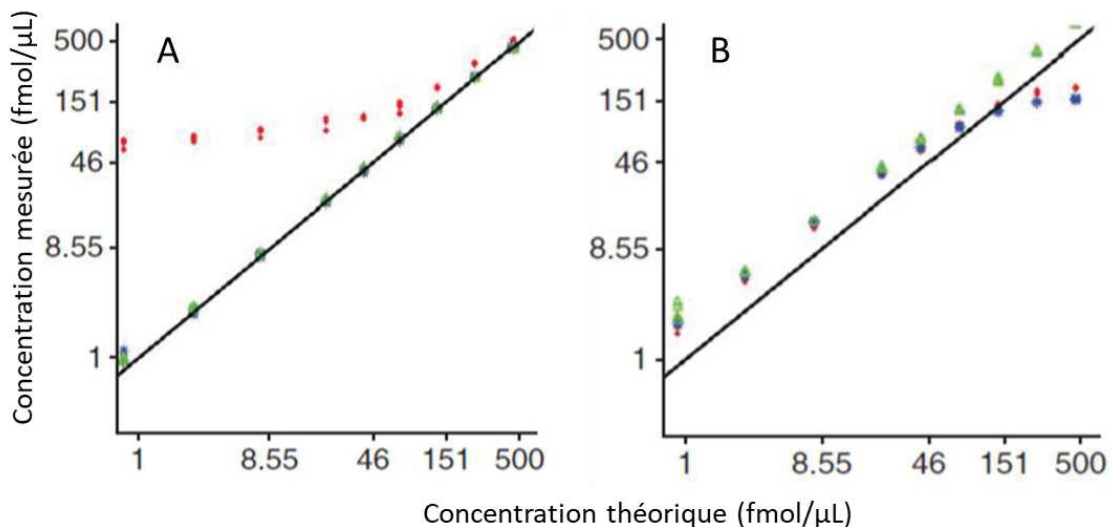


Figure 36: Courbes d'étalonnage représentant les déviations par rapport à la concentration théorique. A : Interférence sur la transition rouge. B : Saturation des transitions Bleu et rouge aux fortes concentrations.

2.8.3 Le standard utilisé

Les étapes de préparation de l'échantillon avant et après digestion influencent les analyses LC-MS. L'utilisation de standard interne est donc requise.

Le « gold standard » pour la quantification absolue par spectrométrie de masse est d'utiliser la protéine standard marquée. Cependant, les protéines marquées ne sont que peu disponibles et/ou à des coûts très élevés. L'alternative la plus utilisée reste les peptides marqués (SIL : Stable Isotope Labeled, ou AQUA : Absolute QUAntification) devant les peptides clivables (winged peptide [181], extended SIL peptide [182], cleavable SIL peptide [183-185], QconCAT [186-209], ou QPrEST).

Abbatiello *et al.* [231] ont quantifié par LC-MRM, 27 biomarqueurs de cancer dans du plasma déplété. Cette étude multi-centrique a permis d'évaluer les performances entre différents laboratoires en utilisant 2 types de standards : des protéines marquées N15 et des SIL peptides. La préparation d'échantillon a été réalisée de façon centralisée puis les analyses ont été faites sur chaque site. Dans ce cas-là, le CV obtenu est de 18% entre les différents systèmes LC-MS. La variabilité sur la préparation d'échantillon seule a été évaluée inférieure à 35% en se basant sur les pics d'aires bruts des peptides. En normalisant par les peptides marqués, cette variabilité baisse en dessous de 25% ce qui indique que 10% de la variabilité est « corrigeable » par l'ajout de peptides marqués. Les 25% restant affectent la LC-MS mais proviennent d'étapes plus en amont dans le workflow d'analyse.

Les préparations d'échantillons et les analyses ont aussi été réalisées sur chaque site. Dans ce cas-là, les CVs obtenus sont de 45% en utilisant des SIL peptides, et de 36% en utilisant les protéines marquées ¹⁵N soulignant les meilleures performances analytiques des protéines marquées.

Les CV obtenus dans cette étude sont supérieurs à l'étude d'Addona *et al.* [230] malgré une correction avec les protéines standards, potentiellement dû à l'étape de déplétion.

Oeckl *et al.* [232] ont eux aussi comparés l'utilisation des trois principaux standards que sont les peptides marqués (SIL), les winged SIL et le QPrEST, et le PSAQ pour le dosage de l'alpha synucléine dans le liquide céphalo-rachidien. La reproductibilité de toutes ces méthodes de normalisation a été évaluée sur une durée de cinq jours (Figure 37A). Les résultats montrent de meilleurs CVs sur la méthode de référence qui est l'approche PSAQ avec des CVs moyen sur tous les peptides de l'ordre de : 3,1–6,8% (PSAQ), 4,9–8,6% (SIL), 3,5–8,7% (winged SIL) et 9,5–10,9% (QPrEST). Bien que l'approche QPrEST implique l'ajout du standard au niveau protéique, la reproductibilité de la méthode n'est pas la meilleure dans cette étude. Des résultats similaires ont également été obtenus sur le liquide céphalo-rachidien et autres matrices complexes (tissus, plasma, ...) [111, 233, 234]. A contrario, l'usage des SIL peptides permet d'obtenir des CVs faibles, ce qui est synonyme d'une préparation d'échantillon robuste puisque ces standards sont introduit post-digestion.

L'exactitude est calculée en fonction de la valeur moyenne obtenue par la normalisation PSAQ qui est en théorie la méthode la plus exacte car le standard est le plus proche de la protéine à doser (Figure 37B). La gamme d'exactitude est de 103 à 137% avec les SIL peptides, et de 111 à 130% avec les winged peptides avec des différences inter-peptides importantes. Celles-ci sont dûes aux rendements variables de digestion sur chaque site tryptique [230, 235, 236], et aux cinétiques de libération des peptides qui peuvent être différentes.

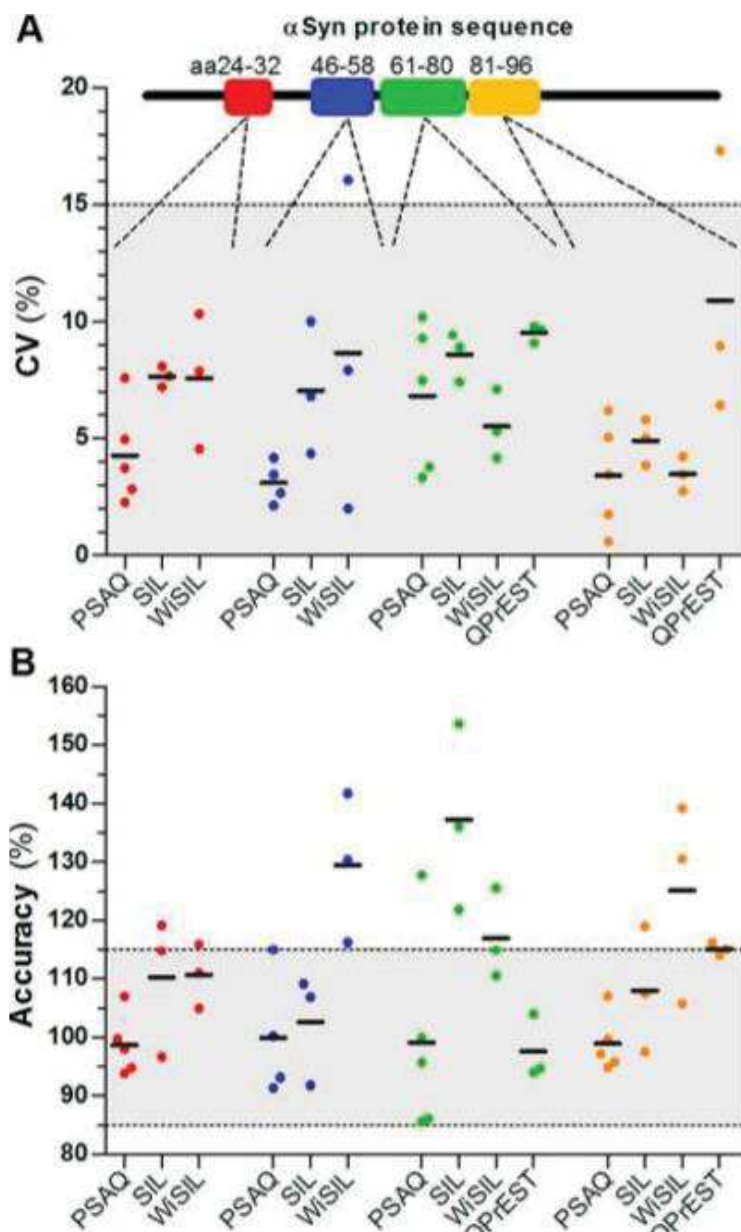


Figure 37: CV (A) et exactitude (Accuracy) (B) obtenus sur la quantification de différents peptides de l'alpha synucléine en utilisant différents étalons [232].

L'ajout de sites de coupure enzymatique dans les winged peptides n'améliore pas les performances analytiques car ces sites ne miment pas la structure tridimensionnelle d'une protéine. Ainsi, la libération du peptide dans le winged peptide est beaucoup plus rapide que la libération du peptide provenant de la protéine entière [237], et la sensibilité aux conditions de digestion (tampons, durée) est très différente. Dans l'étude en question, deux amino-acides sont ajoutés de chaque côté des winged peptides. Un maximum de 6 amino-acides de part et d'autre des winged peptides ou des QconQAT a été ajouté pour mimer un peu mieux l'encombrement d'un site de coupure protéique [235].

Les standards QPrEST qui représentent un bout de la protéine originale de 50 à 100 amino-acides, permettent d'incorporer les sites de coupures mais aussi une partie de la structure tertiaire. Les résultats sur l'alpha-synucléine sont mitigés avec sur les trois peptides quantifiés, un peptide correspondant au N-terminal du QPrEST indétectable, un peptide avec une exactitude de 98%, et un autre avec une exactitude de 115%.

Pour résumer, la méthode PSAQ reste la référence mais est limitée à cause de la faible disponibilité des protéines et d'un coût élevé. De plus, une étude multi-centrique montre [231] que les protéines PSAQ ne permettent de corriger qu'une petite partie du CV inter-sites. Dans les autres cas, une quantification avec les SIS peptides, winged peptides ou QPrEST offrent une normalisation intéressante. Les peptides SIS sont aussi performants que les autres approches à condition d'avoir mis en place un protocole de préparation robuste. Malgré une stricte sélection des peptides protéotypiques, une vérification des performances analytiques, dans des échantillons réels doit être réalisée avant de sélectionner un peptide « quantifier ».

Les standards peptidiques

L'utilisation de SIS peptides repose sur l'hypothèse que la préparation d'échantillon, dont la digestion trypsique a un rendement de 100%. Ceci n'est globalement pas juste [238]. Un contrôle de reproductibilité peut être mis en place avec l'utilisation d'une protéine standard « témoin » qui sert à évaluer ce paramètre. On peut par exemple citer l'exemple du réactif DIGESTIF [239].

La sélection de plusieurs peptides pour une protéine doit permettre d'obtenir une quantification absolue similaire pour tous les peptides. Cet aspect n'est aussi pas toujours vrai et des peptides « discordants » peuvent être présents [177, 238, 240]. Ces différences entre le rendement théorique et le rendement expérimental, et entre les peptides peuvent venir de la stabilité des peptides durant l'étape de digestion, ou pendant le stockage dans le passeur d'échantillon de la LC. Nouri-Nigjeh *et al.* [234] ont étudié la stabilité de 15 peptides provenant de la même protéine (Figure 38).

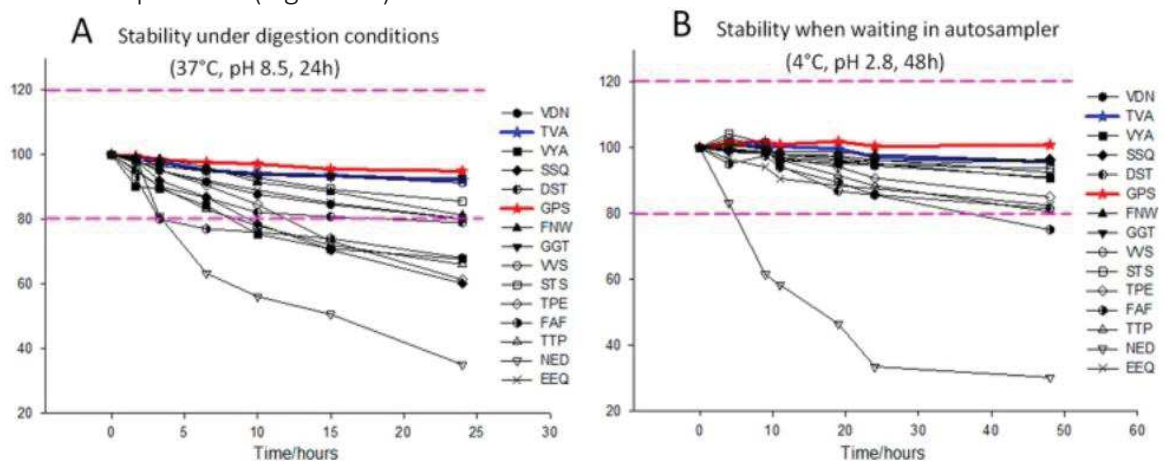


Figure 38: Evolution de l'aire de différents peptides au cours du temps, dans des conditions de digestion (37°C, pH 8,5) (A); et dans les conditions du passeur d'échantillon (4°C, pH 2,8) (B) [234].

Cette étude montre bien que la sélection d'un peptide pour la quantification d'une protéine doit être fait avec le plus grand soin (sélection du peptide protéotypique) mais ses performances (entre autres, la stabilité) doivent être évaluées expérimentalement sur des échantillons réels. Le peptide « GPS » sera utilisé dans le cadre de leur étude car ayant la meilleure justesse (Figure 38).

La quantification basée sur des SIS peptides a généralement un biais négatif car la récupération des peptides est incomplète. Ce phénomène est différent d'un peptide à l'autre [234], mais aussi selon les protocoles de digestion (tampon, durée, ...) engagés [111, 185, 238, 240].

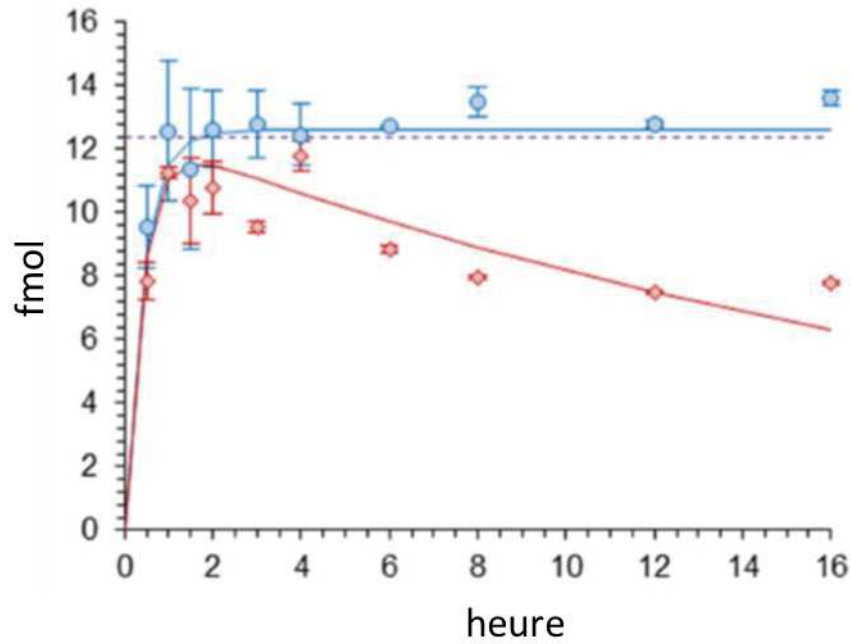


Figure 39: Illustration d'un peptide stable dans le temps (bleu), et instable (rouge)

Lors d'une expérience où le SIL peptide est rajouté à 16 heures, à la quantité de 12,4 fmol, le ratio sera de 1 avec le peptide stable (en bleu), et de 0,5 avec le peptide non stable (en rouge) (Figure 39). C'est ce phénomène qui explique une exactitude généralement supérieure à 100%. Scott *et al.* [235] ont comparé différents tampons de digestion pour diminuer les phénomènes précédemment listés : précipitation, agrégation, digestions non-spécifiques, modifications post-traductionnelles dû à la préparation d'échantillon, ou encore l'adsorption.

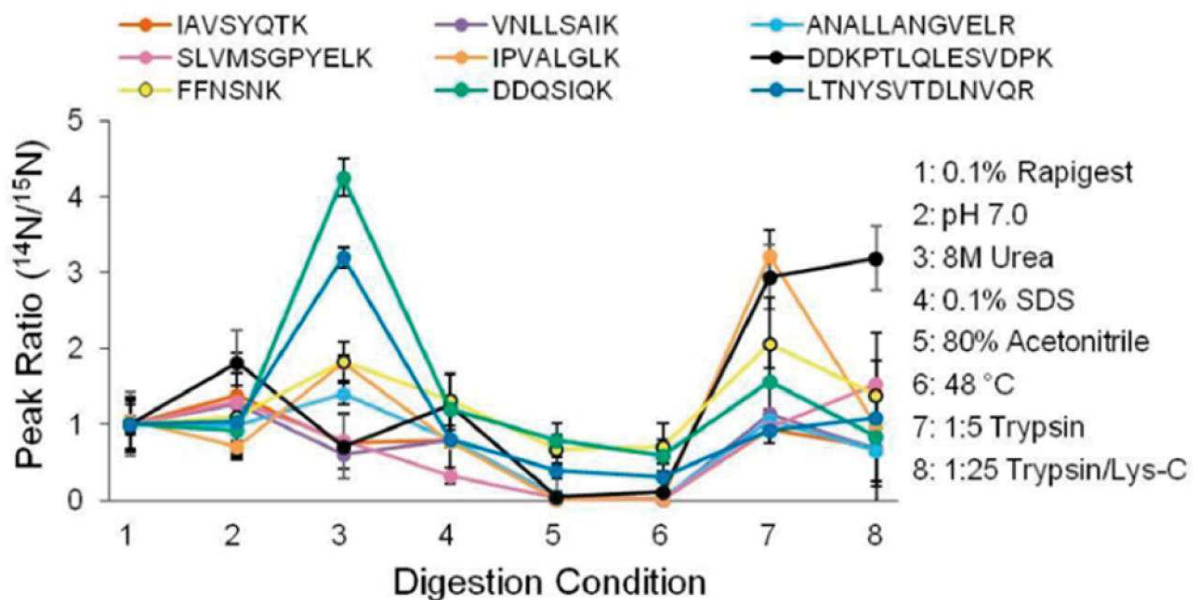


Figure 40: Effet des conditions de digestion sur la récupération de différents peptides. Le ratio de la protéine endogène digérée contre la protéine ^{15}N pré-digérée [235].

Les conditions de digestion optimales sont différentes suivant la séquence de chaque peptide ce qui démontre la complexité d'établir un protocole universel pour quantifier de façon exacte des biomarqueurs protéiques (Figure 40).

En se concentrant uniquement sur l'activité enzymatique de la trypsine, il a été démontré que l'environnement en amino acide (positions P1 et P2 par rapport au site de clivage) influe sur la cinétique de digestion. Des amino-acides acides induisent des cinétiques de digestion diminuées [241]. Le peptide SATHIENDEGQR qui possède l'acide aspartique juste après l'arginine présente le peptide avec une coupure manquée en très forte proportion par rapport au peptide sans coupure manquée (Figure 41). Le peptide DFTSSGGSDAAVVPEDIGR est lui très rapidement généré et sans clivage manqué.

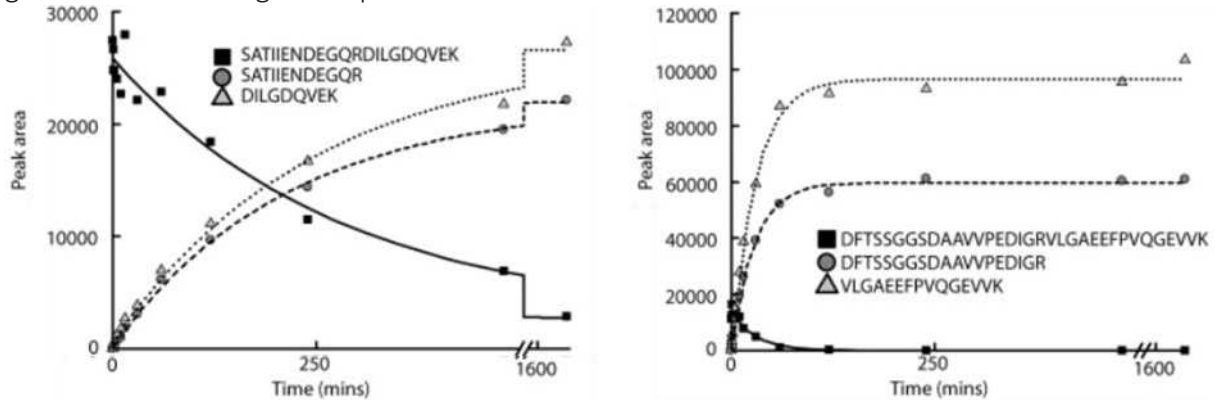


Figure 41: Cinétique de digestion de différents peptides. Le peptide avec le symbole "cercle" représente le produit de la digestion. Le peptide avec le symbole "carré" représente la coupure partielle. Le peptide avec le symbole "triangle" est un contrôle de digestion [241].

Shuford *et al.* [236] ont évalué différents moments pour ajouter les SIL peptides (i) avant la réduction/alkylation, (ii) au moment de la digestion, (iii) après la digestion mais devant la complexité des situations possibles, aucune recommandation sur le temps optimum d'ajout n'a été faite.

Abbatiello *et al.* [231] ont identifié de grosses pertes de peptides pendant les étapes de préparation d'échantillon. Une récupération médiane de 34% sur les peptides est obtenue (gamme de recovery de 1 à 70%). Ces pertes sont dues à l'étape de digestion (environ 73%) et de purification sur C18 des peptides (environ 27%). Un ajout des SIS peptides avant l'étape de purification est donc recommandée car il améliore le taux de récupération de 30 à 42% en valeur médiane.

A l'opposé, le taux de récupération en utilisant les protéines marqués ^{15}N est en médiane de 97%. Ceci démontre l'intérêt d'utiliser un standard protéique ou alors, de bien choisir les SIL peptides pour obtenir une récupération proche de 100% dans une préparation d'échantillon réelle. Cet aspect n'est pas prévisible et il n'est pas garanti de trouver un peptide ayant ces propriétés-là pour chaque protéine. Les variables de la digestion trypsique peuvent être modifiées (tampon, pH, durée, ...) pour modifier ce taux de récupération.

De plus, des modifications sur la forme endogène des protéines (PTMs, clivages, ...) induisent des modifications sur la digestion de celles-ci ce qui va introduire un biais entre la protéine standard et la protéine endogène dosée. Les SIS peptides, après une sélection faite rigoureusement, sont une bonne alternative spécialement lorsqu'il faudra doser des PTMs.

Les standards protéiques

Bien que la quantification absolue en utilisant des standards protéiques marqués soit considérée comme la méthode la plus exacte, des précautions sont nécessaires pour s'en

assurer. En effet, la structure tertiaire de la protéine standard doit être caractérisée pour vérifier qu'elle est similaire à celle de la protéine endogène.

Si ce n'est pas le cas, un changement de structure tertiaire, même minime, peut influencer sur l'adsorption non spécifique de la protéine, la dégradation/la digestion enzymatique, et sur l'étape de préparation d'échantillon notamment pour l'immunoprécipitation. Il est donc nécessaire de casser la structure tertiaire de la protéine endogène et de la protéine standard le plus tôt possible lors de la préparation d'échantillon. Une étape de dénaturation dans un tampon dénaturant peut permettre de réduire les biais de quantifications [242].

Cette observation est renforcée par l'étude de Shuford *et al.* pour la quantification de la thyroglobuline humaine [183]. La quantification absolue a été mise en place avec des SIL peptides, des peptides clivables, et des protéines standards. Ces trois méthodes de quantification ont été croisées à trois tampons de dénaturation/digestion : déoxycholate, urée et trifluoroéthanol. La quantification basée sur des peptides (SIL peptides et peptides clivables) présentent des biais ce qui a déjà été démontré précédemment. Après une sélection de 39 peptides pour la même protéine, le peptide nommé « VIF » a donné de très bonnes performances analytiques. De plus, ces biais sont dépendant des conditions de préparation de l'échantillon ce qui rend compliqué les transferts de méthodes entre laboratoires à moins de fournir une procédure expérimentale bien détaillée et de suivre les performances de façon stricte. La quantification absolue basée sur des protéines standards, qui est la méthode de référence, présente des performances analytiques supérieures. Ce résultat est dû au fait que ce standard est rajouté à la toute première étape de la préparation d'échantillon et donc mime mieux les rendements de préparation. Malgré cela, en comparant trois sources de protéines standards, Shuford *et al.* démontrent qu'il y a des différences de digestion entre les différents standards protéiques ce qui remet en doute la quantification absolue de leur méthodologie. Des différences de glycosylations ont été observées sur leurs différents standards. **De façon générale, la quantification absolue avec des protéines standards est plus juste sans pour autant être « vraie ».** Les protéines natives qui possèdent une structure tridimensionnelle particulière, avec des modifications post-traductionnelles données, ont des propriétés qui induisent des différences de digestion malgré des étapes de dénaturation/réduction/alkylation en amont de l'étape de digestion.

2.9 Validation analytique d'une méthode de dosage de biomarqueurs protéiques par LC-MS

Une méthode d'analyse est opérationnelle après avoir défini un certain nombre de variables analytiques (préparation d'échantillon mise en œuvre pour atteindre la sensibilité voulue et l'analyse LC-MS associée), et de variables « métrologiques » (le standard à utiliser et avec quelle matrice).

La validation de méthode est nécessaire si l'on doit répondre aux questions suivantes :

Est-ce que le signal quantifié est totalement spécifique de l'analyte ?

Quelle est la variabilité associée aux valeurs quantitatives trouvées ?

Quelle est la précision et la justesse des dosages réalisés ?

Quelle est la correspondance entre la gamme de sensibilité et la gamme de concentration clinique ?

Quelles étapes pré-analytiques peuvent être appliquées à l'échantillon ?

Dans le paragraphe suivant, **les indicateurs de performances analytiques vont être détaillés selon les différents guides de validation**: « Bioanalytical Method Validation Guidance for Industry » de la Food and Drug Administration (FDA) édité en 2018 ; « Guideline on bioanalytical method validation » de l'European Medicines Agency (EMA), édité le 21 Juillet 2011 (EMA/CHMP/EWP/192217/2009 Rev. 1 Corr. 2**) ; et « Clinical and Laboratory Standards Institut » CLSI C50-A.

Les principales caractéristiques d'une méthode analytique pour garantir l'acceptabilité des performances et la fiabilité des résultats analytiques sont les suivantes :

Définir la droite d'étalonnage

Evaluation de la sensibilité

Evaluation de la sélectivité et de la spécificité

Evaluation de la contamination des échantillons

Evaluation de la répétabilité et de la fidélité intermédiaire

Evaluation de la justesse

Evaluation du taux de récupération

Evaluation de la stabilité de l'analyte

Les conditions opératoires nécessaires pour évaluer ces paramètres, ainsi que leurs critères d'acceptation sont répertoriées dans le tableau 4.

2.9.1 Définition des standards et réactifs critiques

Une matrice biologique vierge est nécessaire pour préparer des gammes d'étalonnage, des échantillons de contrôle qualité (QCs) et des échantillons de stabilité, par ajout du ou des analyte(s), et du ou des standards internes (IS).

- **Les standards :**

La pureté des étalons de référence utilisés pour préparer les étalons et les QC peut affecter les données de l'étude. Les étalons de référence analytiques doivent être authentifiés en identité, et en pureté. Les certificats d'analyses, y compris la source, le numéro de lot et la date de péremption doivent être fournis. Lors de la préparation de l'IS, différents lots sont préparés pour mimer une analyse de changement de lots.

Dans le cas d'une méthode d'analyse basée sur de la spectrométrie de masse (MS), il est recommandé d'utiliser un système isotopique stable afin qu'aucune réaction d'échange isotopique ne se produise. Il est de plus essentiel que l'étalon marqué présente la plus haute pureté isotopique. La présence d'un analyte non marqué doit être vérifiée et si des quantités relatives d'analyte non marqué sont détectées, l'influence potentielle doit être évaluée lors de la validation de méthode.

Dans le cadre d'une approche top-down, comme dans l'application sur l'hepcidine, le standard utilisé est la protéine marquée.

Dans le cas d'une approche bottom-up, les standards utilisés sont de façon générale des peptides marqués. La sélection du peptide « quantifier » est une tâche indispensable.

Hoofnagle *et al.* [212] ont publiés des recommandations pour la commande et la caractérisation d'un peptide standard (Tableau 3).

Tableau 3: Qualification d'un peptide standard [212].

Description	Specification
Amount	≥1 mg ordered; ≤5 mg net peptide content confirmed by AAA
Chemical purity	>95%
Isotope	¹³ C, ¹⁵ N; for doubly charged precursors, use minimum of 6 Da mass delta to unlabeled amino acid; for triply charged precursors, a minimum of 8-10 Da is recommended
Isotopic purity (atom percent)	>99%
Heavy amino acids	Lys, Arg are recommended in the case of tryptic peptides; other amino acids may be labeled (e.g., Leu, Phe)
Number of heavy amino acids	0-2, depending on sequence and label
Mass difference (relative to unlabeled peptide)	6-20 Da depending on amino acid sequence
Location of heavy amino acids	C-terminal Lys or Arg (unless noted otherwise)
Amino acids to be chemically modified as part of peptide synthesis	All Cys as carbamidomethylated Cys; incorporate posttranslational modifications if the goal is to quantify the modified peptide (e.g., phosphorylation at Ser, Thr, and/or Tyr; acetylation; epigenetic modifications on Lys/Arg)
Delivery time	4-6 weeks
Formulation	
Up to first 1 mg peptide	5%-30% acetonitrile/0.1%-1% formic acid at approximate concentration of 0.5-2 nmol/μL (500-2000 μmol/L); aliquots of this solution are used for AAA
Remaining peptide	Dry powder (preferably in 0.1- to 1-mg aliquots) stored under argon/nitrogen or in a desiccator at -20 °C or lower for longer-term storage (>6 months)
Purification method	Preparative RP-HPLC
QC	
Step 1 (LC-UV)	Analytical RP-HPLC chromatogram (determine percentage purity)
Step 2 (MS or LC-MS/MS)	MALDI, electrospray ionization spectrum (mass ID confirmation), or MS/MS (label plus sequence verification)
Step 3 (AAA)	Concentration (pmol/μL or μM); percent variation or percent relative error from expected amino acid composition

La quantification basée sur des standards peptidiques peut être négativement affectée par des problèmes de stockage et de manipulation des différents étalons.

Pendant le stockage, plusieurs effets peuvent induire un biais sur la quantification telle qu'une perte de solubilité et/ou un changement de conformation. Ces phénomènes peuvent être dus à une évaporation, des adsorptions non-spécifiques, agrégation, dégradation microbienne, et/ou des modifications chimiques. En fonction du tampon de stockage, ces effets peuvent être limités. Les cystéines, méthionines et tryptophanes sont sujets à oxydation [243] qui est augmentée avec les cycles de congélation/décongélation à pH basique. La glutamine et l'asparagine sont sujets à la déamidation [244] et ceci est augmentée pendant l'étape de séchage à pH acide. La déamidation est aussi favorisée avec une glycine en N-terminal (Asn-Gly; Gln-Gly).

Le stockage à long terme (> 6 mois) est recommandé sous forme sèche entre -20 et -80°C [245]. La remise en solution est une étape critique pour la justesse de la méthode analytique. La re-suspension d'un peptide tryptique est généralement performante dans un tampon 5% acétonitrile / 0,1% acide formique [212]. Si la solubilisation pose problème dans ces conditions, la proportion du solvant organique peut être augmentée ou modifiée (méthanol à la place de l'acétonitrile). Le pH peut aussi être modifié en rajoutant de l'acide (jusqu'à 1% d'acide formique ou de TFA (TriFluoroAcetic acid)), ou de la base (1% de bicarbonate d'ammonium ou d'hydroxyde d'ammonium). Les peptides "acides" contenant majoritairement des aminoacides tels que l'acide aspartique, l'acide glutamique plutôt que des résidus tels que l'histidine, la lysine et l'arginine sont plus solubles dans les tampons basiques. Les peptides avec une grande part d'acides aminés hydrophobes (Ala, Val, Leu, Ile, Met, Phe, Trp, Pro) nécessitent une plus grande proportion de solvant organique. Une autre option est de re-suspendre les peptides avec du DMSO (DiMethyl Sulfoxide).

Chaque solution concentrée (0,5 - 2 nmol/uL) est stockée à basse température (<-70°C) dans des tubes scellés. Les solutions de travail (1-100 pmol/uL) doivent être stockées moins de trois mois, et il faut éviter les cycles de congélation/décongélation.

L'analyse du ratio des transitions pour l'analyte et l'IS est fortement recommandée pour démontrer l'absence d'interférences. Pour cette analyse, des fragments non-spécifiques de la séquence (perte d'eau, adduits de solvants ou de sels, ...) ne sont pas choisis. Selon le guide C50-A, une tolérance de variation de 20% sur la journée est acceptée dû à la variabilité des spectromètres de masse. De plus, ce ratio doit être dans une fenêtre d'élution chromatographique de tolérance de 2,5%.

- Réactifs critiques :

Les réactifs critiques dont font partie entre autres, les anticorps, les analytes marqués, les matrices, et les enzymes, doivent être caractérisés et documentés de manière appropriée (c'est-à-dire déterminer l'identité, la pureté et la stabilité).

- Choix de la matrice pour le cas d'un dosage d'un composé endogène comme une protéine :

Pour les analytes qui sont également des composés endogènes, la précision de la mesure pose problème. Dans de telles situations, la matrice biologique utilisée pour préparer les étalons d'étalonnage doit être identique à celle des échantillons de l'étude et exempte d'analyte endogène. Pour déterminer s'il est approprié d'utiliser une matrice biologique sans analyte, il convient de démontrer que celle-ci :

- ne contient pas d'analyte endogène mesurable
- n'a pas d'effet de matrice ni d'interférence par rapport à la matrice biologique

L'utilisation de matrices alternatives (tampons, sérum dialysé, par exemple) pour la préparation des étalons doit être justifiée.

- **Contrôle qualité (QC) :**

Les contrôles qualité permettent d'évaluer la précision et la justesse d'un test, ainsi que la stabilité des échantillons. En d'autres termes, ils servent à évaluer les performances du protocole analytique complet mais ne sont pas informatifs sur les variabilités pré-analytiques. Les QCs doivent être préparés dans la même matrice que les échantillons à analyser avec la méthode validée. Ils sont préparés soit à partir d'un Matériaux de Référence Certifiés (MRC, matériau accompagné d'un certificat fournissant la valeur de référence et son incertitude associée ainsi que la déclaration de la traçabilité métrologique) ou non certifiés (MR, matériau suffisamment homogène, stable avec une valeur connue).

Des QCs fraîchement préparés sont recommandés pour les analyses de justesse et d'exactitude lors du développement de la méthode, car les données de stabilité ne sont généralement pas disponibles au début de l'étude. Les points de gamme et les QCs doivent être préparés à partir de solutions mères séparées, et dans une matrice vierge exempte d'interférences ou d'effets matrice.

Des QCs ayant des concentrations similaires à la LLOQ (Low Limit Of Quantitation) ; basses ($3 \times$ LLOQ) « *LQC* », moyennes (milieu de gamme) « *MQC* », et hautes (dans les 25% haut de la gamme) « *HQC* » doivent être préparés au début de l'étude. Ces QCs ne sont généralement pas disponibles commercialement ce qui complique les comparaisons inter-laboratoires. De plus, pour mimer la variabilité inter-lots, 5 différentes séries de QCs doivent être préparés dès le début de l'étude. Dans le cas d'une étude inter-lots, l'ancien et le nouveau lot seront analysés en triplicat.

Dans le cas d'un dosage d'un composé endogène, les QCs doivent être préparés en ajoutant des quantités connues de l'analyte dans la même matrice biologique que les échantillons de l'étude. Les concentrations endogènes de l'analyte dans la matrice biologique doivent être évaluées avant la préparation du QC. Les concentrations pour les QCs doivent tenir compte des concentrations endogènes dans la matrice biologique et être représentatives des concentrations attendues de l'étude.

- **Echantillons de patients :**

Un minimum de 40 échantillons de patients répartis sur la gamme de concentration clinique doit être disponible pour appliquer la méthode en cours de validation.

2.9.2 Définir la droite d'étalonnage

La plage de quantification de la méthode est définie en amont en fonction de la sensibilité de la méthode et de la plage de concentration attendue chez les patients. Lorsque la méthode est validée, la courbe d'étalonnage doit être continue et reproductible. Les points de gamme doivent être préparés dans la même matrice biologique que les échantillons de l'étude envisagée. Lorsque des matrices de substitution sont nécessaires, leur utilisation doit être

justifiée et validée.

2.9.3 Évaluation de la sensibilité

La LLOQ (Low Limit Of Quantification) définit la sensibilité de la méthode. L'évaluation de la LLOQ peut être effectuée séparément ou dans le cadre de l'évaluation de la répétabilité et de la fidélité intermédiaire de la droite d'étalonnage.

2.9.4 Évaluation de la sélectivité et de la spécificité

La méthode analytique doit permettre de différencier le ou les analytes d'intérêt et l'IS des composants endogènes de la matrice ou d'autres composants de l'échantillon. La spectrométrie de masse est une des méthodes analytiques les plus spécifiques car elle se base sur la masse de la molécule mais aussi sur des informations de structure (temps de rétention chromatographique et de fragments MS/MS). Cependant, les fluides de patients, comme le sang, sont des matrices très complexes. Il doit donc être démontré que la substance à mesurer possède un minimum d'interférences. De plus, l'effet matrice peut jouer un rôle sur la suppression des ions et l'efficacité de l'extraction.

L'absence d'interférences et d'effet matrice doit être prouvée en utilisant au moins 6 sources individuelles de matrices vierges appropriées, qui sont analysées individuellement. L'utilisation de moins de sources est justifiable dans le cas de matrices rares.

En plus de la matrice normale, d'autres échantillons peuvent être envisagés (par exemple plasma hémolysés et/ou hyperlipidémiques) si l'étude inclue des populations spéciales (telles que des populations présentant une insuffisance rénale ou hépatique). Plus généralement, une étude expérimentale pertinente doit être réalisée afin d'établir l'influence de substances présentes dans la matrice et potentiellement interférentes : hémolyse, turbidité, bilirubine, ictère, médicaments, ...

L'effet matrice, ou le phénomène de suppression ionique, est étudié en comparant la réponse de l'analyte dans un solvant (réponse MS maximale sans interférences) à l'analyte introduit dans une matrice blanche après extraction (réponse MS modifiée par l'effet matrice). L'IS sert aussi à corriger ces effets en utilisant les ratios d'aires et de concentrations de l'analyte et de l'IS comme base de raisonnement.

Une étude de parallélisme (dilution en série d'un échantillon) doit être réalisée pour évaluer les éventuelles liaisons non spécifiques et notamment dans le cas de composés endogènes. Le parallélisme doit être évalué en ajoutant à la matrice une concentration en analyte supérieure à la ULOQ (Upper Limit Of Quantification) et en diluant cet échantillon avec une matrice blanche. La dilution des échantillons ne doit pas affecter l'exactitude et la précision.

2.9.5 Évaluation de la contamination des échantillons

Des phénomènes de contamination peuvent être observés lors de l'utilisation de systèmes analytiques, notamment au niveau des systèmes de pipetage des échantillons (contamination inter-échantillons) et de distribution des réactifs (contamination inter-réactifs). Le phénomène de contamination inter-réactif peut se produire sur un analyseur lorsque le système de

distribution est commun à tous les réactifs.

La contamination entre échantillons (« carry-over » ou « effet mémoire ») peut se produire sur les couplages LC-MS. Les adsorptions non spécifiques des peptides dans le système analytique sont la cause du phénomène de carry-over. Cette contamination augmente la variabilité analytique [246]. La réduction du carry-over est possible avec des méthodes LC davantage optimisées (lavages de la vanne d'injection, de la boucle d'injection, et de la seringue) ainsi que des solvants plus adaptés.

2.9.6 Évaluation de la répétabilité et de la fidélité intermédiaire

L'évaluation de la précision sur toute la plage de quantification est essentielle pour valider la méthode. La précision de la méthode analytique décrit la proximité de mesures individuelles répétées de l'analyte. Chaque répétition doit inclure des QCs préparés fraîchement et analysés par répétition.

Répétabilité :

L'essai de répétabilité consiste à analyser un même échantillon dans les conditions suivantes : même opérateur, même lot de réactifs, même instrument, même étalonnage dans un délai le plus court possible. L'objectif est de caractériser la meilleure performance possible, dans des conditions optimales et de vérifier le bon fonctionnement du système (instrument/réactif) pour l'analyte concerné.

Ce calcul est répété pour chacune des matrices (sérum, urine, LCR,...) soumises à analyse, en utilisant des échantillons biologiques ou des QCs. Pour un même analyseur, ce calcul doit être effectué pour chaque analyte à mesurer et à plusieurs niveaux de concentration.

Fidélité intermédiaire :

Il s'agit de l'étude de la reproductibilité intra-laboratoire. L'essai de fidélité intermédiaire consiste à analyser un même échantillon dans des conditions différentes en faisant varier au moins un des facteurs : l'opérateur, le temps, les lots de réactifs, les étalonnages, ...

La variabilité inter-opérateurs constitue un indicateur de la maîtrise de la réalisation des méthodes non automatisées. Le laboratoire pourra utiliser la variabilité inter-opérateurs (CV) et la comparer à la variabilité intra-opérateur d'un référent.

La robustesse d'une procédure d'analyse est une mesure de sa capacité à ne pas être affectée par des variations opératoires faibles. La robustesse fournit une indication sur la fiabilité de la méthode dans les conditions normales d'utilisation.

Ces variations, faibles, correspondent à l'écart d'un paramètre opératoire par rapport à sa valeur nominale définie dans la méthode. Cela nécessite d'identifier les paramètres (pH, température, ...) ayant un effet significatif sur la performance de la méthode. L'évaluation de la robustesse n'est indispensable que pour les tests développés en interne.

Certains paramètres peuvent avoir une influence comme par exemple, une température d'incubation, un effet de bords sur une microplaque ou la composition d'une phase mobile. Pour évaluer la robustesse d'une procédure d'analyse, un échantillon homogène est préparé de nombreuses fois en faisant varier les paramètres retenus. La complexité de la procédure d'analyse augmente généralement le nombre de ces paramètres.

2.9.7 Évaluation de la justesse

L'évaluation de la justesse sur toute la plage de quantification est essentielle pour valider la méthode. Cette évaluation peut être envisagée en comparant la moyenne de plusieurs dosages d'un même échantillon à une valeur cible, assimilée à la « valeur vraie ». L'écart observé correspond au biais. Le biais peut être évalué à partir des résultats obtenus avec des échantillons de contrôle titrés (QCs).

La commutabilité des échantillons, c'est-à-dire leur capacité à se comporter comme des échantillons réels (échantillons de patient) quelle que soit la méthode utilisée, doit être prise en compte. En effet, les effets de matrice engendrés par les différents traitements subis par les QCs durant leur préparation (lyophilisation, congélation, ajout de conservateur, surcharge, mélange, ...) peuvent être à l'origine de biais qui ne sont pas retrouvés avec des échantillons patients.

2.9.8 Évaluation du taux de récupération

L'extraction de l'analyte (taux de récupération) doit être efficace et reproductible. La récupération ne doit pas nécessairement être de 100%, mais l'ampleur de la récupération d'un analyte et des IS doit être cohérente et reproductible.

Le taux de récupération est affecté par la qualité de la préparation d'échantillon mais aussi par l'adsorption non spécifique des peptides. Ce dernier point est une variable non négligeable qui introduit un biais dans la méthode analytique. Les adsorptions peuvent conduire à des pertes à chaque cône de pipette utilisé ou à chaque transfert dans un tube. L'adsorption non-spécifique est plus marquée pour de faibles concentrations en peptide [247].

Le taux de récupération est étudié en comparant la réponse de l'analyte introduit dans une matrice blanche après extraction (réponse MS modulée par l'effet matrice) ; et l'analyte introduit dans une matrice blanche avant extraction (réponse MS modifiée par l'effet matrice + pertes pendant les étapes de préparation).

2.9.9 Évaluation de la stabilité de l'analyte

La stabilité chimique de l'analyte dans une matrice donnée, y compris les effets de la collecte, de la manipulation et du stockage des échantillons doivent être déterminés. Les stabilités dans le passeur d'échantillons et sur la paillasse des échantillons extraits, les cycles congélation-décongélation sur l'échantillon original, la stabilité à long terme de la solution mère d'analyte sont en général mesurés.

La stabilité doit être évaluée dans la même matrice que celle destinée aux échantillons inclus dans l'étude. Cependant, lorsque la matrice est rare, l'utilisation de matrices de substitution peut être justifiée.

Lors de la validation, les évaluations de stabilité doivent couvrir les conditions attendues avant réception sur le site d'analyse (par exemple, sur le site de prélèvement, pendant l'expédition, et sur tous les autres sites secondaires), ainsi que pendant la réception, et l'analyse sur le site d'analyse. La stabilité d'un analyte dans un système de matrice et dans un récipient particulier n'est pertinente que pour ce système de matrice et de conteneur et ne doit pas être extrapolée à d'autres matrices et conteneurs.

Toutes les déterminations de stabilité doivent utiliser un ensemble d'échantillons fraîchement préparés.

- Stabilité de l'échantillon après collecte : la stabilité de l'analyte dans la matrice échantillonnée doit être évaluée directement après le prélèvement sanguin des sujets et leur préparation au laboratoire avant stockage. Le but est de garantir que les concentrations obtenues par la méthode analytique reflètent les concentrations de l'analyte chez le sujet au moment de l'échantillonnage. Une démonstration de cette stabilité peut être nécessaire au cas par cas, en fonction de la structure de l'analyte.
- Stabilité de l'extrait (ou de l'échantillon traité) : la stabilité des échantillons traités, y compris le temps de séjour dans le passeur d'échantillon doivent être évalués. Au niveau du système analytique, le temps d'attente dans le vial LC est très critique [248]. Différents vials composés de types de surfaces spécifiques sont disponibles. Les vials en verre peuvent faire des interactions avec les acides aminés basiques *via* les groupements silanol. Les vials en polypropylène affectent les acides aminés apolaires en général [249]. Les fournisseurs de vials ont développé des produits plus performants avec du verre désactivé (groupements silanol masqués), ou du polypropylène modifié. Ce facteur doit être testé expérimentalement car il n'y a pas de règle générale.
- Stabilité aux cycles congélation/décongélation : Les QCs doivent être décongelés et analysés selon les mêmes procédures que les échantillons de l'étude. Les QCs doivent être congelés pendant au moins 12 heures entre les cycles. Le nombre de cycles congélation/décongélation doit être égal ou supérieur au nombre de cycle des échantillons de l'étude. Les QCs de stabilité congélation/décongélation doivent être comparés aux courbes d'étalonnage et aux QCs fraîchement préparés.
- Stabilité à long terme de l'analyte dans la matrice : Les QCs doivent être stockés dans les mêmes conditions de stockage et au moins pendant la même durée que les échantillons de l'étude. Les QCs de stabilité à long terme doivent être comparés aux courbes d'étalonnage et aux QCs fraîchement préparés. Selon la norme FDA, la détermination de la stabilité à -20 °C couvrirait la stabilité à des températures plus froides. Selon la norme EMA, la stabilité doit être étudiée à chaque température à laquelle les échantillons seront stockés.
- Stabilité des solutions stocks de standards : Lorsque la solution mère existe dans un état différent (par exemple, solution ou solide) ou dans une composition tampon différente (ce qui est généralement le cas pour les macromolécules) du standard de référence certifié, les données de stabilité sur les solutions stock doivent être étudiées. Il n'est pas nécessaire d'étudier la stabilité à chaque niveau de concentration des solutions de travail. Il n'est pas nécessaire d'étudier la stabilité des étalons internes marqués aux isotopes stables s'il est démontré qu'aucune réaction d'échange isotopique ne se produit dans les mêmes conditions que la stabilité de l'analyte.

Pour les réactifs commerciaux, le laboratoire notera les préconisations relatives à la stabilité des réactifs définies par le fournisseur (température et durée de conservation avant/après ouverture, conservation embarquée sur l'analyseur, ...).

Tableau 4: Synthèse des paramètres analytiques à valider lors d'une validation de méthode.

Paramètres à valider	Expériences à réaliser	Critères de validation
Droite d'étalonnage	6 à 8 points de gamme, plus un point zéro, et un blanc Le point le plus bas correspond à la LLOQ. 2 à 4 réplicats pour chaque point La droite est réalisée dans la même matrice que les échantillons.	Le biais doit être au maximum de 15%, et de 20% à la LLOQ pour au moins 75% des 6 à 8 points de gamme.
Linéarité		La droite de calibration doit être établie avec le modèle linéaire le plus simple.
Sensibilité de la méthode	Le point le plus bas de gamme correspond à la LLOQ. 40 réplicats à analyser : 3 à 5 réplicats répartis sur au moins 5 jours	Le biais et le CV doivent être inférieurs à 20% Le signal/bruit doit être supérieur à 5.
Spécificité / Sélectivité / Interférences	Analyse de la matrice blanche	La réponse en analyte ne doit pas dépasser 20% de la réponse de la LLOQ.
	Analyse d'échantillons blancs provenant d'au moins 6 différentes sources	La réponse sur l'IS ne doit pas excéder 5% de la moyenne des réponses de l'IS sur les calibrateurs et les QCs.
	Analyse d'échantillons de patients	Le ratio des transitions ne doit pas être modifié de plus de 20% de la moyenne des ratios sur les analyses des QCs.
Effet Matrice	Comparaison de la réponse de l'analyte introduit dans un solvant, à l'analyte introduit dans une matrice blanche après extraction Analyse de matrices blanches provenant d'au moins 6 différentes sources Enrichir en deux concentrations différentes : 3xLLOQ, et proche de la ULOQ	Le biais doit être au maximum de 15%.
Parallélisme	Échantillon surchargé, dilué avec une matrice blanche 5 réplicats d'analyse pour chaque dilution	Le biais doit être au maximum de 15%.
Répétabilité	Analyse de 5 réplicats des 4 QCs (LLOQ, LQC, MQC, HQC)	Le CV doit être au maximum de 15%, et de 20% à la LLOQ.
Fidélité intermédiaire	Analyse de 5 réplicats des 4 QCs (LLOQ, LQC, MQC, HQC) sur plus de deux jours	Le CV doit être au maximum de 15%, et de 20% à la LLOQ.

	Analyse de 5 réplicats des 4 QCs (LLOQ, LQC, MQC, HQC) avec deux opérateurs différents	
Justesse	Analyse de 5 réplicats des 4 QCs (LLOQ, LQC, MQC, HQC) sur plus de deux jours	Le biais doit être au maximum de 15%, et de 20% à la LLOQ
Contamination des échantillons	Injecter un point à la ULOQ trois fois, un échantillon blanc trois fois Répéter cette séquence 5 fois	La réponse en analyte ne doit pas dépasser 20% de la réponse de la LLOQ. La réponse sur l'IS ne doit pas excéder 5% de la moyenne des réponses de l'IS sur les calibrateurs et les QCs.
Taux de récupération	Comparer les résultats d'un échantillon extrait, et d'un échantillon blanc spiké juste avant l'analyse LC-MS Analyse en duplicat des 4 QCs (LLOQ, LQC, MQC, HQC) Dans le cas de composés endogènes, réaliser de la même façon par ajouts-dosés.	Le taux de récupération doit être de 100%.
Stabilité	Faire des tests de stabilité sur les échantillons, les échantillons extraits, les standards, et les 4 QCs Durée des évaluations en fonction de l'étude	Le biais doit être au maximum de 15%.

3 Chapitre 2 : le phénotypage de l'Apolipoprotéine E, facteur de risque de la maladie d'Alzheimer

Au cours de ce chapitre va être développé une approche de LC-MRM développée pour détecter spécifiquement trois protéoformes de l'apolipoprotéine E.

3.1 Introduction

L'apolipoprotéine E (ApoE) est une glycoprotéine de 299 acides aminés et d'environ 34kDa [250]. Cette protéine joue un rôle important dans le métabolisme des lipides par sa capacité à interagir avec les LDL (low-density lipoprotein) et les VLDL (very-low-density lipoprotein) [251]. Elle interagit avec deux familles de récepteurs qui sont les « LDL receptor (LDLR)» et les « LDL receptor related family (LRP)» ; et les « heparan sulfate proteoglycans (HSPG)» [250, 252]. L'apoE est principalement exprimée dans le foie, dans le cerveau, et plus minoritairement dans d'autres tissus [253].

L'apoE est codée par le chromosome 19 sous trois allèles différents conduisant à l'existence de six phénotypes : E2/E2 ; E3/E2 ; E3/E4 ; E2/E4 ; E3/E3 ; et E4/E4 [254]. Ces isoformes d'apoE correspondent à des modifications d'acides aminés en position 112 et 158. L'apoE2 contient deux cystéines en ces positions, l'apoE3 une cystéine en position 112 et une arginine en position 158, et l'apoE4 deux arginines en ces positions.

La structure de la protéine est constituée de 12 hélices. La partie centrale de la protéine, qui comprend les deux variations d'acides aminés (112 et 158), est impliquée dans la liaison aux récepteurs (Figure 42) [255]. C'est cette explication structurelle qui est avancée pour expliquer l'implication de tel ou tel phénotype dans différentes pathologies. Enfin, une région de liaison aux lipides est présente en C terminal, reliée à la partie centrale par un coude flexible.

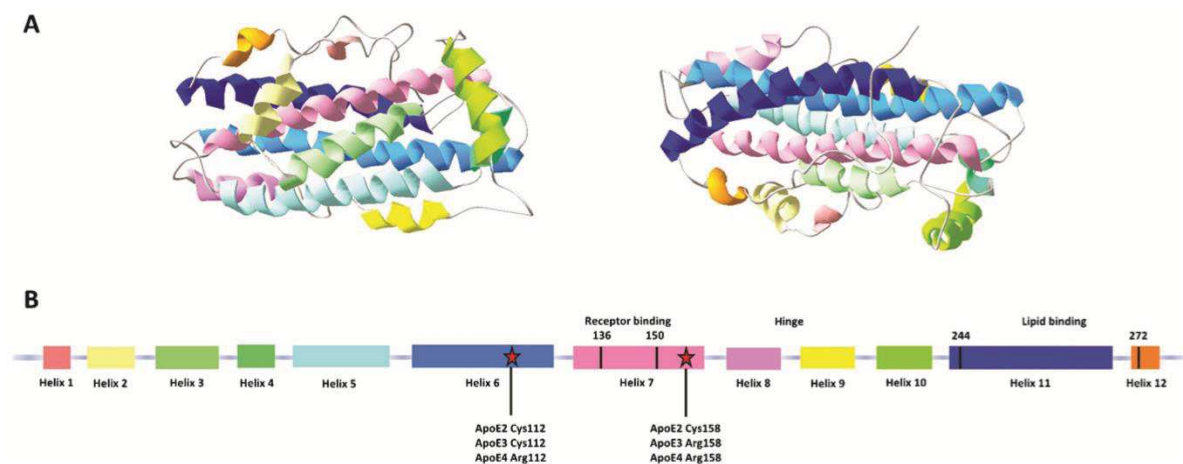


Figure 42: Structure tertiaire (A) et secondaire (B) de l'ApoE. Avec une étoile rouge sont représentés les deux sites de mutations d'acides-amino.

Les différents allèles, de par leurs structures, ont des affinités pour les VLDL et les LDL différentes ce qui conduit à des éliminations plus ou moins rapides. Ces différents allèles sont impliqués dans des maladies cardiovasculaires comme des dysbétalipoprotéïnémies [256], ou des hypertriglycéridémie [257].

La production locale d'allèles de l'apo E au niveau cérébral, est aussi liée à des maladies neurologiques comme la maladie d'Alzheimer. L'allèle E2 est « protecteur » [258] tandis que l'allèle E4 augmente le risque d'avoir une maladie d'Alzheimer d'un facteur 3 à 4 dans les cas hétérozygotes, et de 10 à 14 fois dans le cas homozygote [259-261]. Le mécanisme impliquant l'apoE dans cette pathologie n'est pas élucidé et plusieurs publications se contredisent dans leurs conclusions.

C'est dans ce contexte-là que le sujet a été abordé au laboratoire : déterminer le facteur de risque de chaque individu à développer une maladie d'Alzheimer. De plus, cette information est très importante pour discriminer les différentes populations lors de l'étude de biomarqueur ou de traitement.

3.2 Résultats

3.2.1 Introduction

La partie résultat de ce chapitre va s'appuyer sur l'article « **Development of new quantitative mass spectrometry and semi-automatic isofocusing methods for the determination of Apolipoprotein E typing** ». Cet article met en avant le développement d'une méthode de spectrométrie de masse LC-MRM pour phénotyper le patient sur un prélèvement sanguin. Le phénotypage des différentes formes d'ApoE est réalisable que par la détection de deux aminoacides spécifiques en position 112 (C -> R) et 158 (R -> C) (Figure 43)

MKVLWAALLV	TFLAGCQAKV	EQAVETEPEP	ELRQQTEWQS	GQRWELALGR
FWDYLRWVQT	LSEQVQEELL	SSQVTQELRA	LMDETMKELK	AYKSELEEQL
TPVAEETRAR	LSKELQAAQA	RLGADMEDV C	GRLVQYRGEV	QAMLGQSTEE
LRVRLASHLR	KLRKRLLRDA	DDLQ R LAVY	QAGAREGAER	GLSAIRERLG
PLVEQGRVRA	ATVGSLAGQP	LQERAQAWGE	RLRARMEEMG	SRTRDRLDEV
KEQVAEVRAK	LEEQAQQIRL	QAEAFQARLK	SWFEPLVEDM	QRQWAGLVEK
VQAAVGTSA	PVPSDNH			

Figure 43: Séquence protéique de l'apolipoprotéine E (P02649). En gras, les amino acides en position 112 et 158

Par digestion trypsique, différents peptides sont libérés et quatre peptides sont suivis par le système MS pour pouvoir déterminer le génotype de chaque patient (Tableau 5).

Tableau 5: Différentes combinaisons possibles en fonction des 4 peptides détectés pour élucider le génotype du patient

Génotype	Phénotype	ApoE2	ApoE2 and E3	ApoE3 and E4	ApoE4
		CLAVYQAGAR	LGADMEDV C GR	LAVYQAGAR	LGADMED V R
E2/E2	E2	x	x		
E2/E4	E2+E4	x	x	x	x
E3/E3	E3		x	x	
E3/E2	E3+E2	x	x	x	
E3/E4	E3+E4		x	x	x
E4/E4	E4			x	x

La méthode développée s'appuie sur une préparation d'échantillon assez simple constituée de 6 ou 4 étapes car la réduction/alkylation est facultative selon les peptides cibles : dénaturation de l'échantillon, réduction des ponts disulfures, alkylation des cystéines, digestion enzymatique, purification des peptides libérés, et analyse LC-MRM. L'ajout de SIS peptides est utilisé pour valider la partie analytique. Cette nouvelle méthode est comparée à la méthode de référence pré-existante. La différence de charge entre les différentes isoformes est utilisée en isoélectrofocalisation pour pouvoir séparer et identifier la composition en ApoE [262]. L'ApoE4 a plus de charges positives que l'apoE3 et encore plus que l'apoE2.

3.2.2 Article scientifique :

Development of new quantitative mass spectrometry and semi-automatic isofocusing methods for the determination of Apolipoprotein E typing.

Hirtz C*, Vialaret J*, Nouadje G, Schraen S, Benlian P, Mary S, Philibert P, Tiers L, Bros P, Delaby C, Gabelle A, Lehmann S. Clin Chim Acta. 2016 Feb 15;454:33-8.

* Authors have contributed equally to this work



Development of new quantitative mass spectrometry and semi-automatic isofocusing methods for the determination of Apolipoprotein E typing



Christophe Hirtz ^{a,1}, Jerome Vialaret ^{a,1}, Georges Nouadje ^b, Susanna Schraen ^c, Pascale Benlian ^{d,e}, Sandrine Mary ^d, Pascal Philibert ^f, Laurent Tiers ^a, Pauline Bros ^a, Constance Delaby ^a, Audrey Gabelle ^{a,g}, Sylvain Lehmann ^{a,*}

^a CHRU de Montpellier, Hôpital St Eloi Université de Montpellier, INSERM U1183, IRMB, Laboratoire de Biochimie Protéomique Clinique, Montpellier, France

^b SEBIA, 91008 Evry, France

^c Inserm U837, Lille, FRANCE Université Paris 7-Denis Diderot, France

^d Université Lille 2 and UMR CNRS 8199 Integrative Genomics and Metabolic Disease Modeling, LILLE France

^e CHRU de Lille, Unité de Médecine Moléculaire des Maladies Métaboliques (U4M), Lille, FRANCE

^f CHRU de Montpellier, Service de Biochimie et d'Endocrinologie, Montpellier, France

^g Centre Mémoire de Ressources et de Recherche Languedoc-Roussillon, Département de Neurologie, CHRU de Montpellier, Université de Montpellier, Montpellier, France

ARTICLE INFO

Article history:

Received 20 November 2015

Received in revised form 11 December 2015

Accepted 17 December 2015

Available online 19 December 2015

Keywords:

Apolipoprotein E
Mass spectrometry
Isoelectric focusing
Immunoprecipitation
Immunofixation
Phenotype
Genotype
Alzheimer's disease

ABSTRACT

Background: Apolipoprotein E (Apo E) is a 36 Kda glycoprotein involved in lipid transport. It exists in 3 major isoforms: E2, E3 and E4. ApoE status is known to be a major risk factor for late-onset Alzheimer's and cardiovascular diseases. Genotyping is commonly used to obtain ApoE status but can show technical issues with ambiguous determinations. Phenotyping can be an alternative, not requiring genetic material. We evaluated the ability to accurately type ApoE isoforms by 2 phenotyping tests in comparison with genotyping.

Methods: Two phenotyping techniques were used: (1) LC-MS/MS detection of 4 ApoE specific peptides (6490 Agilent triple quadrupole): After its denaturation, serum was either reduced and alkylated, or only diluted, and then trypsin digested. Before analysis, desalting, evaporation and resuspension were performed. (2) Isoelectric focusing and immunoprecipitation: serum samples were neuraminidase digested, delipidated and electrophoresed on Hydragel ApoE (Sebia agarose gel) using Hydrasys 2 Scan instrument (Sebia, Lisses, France). ApoE isoforms bands were directly immunofixed in the gel using a polyclonal anti human ApoE antibody. Then, incubation of the gel with HRP secondary antibody followed by TTF1/TTF2 substrate allowed the visualization of ApoE bands. The results of the two techniques were compared to genotyping.

Results: Sera from 35 patients previously genotyped were analyzed with the 2 phenotyping techniques. 100% concordance between both phenotyping assays was obtained for the tested phenotypes (E2/E2, E2/E3, E2/E4, E3/E3, E3/E4, E4/E4). When compared to genotyping, 3 samples were discordant. After reanalyzing them by both phenotyping tests and DNA sequencing, 2/3 discrepancies were confirmed. Those can be explained by variants or rare ApoE alleles or by unidentified technical issues. 102 additional samples were then tested on LC-MS/MS only and compared to genotyping. The data showed 100% concordance.

Conclusion: Our 2 phenotyping methods represent a valuable alternative to genotyping. LC-MS/MS has the advantage of being fully specific, with identification of the different isoforms and can be considered as a reference method. Sebia isofocusing technique was concordant with LC-MS/MS. Plus, it is a rapid, semi-automated assay that can be easily implemented in clinical laboratories.

© 2015 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Human Apolipoprotein E (ApoE) is a 34 kDa glycoprotein that has two main polymorphic codons at position 112 and 158. Depending on

the amino acid substitutions, three isoforms ApoE2 (cys112, cys158), ApoE3 (cys112, arg158), and ApoE4 (arg112, arg158) are thus generated [1]. These substitutions modified both the structure (molecular weight, isoelectric point, conformation) and the functional properties of the protein. ApoE, which is expressed mainly in the liver and the brain [2] exists mainly as a component of lipoprotein complexes such as Intermediate-density lipoprotein (IDL) [3] and is involved in the transport/clearance of lipids like cholesterol among various tissues.

* Corresponding author.

E-mail address: s-lehmann@chu-montpellier.fr (S. Lehmann).

¹ These authors have equally contributed to this work.

ApoE is the ligand for binding to specific cell-surface receptors, including the LDL receptor family members and heparan sulfate proteoglycans (HSPGs). It has also been involved in many cellular processes including cytoskeletal assembly, mitochondrial function, and dendritic formation [4].

Importantly, the ApoE gene encoding the three above isoforms represents the major genetic risk factor of Alzheimer's disease (AD). While the Apo ϵ 2 allele is protective against AD, the presence of one ApoE4 allele is associated with 3 to 4 times risk increase for the disease, and the presence of two copies with a 10–14 times risk increase [5–8]. Its relationship with AD pathophysiology is primarily related with amyloid beta ($A\beta$) peptide metabolism. In fact, many in vitro and in vivo data suggest that ApoE interacts with $A\beta$ peptides, promotes its aggregation or transport (clearance) and is linked with an increased deposition in the brain of patients. $A\beta$ independent mechanism has been also proposed through for example the generation of toxic fragments, impacts on synaptic plasticity, neurite outgrowth or neuronal cytoskeleton and tau proteins [9]. The exact mechanism of ApoE involvement in AD pathogenesis is still the matter of debate. The determination of ApoE status is anyway valuable to estimate AD risk and to predict the safety and efficacy of new AD therapeutic approaches [4]. In addition, ApoE status is also associated with cardiovascular disease risk [10] and longevity in humans [11].

Historically, the determination of the ApoE status was performed using isoelectrofocusing (IEF) and immunoblotting of plasma or serum [12]. ApoE phenotyping is based on the charge differences and separation of common isoforms. ApoE4 has one more positive charge than apoE3, and apoE2 has one less, resulting in differences in their apparent pI values. However, charge alterations could result from post-translational modification such as physiological sialylation/desialylation and diabetes-induced glycation or oxidative modification such as imine adduct formation. Besides, thanks to high sensitive mass spectrometers, adapted measurement methods like Multiple Reaction Monitoring (MRM) and pre-fractionation approach, the quantitative detection of protein/peptide biomarkers in low concentrations is now feasible from complex biological fluid [13]. LC-MRM is considered as a method of choice for protein multiplexing [14]. The general principle is to follow selected specific ions (i.e. proteotypic peptides) and fragments arising from these ions known as "transition fragments". This method relies mainly on the use of triple quadrupole mass spectrometer analysers and is highly specific and reproducible [15]. We described here a novel LC-MRM ApoE blood typing method using stable isotope-labeled peptides. This method is based on the detection of four different tryptic peptides including the polymorphic sites of ApoE. The goal of our study was to develop and validate the ApoE phenotype obtained with these two novel (LC-MRM and semi-automatic isofocusing) methods in a cohort of human sera.

2. Material and methods

2.1. Chemicals used

Tris(hydroxymethyl)aminomethane (Tris) ref. ACRO140505000 (VWR, Fontenay-sous-Bois, France); 2,2,2 Trifluoroethanol (TFE) ref. 05841-50ML; DL-Dithiothreitol (DTT) ref. 43819-25G; Iodoacetamide (IAA) ref. I1149-25G (Sigma-Aldrich); Water ULC-MS, ref. 23214102, Formic Acid ULC-MS (FA) ref. 069141A8, Acetonitrile ULC-MS (ACN) ref.01204101, Methanol ULC-MS (MeOH) ref. 13684101 all from Biosolve (Dieuze, France); Protein LoBind tube 1.5 mL, ref. 022431081 Eppendorf (Le Pecq, France); Trypsin Gold, Mass Spectrometry Grade, ref. 5280 (Promega, Charbonnières-les-Bains, France); Polypropylene Vials (Agilent Technologies, ref. 9301-0978); Sep.-Pak tC18 1 cm³ Vac Cartridge, ref. WAT054960 (Waters, Guyancourt, France).

The following peptides were purchased from Eurogentec (Angers, France) with incorporated stable-isotope-labeled arginine

(R*, 13C615N4): LAVYQAGAR*, LGADMEDVVR*, LGADMEDVCGR* and CLAVYQAGAR*.

2.2. Collection and sampling patients

Blood samples originated from a sample collection of patients from Montpellier neurological and Clinical Research Memory Centers (CMRR) for cognitive or behavioral disorders (Biobank officially registered # DC-2008-417). All patients gave informed consent including for genetic determination. Blood samples were initially collected by venous puncture in PET BD Vacutainer® Tubes. After collection of the whole blood, the blood was allowed to clot by leaving it undisturbed at room temperature. Samples were then centrifuged at 2500 rpm at room temperature for 10 min. The resulting supernatant, designated as serum sample was aliquoted and then frozen at -80°C until assays were undertaken.

2.3. Sample preparation for IEF analysis

For isofocusing 20 μL of sera were digested with 5 μL of neuraminidase (5 $\mu\text{g}/\text{mL}$), for 1 h at 45°C . Samples treated with neuraminidase were delipidated using 25 μL of delipidation solution for 1 h at 45°C . Samples were vortexed and centrifuged at 5000 rpm for 5 min. The supernatant was kept and frozen at -80°C until IEF analysis.

2.4. IEF analysis

Pretreated samples (18 samples simultaneously per gel) were analyzed on Hydrasys 2 Scan instrument using a ready to use agarose gel (Hydragel 18 ApoE Isofocusing) containing carrier ampholytes chosen to have pIs which match the pIs of ApoE isoforms. Migration was carried out under 500 V until 300Vh has been accumulated and under 1000 V until 100 Vh has been accumulated (final 400 Vh), at 20°C controlled by Peltier effect (for about 45 min).

2.4.1. Immunofixation

ApoE isoform bands were directly immunofixed in the gel using a polyclonal anti human ApoE (Sebia PN 2115) for 10 min at 20°C controlled by Peltier effect. There is no need to transfer ApoE isoform bands from the gel to a membrane. After a cycle of wash, the gel was incubated for 10 min with a secondary antibody conjugated with horseradish peroxidase (SIGMA, PN A9452-1VL).

2.4.2. Visualization of protein bands

In order to visualize ApoE isoform bands, the gel was incubated for 10 min with specific Sebia substrate TTF1/TTF2 (Sebia, PN 2151) that is converted into a blue color with HRP. The total time for ApoE isoform analysis of 18 samples using Hydragel ApoE method was 2 h 15 min.

2.5. Sample preparation for LC-MRM analysis

After denaturation with 50% trifluoroethanol/20 mM Tris (1 h, 65°C), half of the samples were reduced using 5 mM DTT (1 h, 37°C) then alkylated using 20 mM Iodoacetamide, the other half were diluted with 10% trifluoroethanol. The samples were then digested using 2 μg of trypsin 3 h at 37°C . Before analysis, samples were desalted using SepPak, evaporated and resuspended in 20 μL of A phase (3% acetonitrile, 0.1% formic acid) containing heavy internal standard peptides of ApoE2, E3 and E4 isoforms. Peptides were detected using LC-MS/MS in MRM mode.

2.6. LC-MRM

2.6.1. Liquid chromatography (LC) separation

LC separation was carried out on a 1290 LC system (Agilent technologies) with a RRHD Eclipse Plus C18, 2.1 \times 150 mm, 1.8 μm (959759-

902, Agilent technologies) column maintained at 50 °C with a flow rate of 0.4 mL/min. A maximal pressure was set as 800 bar. The mobile phase was composed of H₂O/ACN/FA (phase A 97:3:0.1 v/v/v and phase B 10:90:0.1 v/v/v). A 25 min gradient was performed, starting with 3% of solvent B and a multistep gradient ramped to 90% in 17 min (2 min, 11% B; 15 min, 19% B; 16 min, 29% B; 16.5 min, 45% B; 17 min, 90% B). The column was washed for 2 min and re-equilibrated for 6 min with 97% solvent A.

2.6.2. MRM analysis

Mass spectrometric detection was performed using a 6490 triple quadrupole with an ESI source operating in positive mode and in MRM mode (Agilent Technologies, Waldbronn, Germany). The control of the LC-MS/MS was done with MassHunter Software (Agilent technologies, Waldbronn, Germany). The ESI spray was set-up according to the following specificities: capillary tension 3500 V, gas flow 15 L/min and at 150 °C, sheath gas flow 11 L/min and at 250 °C, nebulizer operated at 30 psi. Precursor ions were transferred inside the first quadrupole with ion funnel RF high pressure was set to 150 V and low pressure to 110 V. Collision energies (CE) and cell accelerator voltages (CA) were optimized as described in Table 1

2.6.3. MRM interpretation: phenotyping elucidation linked to peptide detection

In order to distinguish the 3 ApoE isoforms, we used a combination of 4 specific tryptic peptides (Fig. 2A). C[Alk]LAVYQAGAR for ApoE2, LGADMEDVC[Alk]GR for ApoE2 and E3, LAVYQAGAR for ApoE3 and E4 and LGADMEDVR for ApoE4. Raw data were loaded and interpreted using skyline 2.6 software (MacCoss Lab).

2.7. APOE – genotyping

DNA was extracted from blood leucocytes by a phase exchange method (Puregene, Gentra systems, Minneapolis, USA). Exon 4 of the APOE gene (RefSeqGene NG_007084.2, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>), was PCR-amplified as a single 229 bp amplicon with the following primers: “GGGCACGGCTGTCCAAGGA” (forward strand) “GCCCCGGCCTGTACAC” (reverse strand). PCR reactions (60 °C annealing temperature; 35 cycles) were carried-out on 100 ng of DNA, as previously described [16]. PCR products were purified before direct sequencing on forward and reverse strands, by the Big-Dye terminator cycle-sequencing protocol on a 48-capillary DNA sequencer (Applied Biosystems 3730 DNA Analyzer, Life Biotechnologies, France) as previously described [17]. For genetic variation detection, electronic DNA sequence tracks were read using Seqscape™ (Applied Biosystems). The Gensearch® software (Gensearch for Sanger v 4.2, Phenosystems, <http://www.phenosystems.com>) was used for genetic

variation detection, nomenclature checking and qualification against public genomic databases. Quality control analyses of APOE polymorphism (rs429358: c.388T>C (RefSeq NM_000041.2), p.C130R and rs7412: c.526C>T, p.R176C, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP/>), were performed by allele-specific hybridization of PCR products on nitrocellulose strips (InnoGenetics, Belgium). Analysis of samples representative of each genotype, provided 100% consistent results with those from Sanger sequencing.

3. Results and discussion

The primary objective of our study was to develop a simple and reliable LC-MRM method for plasma ApoE phenotyping and to compare its performances with those of the new Hydragel 18 ApoE Isofocusing method developed on the semi-automatic electrophoresis instrument, Hydrasys 2 (Fig. 1A, B). Few mass spectrometry based approaches were described for the quantitation of the level of the ApoE isoforms using high resolution mass spectrometry [18] or MRM mass spectrometry approaches [19,20].

In our study, we focused on the development of a LC-MRM method to distinguish the ApoE isoforms in plasma patient samples. As the tryptic digestion didn't generate proteotypic peptide of the 3 ApoE isoform, we designed a combination of peptides allowing the discrimination of the ApoE phenotype (Fig. 2A).

The interpretation scheme for the results obtained with LC-MRM analysis is shown in Fig. 2A. The peptides LGADMEDVC(cam)GR and LGADMEDVR included the polymorphic site 112. LGADMEDVR peptide are specific for the ApoE4 isoform, which is the only isoform with an arginine residue at this position. The ApoE2 and ApoE3 isoforms both have a cysteine residue at position 112. The other two peptides followed by LC-MRM – LAVYQAGAR and C(cam)LAVAQAGAR – represented the second polymorphic codon at position 158. C(cam)LAVAQAGAR is specific for ApoE2, being the only isoform with a cysteine residue at this position. ApoE3 and ApoE4 contain an arginine residue at position 158. Thus we added the combination of the 4 internal standards in the plasma samples. The whole material was then digested using trypsin enzyme 3 h at 37 °C before analysis by LC-MRM.

To create the MRM method, a full scan mass spectrum of each proteotypic standard was recorded in order to select parent ions for the LC-MRM measurements. The ions generating the most intense peaks were identified and hence they were chosen as precursor ions. Precursor ions were fragmented in Product Ion Scan (PIS) to observe the subsequent generated fragments (Table 1). Based on these results, the MRM method was optimized for the Collision Energy (CE) using the “peptide optimizer” software (Agilent Technologies). The CE was individually optimized for each transition, to obtain the most sensitive method. LC-MRM analysis gave up chromatograms which were

Table 1

MRM transitions for Apolipoprotein E isoforms with collision energy. Corresponding data for the labeled internal standard are given in brackets.

Endogenous peptide (heavy form)	m/z precursor ion	Charge state	MS1 resolution	m/z product ion	Charge state	Fragment	MS2 resolution	Collision energy [eV]
LGADMEDVR (LGADMEDVR*)	503.5 (508.5)	2+	Wide	835.4 (845.4)	1+	y7	Wide	8
			Wide	764.3 (774.4)	1+	y6	Wide	8
			Wide	649.3 (659.3)	1+	y5	Wide	8
			Wide	732.3	1+	b7	Wide	8
LAVYQAGAR (LAVYQAGAR*)	475 (480)	2+	Wide	764.4 (774.4)	1+	y7	Wide	12
			wide	665.3 (675.4)	1+	y6	Wide	12
			wide	502.3 (512.3)	1+	y5	Wide	16
			wide	835.4	1+	y8	Wide	9
LGADMEDVC(cam)GR (LGADMEDVC(cam)GR*)	612 (617)	2+	Wide	981.4 (991.4)	1+	y8	Wide	20
			Wide	866.4 (876.4)	1+	y7	Wide	22
			Wide	735.3 (745.3)	1+	y6	Wide	18
			Wide	764.4 (774.4)	1+	y7	Wide	17
C(cam)LAVYQAGAR (C(cam)LAVYQAGAR*)	555(560)	2+	Wide	665.3 (675.4)	1+	y6	Wide	18
			Wide	502.3 (512.3)	1+	y5	Wide	17
			Wide	835.4 (845.5)	1+	y8	Wide	18
			Wide	764.4 (774.4)	1+	y7	Wide	17

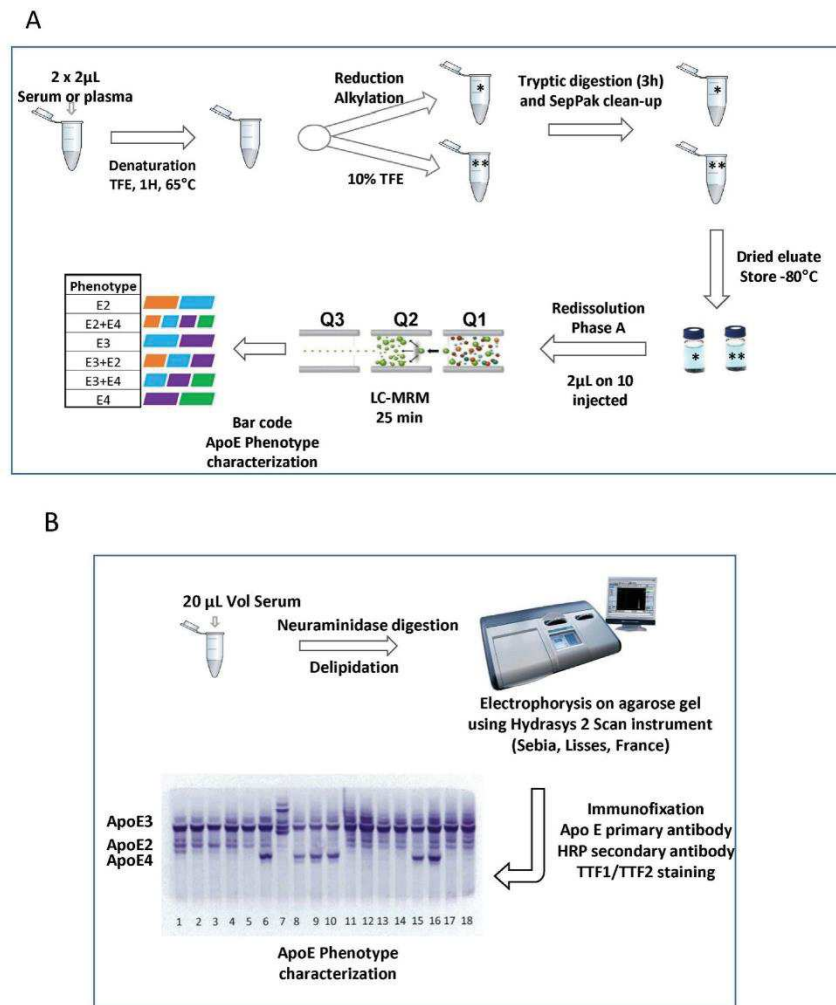


Fig. 1. A. Workflow for micro-LC-MRM detection of Apolipoprotein E isoforms in human sera samples. Serum or plasma samples were denatured and alkylated before tryptic digestion during 3 h at 37 °C. Samples were desalted before detection using LC-MS/MS in MRM mode. B. Workflow for isofocusing detection of Apolipoprotein E isoforms in human sera samples. Serum samples were digested neuraminidase, delipidated, vortexed and centrifuged before IEF analysis. ApoE Isoform bands were immunofixed in the gel and revealed using enzymatic horseradish peroxidase detection.

automatically processed using skyline 2.6 software (MacCoss Lab.). The automatic detection of the 4 specific MRM transitions was performed. Validation was performed following the strict co-elution of endogenous and labeled internal standard peptides (Fig. 2B).

The method was validated on a cohort of representative patient samples with known genotype: homozygous (E2/E2, E3/E3 and E4/E4) and heterozygous combination (E2/E3, E3/E4, and E2/E4). The LC-MRM typing results obtained on plasma samples for the six genotypes agreed for all subjects with no ambiguity. Thus, we validated our LC-MRM typing on a larger cohort of 150 patients with various genotypes. The repartition of the different genotypes was the following: 4.0% of E2/E2, 18.7% of E2/E3, 9.3% of E2/E4, 26% of E3/E3, 28% of E3/E4 and 9.3% of E4/E4. Results obtained showed 98% concordance between typing and genotyping, demonstrating the efficiency of our LC-MRM method. 3 samples were found to be discordant (Supp. Fig. S1).

After reanalyzing them by both phenotyping tests and DNA sequencing, 2/3 discrepancies were confirmed (Table 2A). Those can be explained by unidentified technical issues or by variants or rare

ApoE alleles [21] while none of these patients had hyperlipidemia (See Table 2B).

Several studies have already reported a wide range of discrepancies between phenotype and genotype assessment (0.2–24%) [22–28]. Above 20 rare apoE alleles have been detected using either phenotyping or genotyping [29]. Although LC-MRM phenotyping may detect most of these mutations, selection of specific PCR primers or direct sequencing would permit the detection of these DNA mutations with genetic approach.

3.1. Comparison of isofocusing and LC-MRM phenotyping

The Hydrigel 18 ApoE Isofocusing method from Sebia based on the use of isoelectric focusing followed by specific immunofixation of ApoE isoforms from plasma in the gel, provided an interesting tool to type patients. The semi-automated instrument allowed for simplifying many steps involved in traditional electrophoresis and immunofixation testing (relatively short migration time, direct immunofixation in the

A

Phenotype	Bar code	ApoE2	Apo E2 and E3	Apo E3 and E4	ApoE4
		C(cam)LAVYQAGAR	LGADMEDVC(cam)GR	LAVYQAGAR	LGADMEDVR
E2/E2		X	X		
E2/E4		X	X	X	X
E3/E3			X	X	
E3/E2		X	X	X	
E3/E4			X	X	X
E4/E4				X	X

B

LGADMEDVR E4	LAVYQAGAR E3 and E4	LGADMEDVC E3 and E2	CLAVYQAGAR E2	Phenotype	Genotype
				E4/E4	ε4/ε4
				E3/E4	ε3/ε4
				E2/E3	ε2/ε3
				E2/E4	ε2/ε4
				E2/E2	ε2/ε2
				E3/E3	ε3/ε3

Fig. 2. A. Apolipoprotein E phenotyping elucidation linked to peptide detection by LC-MRM. LGADMEDVR peptide is specific for the E4 isoform, LAVYQAGAR is specific for the E3 and E4 isoform, LGADMEDVC is specific for the E3 and E2 isoform and CLAVYQAGAR is specific for the E2 isoform. B. MRM chromatogram for the 4 Apolipoprotein E peptides (LGADMEDVR, LAVYQAGAR, LGADMEDVCGR and CLAVYQAGAR). Blue trace corresponds to the labeled internal standard signal and the red trace corresponds to the endogenous peptide. Strict co-elution of endogenous and labeled internal standard peptides correspond to the detection of the peptide. For interpretation of the references to color in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

Table 2A

Phenotype and genotype information concerning the three discrepancies between MRM/IEF and DNA sequencing.

Sample	IEF*	MRM*	Sequencing (Montpellier)**	Sequencing (Lille)**
Discrepancy 1	E3/E3	E3/E3	E3/E4***	E3/E4
Discrepancy 2	E3/E4	E3/E4	E3/E3	E3/E3
Discrepancy 3	E3/E3	E3/E3	E3/E4	E3/E3

* performed twice independently.

** PCR products were purified before direct sequencing on forward and reverse strands.

*** low Apo4 detection.

Table 2B

Characteristics of the subject investigated: clinical group, age, sex, phenotype.

Clinical group	Age	M/F	E2/E2	E2/E3	E3/E3	E3/E4	E4/E4	E4/E2	Total
Combined Hyperlipidemia	43 ± 21	83%	1	1	0	4	1	0	7
Hypercholesterolemia	48 ± 18	60%	0	6	0	8	9	2	25
Hypertriglyceridemia	50 ± 13	71%	5	15	1	8	3	7	39
Hypobetalipoproteinemia	27	100%	0	0	0	0	0	1	1
Alzheimer	71 ± 7	54%	0	4	24	16	4	2	50
Mild Cognitive Impairment	73 ± 7	46%	0	2	14	6	4	2	28
		Total	6	28	39	42	21	14	150

gel without transfer of proteins from the gel to a membrane). The Hydrasys 2 Scan system performed migration, incubation, staining, destaining, drying and scanning of the gel with high resolution image capture. 18 patient sera could then be processed simultaneously on a ready to use agarose gel. Interestingly, both methods worked with plasma containing EDTA or heparin as anticoagulant and with serum (data not shown).

35 samples from our cohort including the 3 discordant samples were phenotyped using the Sebia semi-automated isofocusing in order to compare the two techniques. As expected, the 3 discordant samples were found to have the same phenotype than LC-MRM but different from the genotype. Finally, the two methods allow for the use of small sample volume (2 to 20 μ L) and exhibited similar performances for ApoE phenotyping in a clinical context.

4. Conclusion

The use of phenotyping method could be applied to samples from subjects whose DNA is unavailable and/or who did not give their consent for genetic analysis. The two described phenotyping methods can represent a valuable alternative to genotyping especially to detect risk of coronary artery disease or Alzheimer's disease. These methods can use residual blood from samples collected for routine clinical tests, thus enabling retrospective studies with preserved body fluids. LC-MRM has the advantage of being fully specific and could be considered as a reference method. Sebia Hydragel 18 isofocusing technique is a rapid, semi-automated assay that can be easily implemented in clinical laboratories and was 100% concordant with LC-MRM.

Supplementary data to this article can be found online at <http://dx.doi.org/10.1016/j.cca.2015.12.020>.

Acknowledgments

This work was in part supported by the "Program Hospitalier de recherche Clinique" (PHRC) "ProMarA: Use of targeted quantitative proteomics and metabolic labeling with stable isotopes for the diagnosis and the investigation of neurological disorders and in particular Alzheimer Disease" (no. 8652). The authors thank the International Federation of Clinical Chemistry (IFCC) for supporting this work.

References

- [1] D.M. Holtzman, J. Herz, G. Bu, Apolipoprotein E and apolipoprotein E receptors: normal biology and roles in Alzheimer disease, *Cold Spring Harb. Perspect Med.* 2 (2012) a006312.
- [2] R.W. Mahley, Apolipoprotein E: cholesterol transport protein with expanding role in cell biology, *Science* 240 (1988) 622–630.
- [3] Y. Huang, R.W. Mahley, E. Apolipoprotein, Structure and function in lipid metabolism, neurobiology, and Alzheimer's diseases, *Neurobiol. Dis.* 72 (Pt A) (2014): 3–12.
- [4] C.W. Hsu, Y.J. Su, W.N. Chang, et al., The association between serological biomarkers and primary Sjogren's syndrome associated with peripheral polyneuropathy, *Biomed. Res. Int.* 2014 (2014) 902492.
- [5] A.M. Saunders, W.J. Strittmatter, D. Schmechel, et al., Association of apolipoprotein E allele epsilon 4 with late-onset familial and sporadic Alzheimer's disease, *Neurology* 43 (1993) 1467–1472.
- [6] H. Bickeboller, D. Campion, A. Brice, et al., Apolipoprotein E and Alzheimer disease: genotype-specific risks by age and sex, *Am. J. Hum. Genet.* 60 (1997) 439–446.
- [7] E. Genin, D. Hannequin, D. Wallon, et al., APOE and Alzheimer disease: a major gene with semi-dominant inheritance, *Mol. Psychiatry* 16 (2011) 903–907.
- [8] K. Morgen, L. Frolich, H. Tost, et al., APOE-dependent phenotypes in subjects with mild cognitive impairment converting to Alzheimer's disease, *J. Alzheimers Dis.* 37 (2013) 389–401.
- [9] R.W. Mahley, K.H. Weisgraber, Y. Huang, Apolipoprotein E4: a causative factor and therapeutic target in neuropathology, including Alzheimer's disease, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 103 (2006) 5644–5651.
- [10] A.M. Bennett, E. Di Angelantonio, Z. Ye, et al., Association of apolipoprotein E genotypes with lipid levels and coronary risk, *JAMA* 298 (2007) 1300–1311.
- [11] N. Garatachea, P.J. Marin, A. Santos-Lozano, F. Sanchis-Gomar, E. Emanuele, A. Lucia, The ApoE gene is related with exceptional longevity: a systematic review and meta-analysis, *Rejuvenation Res.* (2014).
- [12] D.A. Brouwer, J.J. van Doormaal, F.A. Muskiet, Clinical chemistry of common apolipoprotein E isoforms, *J. Chromatogr. B Biomed. Appl.* 678 (1996) 23–41.
- [13] C. Delaby, J. Vialaret, P. Bros, et al., Clinical measurement of Hepcidin-25 in human serum: is quantitative mass spectrometry up to the job? *EuPA Open Proteomics*, 3 2014, pp. 60–67.
- [14] D.J. Janecki, K.G. Bemis, T.J. Tegeler, et al., A multiple reaction monitoring method for absolute quantification of the human liver alcohol dehydrogenase ADH1C1 isoenzyme, *Anal. Biochem.* 369 (2007) 18–26.
- [15] S. Lehmann, A. Hoofnagle, D. Hochstrasser, et al., Quantitative clinical chemistry proteomics (qCCP) using mass spectrometry: general characteristics and application, *Clin. Chem. Lab. Med.* 51 (2013) 919–935.
- [16] S. Amselem, D. Briffaut, A. Carrie, et al., Intronic mutations outside of Alu-repeat-rich domains of the LDL receptor gene are a cause of familial hypercholesterolemia, *Hum. Genet.* 111 (2002) 501–510.
- [17] N. Leveziel, E.H. Souied, F. Richard, et al., PLEKHA1-LOC387715-HTRA1 polymorphisms and exudative age-related macular degeneration in the French population, *Mol. Vis.* 13 (2007) 2153–2159.
- [18] M. Nishimura, M. Satoh, S. Nishimura, et al., Human apolipoprotein E resequencing by proteomic analysis and its application to serotyping, *PLoS ONE* 9 (2014) e85356.
- [19] R. Simon, M. Girod, C. Fonbonne, et al., Total ApoE and ApoE4 isoform assays in an Alzheimer's disease case-control study by targeted mass spectrometry (n = 669): a pilot assay for methionine-containing proteotypic peptides, *Mol. Cell. Proteomics MCP* 11 (2012) 1389–1403.
- [20] K.R. Wildsmith, B. Han, R.J. Bateman, Method for the simultaneous quantitation of apolipoprotein E isoforms using tandem mass spectrometry, *Anal. Biochem.* 395 (2009) 116–118.
- [21] C. Lahoz, D. Osgood, P.W. Wilson, E.J. Schaefer, J.M. Ordovas, Frequency of phenotype-genotype discrepancies at the apolipoprotein E locus in a large population study, *Clin. Chem.* 42 (1996) 1817–1823.
- [22] A. Stavljenic-Rukavina, J. Sertic, B. Salzer, et al., Apolipoprotein E phenotypes and genotypes as determined by polymerase chain reaction using allele-specific oligonucleotide probes and the amplification refractory mutation system in children with insulin-dependent diabetes mellitus, *Clin. Chim. Acta Int. J. Clin. Chem.* 216 (1993) 191–198.
- [23] K. Kontula, K. Aalto-Setälä, T. Kuusi, L. Hamalainen, A.C. Syvanen, Apolipoprotein E polymorphism determined by restriction enzyme analysis of DNA amplified by polymerase chain reaction: convenient alternative to phenotyping by isoelectric focusing, *Clin. Chem.* 36 (1990) 2087–2092.
- [24] C. Snowden, R.S. Houlston, M.H. Arif, M.F. Laker, S.E. Humphries, K.G. Alberti, Disparity between apolipoprotein E phenotypes and genotypes (as determined by polymerase chain reaction and oligonucleotide probes) in patients with non-insulin-dependent diabetes mellitus, *Clin. Chim. Acta Int. J. Clin. Chem.* 196 (1991) 49–57.
- [25] P.R. Wenham, A. Sedky, R.J. Spooner, Apolipoprotein E phenotyping: a word of caution, *Ann. Clin. Biochem.* 28 (Pt 6) (1991) 599–605.
- [26] F. Mailly, P. Moll, B.A. Kottke, M.I. Kamboh, S.E. Humphries, R.E. Ferrell, Estimation of the frequency of isoform-genotype discrepancies at the apolipoprotein E locus in heterozygotes for the isoforms, *Genet. Epidemiol.* 9 (1992) 239–248.
- [27] K. Tsukamoto, T. Watanabe, T. Matsushima, et al., Determination by PCR-RFLP of apo E genotype in a Japanese population, *J. Lab. Clin. Med.* 121 (1993) 598–602.
- [28] M.Y. Tsai, P. Suess, K. Schwichtenberg, et al., Determination of apolipoprotein E genotypes by single-strand conformational polymorphism, *Clin. Chem.* 39 (1993) 2121–2124.
- [29] M.K. Bolla, L. Haddad, S.E. Humphries, A.F. Winder, I.N. Day, High-throughput method for determination of apolipoprotein E genotypes with use of restriction digestion analysis by microplate array diagonal gel electrophoresis, *Clin. Chem.* 41 (1995) 1599–1604.

3.3 Conclusions et nouveaux éléments

Au cours de ce travail, nous avons pu mettre en place une méthode de spectrométrie de masse permettant de phénotyper l'apolipoprotéine E à partir de 4 µL de sérum. Ce phénotypage est capital pour mettre en place une prévention adaptée dans le cadre des maladies cardiovasculaires ou neurologiques.

La méthode décrite dans la publication sur lequel s'appuie le chapitre 2 a subi des améliorations depuis sa sortie en 2016 dans le but de proposer une analyse clinique la plus proche possible d'une utilisation routinière.

La spectrométrie de masse est une méthode d'analyse rapide qui permet un multiplexage élevé. Dans la première version de nos travaux, pour des raisons de sensibilité, un échantillon était analysé en deux fois sur des analyses de 25 minutes. La première analyse permettait d'analyser les peptides après réduction/alkylation des cystéines (C[CAM]LAVYQAGAR ; LGADMEDVC[CAM]GR), et la deuxième permettait d'analyser les deux autres peptides sans réduction/alkylation des cystéines (LAVYQAGAR ; LGADMEDVR). De plus, la préparation d'échantillons était réalisée en tubes ce qui augmente le risque d'erreur lors des pipetages et diminue le débit d'analyse.

Aujourd'hui un protocole automatisé unique, avec réduction/alkylation des cystéines, est réalisé sur un automate de préparation (AssayMap Bravo, Agilent T.) en plaque 96 puits, et est suivi d'une analyse en 14 minutes (Figure 44). La simplification de la préparation d'échantillon et de l'analyse ont été réalisées grâce à des triples quadripôles plus sensibles (8060, Shimadzu).

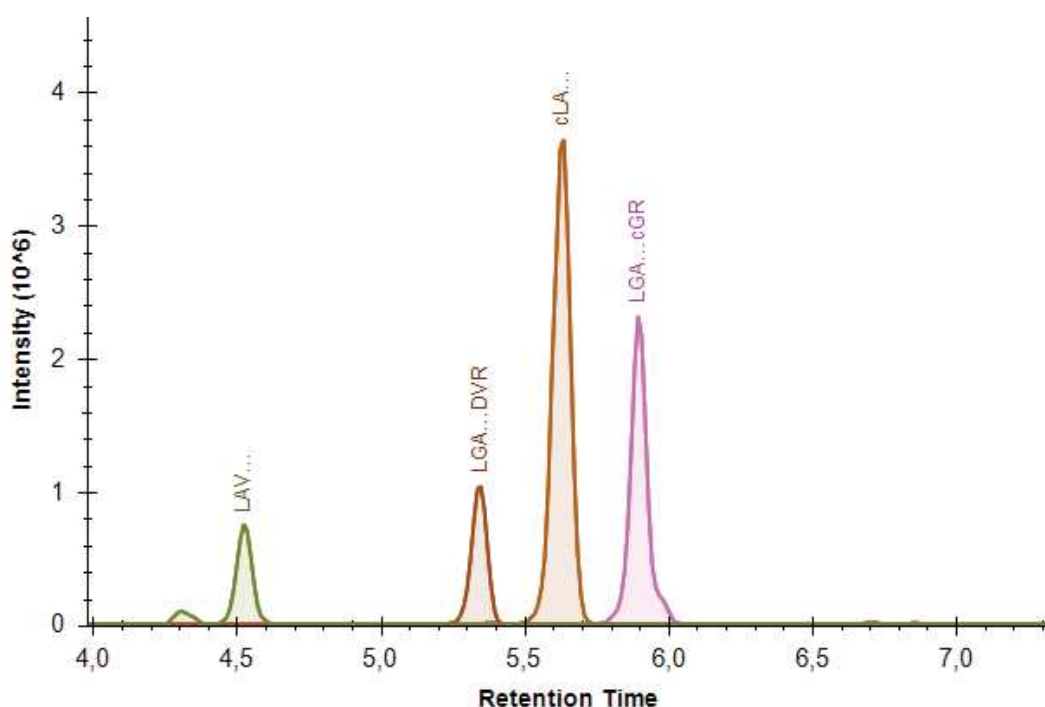


Figure 44: Chromatogramme LC-MRM d'une analyse ApoE. Les 4 peptides analysés éluent dans l'ordre suivant : LAV ... (LAVYQAGAR), LGA ...DVR (LGADMEDVR), cLA (C[CAM]LAVYQAGAR), LGA...cGR (LGADMEDVC[CAM]GR).

Les peptides après séchage sont re-solubilisés directement dans la plaque 96 puits avant injection LC-MS (Figure 45). C'est la seule étape manuelle du protocole de préparation

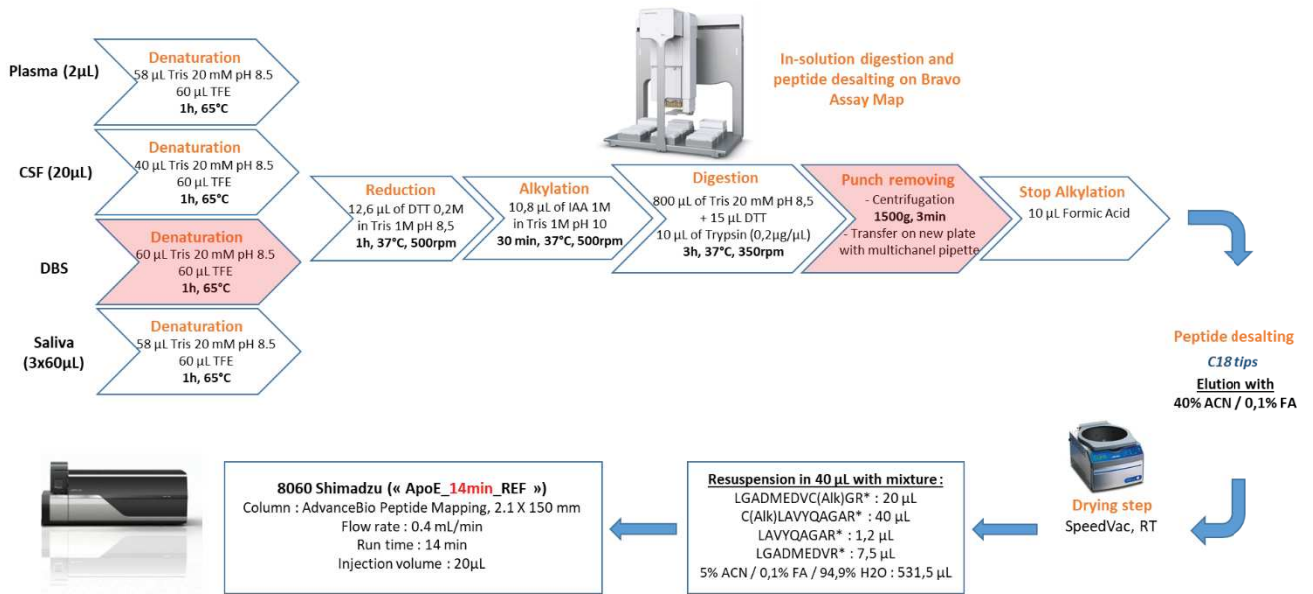


Figure 45: Protocole optimisé pour une utilisation routinière au LBPC.

Tous ces points qui sont des détails pratiques ont permis de passer d'une méthode analytique validée selon les guides de validation, à une méthode utilisable en routine. Le coût environnementé au CHU de Montpellier de cette méthode optimisée est de 20,7 euros par point.

Ce protocole utilisé maintenant au CHU de Montpellier a été appliqué sur des programmes de recherche clinique entre 2014 et 2018 sur 175 séra, 96 plasmas, 237 DBS (Dried Blood Spot ou dépôt de sang séché), 55 LCR et 40 salives.

4 Chapitre 3 : la quantification absolue de l'hepcidine dans le cadre des pathologies liées au métabolisme du fer

L'hepcidine est une petite protéine qui va être dosée avec une approche top-down.

4.1 Présentation du biomarqueur « Hepcidine »

Le dosage de l'hepcidine est étudié et utilisé au laboratoire depuis de nombreuses années avec 8 publications sur le sujet entre 2014 et 2018. La partie d'introduction sur ce biomarqueur va se baser sur une revue réalisée dans les Annales de Biologie Clinique en 2018 :

Hepcidin: immunoanalytic characteristics. Wolff F., de Verneuil H., Rucheton B., Lefebvre T., **Vialaret J.**, Ropert-Bouchet M., Cunat S., Aguilar-Martinez P., Lehmann S., Delaby C. ; Ann Biol Clin (Paris). 2018 Dec 1.

L'hepcidine est un peptide circulant de 25 aminoacides. L'hepcidine sera donc appelée dans ce manuscrit hep-25 pour ne pas confondre avec d'autres isoformes qui peuvent être présentes. Il s'agit des formes à 24, 22, et 20 aminoacides qui peuvent co-exister (Figure 46) [263]. Ce sont des produits de dégradation de l'hep-25 avec un clivage de la partie N-terminal de cette protéine [264].

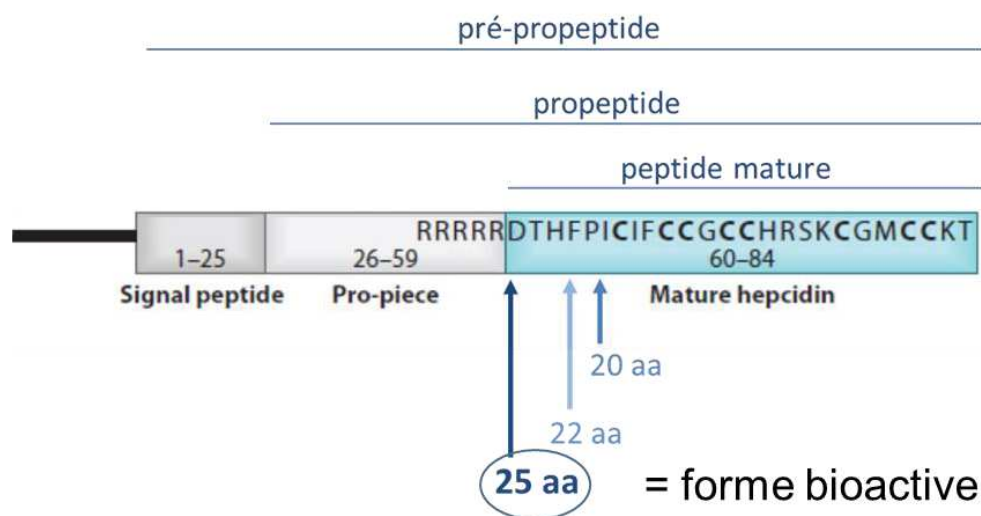


Figure 46: Différentes formes d'hepcidine [263].

La structure de cette protéine comprend 8 cystéines impliquées dans 4 ponts disulfures ce qui lui confère une structure très compacte et par conséquent une faible immunogénicité (Figure 47).

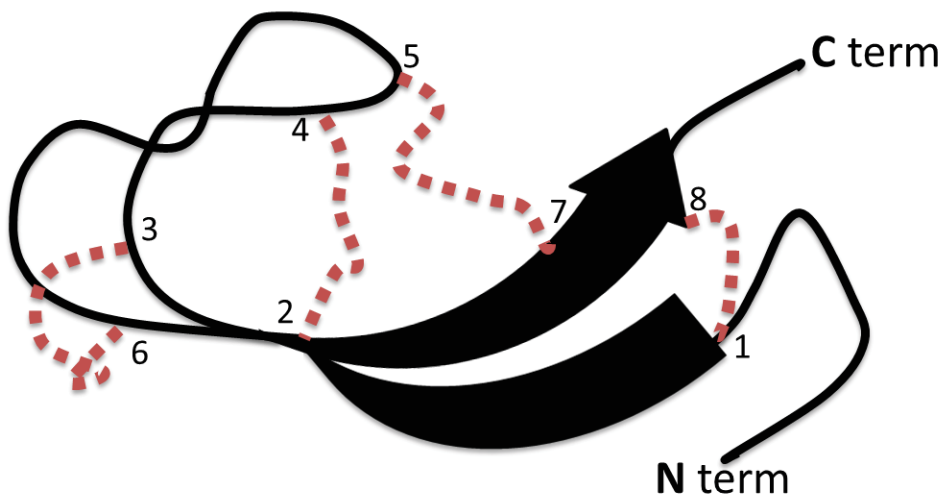


Figure 47: Structure tridimensionnelle de l'hepcidine 25

Les approches basées sur la spectrométrie de masse permettent de s'affranchir de ce problème et de discriminer sans difficulté les 4 isoformes de l'hepcidine.

L'hep-25 est la forme bioactive impliquée comme un acteur majeur du métabolisme du fer. C'est donc cette forme qui est quantifiée par les différentes méthodes analytiques même si un panel d'isoformes est éventuellement réalisable grâce à la spectrométrie de masse.

L'hepcidine est produite à partir du gène (HAMP) situé sur le chromosome 19. Le prépropeptide est composé de 84 acides aminés qui est mûri deux fois pour donner l'hep-25. Même si plusieurs sites d'expression ont pu être identifiés [265], l'hepcidine est principalement exprimée au niveau du foie [266] avant de circuler dans le sang. Cette molécule circule majoritairement à l'état libre mais elle peut aussi former des complexes avec l'albumine ou l'alpha-2-macroglobuline [267].

L'hepcidine régule l'absorption intestinale du fer, et son recyclage au niveau des macrophages. La partie N-terminale est capitale pour l'interaction avec son récepteur cellulaire, la ferroportine, qui permet l'export de fer des cellules. Ce mécanisme permet d'expliquer pourquoi l'hep-25 est la forme bioactive ce qui n'est pas le cas des formes plus courtes [268].

L'hep-25 est impliqué dans de nombreuses pathologies liées à un déséquilibre du métabolisme du fer : anémie, inflammation chronique, maladies des reins, cancer [269].

En raison des problèmes d'immunogénécité de l'hep-25, et de la spécificité nécessaire entre les différentes isoformes, les techniques basées sur la spectrométrie de masse ont largement été appliquées. Différentes méthodes de pré-fractionnement ont été publiées comme compatibles avec une analyse de l'hep-25 : précipitation des protéines [270], ultrafiltration [271], échange de cations [272], séparation sur phase inverse [273]. Ces pré-fractionnements sont couplés à différents modes de détection tels que le SELDI, le MALDI [274], ou la LC-MS [263, 270-273, 275-279].

Un premier essai multi-centrique publié par Kroot *et al.* en 2009 a montré des concentrations d'hep-25 très différentes suivant les techniques utilisées [280]. Le choix du standard qui n'était

pas homogène a alors été soulevé. L'hep-25 isotopiquement marqué, mais avec un delta de masse de 16Da qui peut correspondre à l'oxydation de la méthionine, est aujourd'hui recommandé.

Grâce à la sensibilité de ces méthodes analytiques, l'hep-25 a pu être dosé dans différents fluides biologiques comme le sérum [270], l'urine [279], le sang total [281], le DBS [282], et même dans le liquide céphalo-rachidien [277].

4.2 Résultats obtenus sur le dosage de l'hepcidine 25

4.2.1 Introduction

Dans l'article suivant que nous avons publié dans Journal of Chromatography B, nous avons dosé l'hep-25 à partir de 50 µL de sérum. Pour cela, le standard marqué d'hep-25 (DTHFPICIFCCGCHRSKCGMCCCKT [¹³C₆,¹⁵N₄] Arg16) est rajouté directement dans le sérum. Pour cette étude, 24 échantillons de patients ont été sélectionnés car leur concentration d'hep-25 permettait d'avoir une bonne distribution sur la gamme clinique.

L'échantillon est simplifié par une étape de précipitation des protéines en condition acide. Après centrifugation, le surnageant est concentré et injecté sur deux systèmes LC différents couplé à un unique triple quadripôle. Le but de cet article est de comparer les performances analytiques du dosage de l'hepcidine en utilisant deux colonnes chromatographiques de diamètres internes de 0,075mm et 1mm.

Il s'agit d'une approche top-down permettant une quantification directe d'une protéoforme spécifique d'hepcidine (1-25) avec un protocole simple en une seule étape.

Cette approche avec cette préparation d'échantillon, et l'analyse LC-MS sur une colonne de 0,075mm de diamètre interne a précédemment été publiée :

Clinical measurement of Heparin-25 in human serum: Is quantitative mass spectrometry up to the job?; Constance Delaby, Jérôme Vialaret, *et al.* ; EuPA Open Proteomics ; Volume 3, June 2014, Pages 60-67

Un dosage de sérum de 30 patients a été réalisé avec la méthode masse développée et le premier dosage ELISA développé par le groupe de Ganz [283] et une p-value inférieure à 0,001 est obtenus sur le coefficient de corrélation de Pearson. (Figure 48).

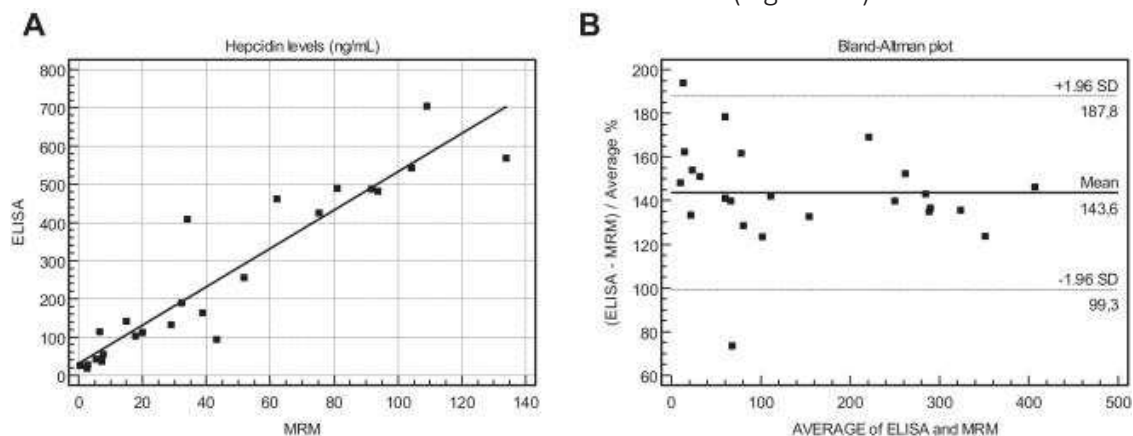


Figure 48: Comparaison des résultats de dosages obtenus par LC-MRM et par ELISA. A: comparaison directe des valeurs de concentration. B: Représentation Bland-Altman pour comparer les concentrations obtenues dans les deux méthodes.

Cependant il y a un facteur 5 entre les valeurs de concentration trouvées en ELISA et en MS. Ce facteur est probablement dû à la spécificité de chaque méthode (capacité ou non à discriminer la forme 25 des autres isoformes). Le dosage ELISA de Ganz est basé sur un anticorps polyclonal qui peut difficilement différencier les différents isoformes d'hepcidine. La deuxième hypothèse est que les étalons utilisés entre les deux approches ne sont pas les mêmes.

4.2.2 Article Scientifique



Nano-flow vs standard-flow: Which is the more suitable LC/MS method for quantifying hepcidin-25 in human serum in routine clinical settings?

Jérôme Vialaret¹, Alexia Picas¹, Constance Delaby, Pauline Bros, Sylvain Lehmann, Christophe Hirtz*

University of Montpellier, CHU Montpellier, IRMB, LBPC, Montpellier F-34000, France

ARTICLE INFO

Keywords:

Hepcidin
Iron deficiency
Mass spectrometry
Nano LC
Standard LC

ABSTRACT

Hepcidin-25 peptide is a biomarker which is known to have considerable clinical potential for diagnosing iron-related diseases. Developing analytical methods for the absolute quantification of hepcidin is still a real challenge, however, due to the sensitivity, specificity and reproducibility issues involved. In this study, we compare and discuss two MS-based assays for quantifying hepcidin, which differ only in terms of the type of liquid chromatography (nano LC/MS versus standard LC/MS) involved. The same sample preparation, the same internal standards and the same MS analyzer were used with both approaches. In the field of proteomics, nano LC chromatography is generally known to be more sensitive and less robust than standard LC methods. In this study, we established that the performances of the standard LC method are equivalent to those of our previously developed nano LC method. Although the analytical performances were very similar in both cases. The standard-flow platform therefore provides the more suitable alternative for accurately determining hepcidin in clinical settings.

1. Introduction

Hepcidin is a 25-amino acid (AA) cystein-rich peptide involved in iron metabolism, which regulates both intestinal iron absorption and macrophage iron recycling processes. The clinical applications involving hepcidin focus on iron-overload diseases and anemia, chronic inflammation, cancer and renal disease [1,2]. The three isoforms of hepcidin peptide which have been described so far in the literature (the 20, 22 and 24-AA peptide isoforms [3]) probably result from the degradation of hepcidin-25, but their pathological relevance has not yet been completely elucidated. Since hepcidin was first characterized in 2001 [4–6], several approaches have been developed for its detection and quantification [7–9]: radio-immuno assays (RIA) [10], enzyme-linked immunosorbent assays (ELISA) [11], and recently, mass spectrometry analysis [12–14]. In 2009, an international round robin for the quantification of urinary and plasma hepcidin was organized, at which it was proposed to evaluate the levels and the analytical variations between hepcidin assays with a view to increasing the comparability of data on hepcidin between clinical studies [7,8]. Two combined mass

spectrometry methods have been previously presented for the absolute LC-MS/MS quantification of hepcidin: the nano LC/MS [15,16] standard LC/MS methods [17–19].

The aim of the present study was to compare the currently used nano LC/MS injection method operating at a flow rate of 0.6 $\mu\text{L}/\text{min}$ with our new standard LC/MS injection method operating at a flow rate of 100 $\mu\text{L}/\text{min}$ in order to determine the most suitable method for routine clinical quantification purposes.

2. Material and methods

2.1. Reagents & chemicals

TrichloroAcetic Acid (TCA) was purchased from Sigma-Aldrich. All HPLC-grade organic solvents (Water ULC-MS, Formic Acid ULC-MS, and Acetonitrile ULC-MS) were obtained from Biosolve (Dieuze, France). Normal Goat serum was purchased from Clinisciences (Nanterre, France). 1.5-mL protein LoBind tubes were obtained from Eppendorf (Le Pecq, France). Glass vial inserts were purchased from

Abbreviations: AA, amino acid; ACN, acetonitrile; AJS, Agilent Jet Stream; BSA, bovine serum albumin; CE, collision energy; CV, coefficient of variation; ELISA, Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay; ESI, ElectroSpray Ionization; FA, formic acid; FWHM, Full Width at Half Maximum; HPLC, high performance liquid chromatography; HSA, human serum albumin; ID, internal diameter; LC, liquid chromatography; LOD, limit of detection; LOQ, Limit of Quantification; MRM, multiple reaction monitoring; MS, mass spectrometry; QC, quality control; RIA, radio-immuno assay; RSD, relative standard deviation; RT, room temperature; SPE, solid phase extraction; TCA, trichloroacetic acid; TDM, therapeutic drug monitoring

* Corresponding author.

E-mail address: c-hirtz@chu-montpellier.fr (C. Hirtz).

¹ Authors have contributed equally to this work.

<https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2018.04.003>

Received 28 November 2017; Received in revised form 4 April 2018; Accepted 5 April 2018

Available online 10 April 2018

1570-0232/ © 2018 Elsevier B.V. All rights reserved.

Agilent Technologies (Santa Clara, USA). Zorbax 300 SB-C18 1 × 150 mm 3.5- μ m column, ProtID-Chip-43 II, HSA Peptides Standard Mix G2455-85001 and Trypsin Digest Methylated BSA Standard G1990-85001 were purchased from Agilent Technologies (Santa Clara, USA).

2.2. Hepcidin-25 standards

Human hepcidin-25 standard (DTHFPICIFCCGCCCHRSKCGMCCCKT) and isotopically-labeled hepcidin-25 (DTHFPICIFCCGCCCHR*SKCGMCCCKT) [$^{13}\text{C}_6$, $^{15}\text{N}_4$] Arg with a purity > 97% as assessed by LC-MS/MS were purchased from Eurogentec (Seraing, Belgium). Standards were synthesized with folding (including four disulfide bridges, namely Cys 7–23; 10–13; 11–19; and 14–22), as in the endogenous human hepcidin-25. Lyophilized standards were resuspended at a concentration of 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ with $\text{H}_2\text{O}/\text{ACN}/\text{FA}$ (66.2: 33.8: 0.1, v/v/v). The standard solutions were then aliquoted into 20 μL fractions in LoBind tubes and stored at -80°C until use. Appropriate dilutions of 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ hepcidin stock solutions (0.125, 1.25, 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$) were prepared with $\text{H}_2\text{O}/\text{ACN}/\text{FA}$ (79:20:1 v/v/v) in order to draw up calibration curves using a model matrix (normal goat serum) in the 0 to 200 ng/mL (0, 5, 10, 20, 50, 100, 200 ng/mL) concentration range. Internal standard was spiked into the model matrix and into the biological sample at a final concentration of 100 ng/mL (Fig. 1).

2.3. Human serum samples

Since hepcidin is already officially recognized as a clinical analyte in France, it can be quantified using either mass spectrometry or validated competitive C-ELISA [20] methods without any specific ethical authorization. The serum samples included in this study originated from a biobank (officially registered under the number # DC-2008-417), and all the patients gave their informed consent to having their sample used for any research projects conducted with the agreement of the local ethics committee. Twenty-four patients (20 men and 4 women) with a mean age of 57.2 years and a mean weight of 77.9 kg were recruited to participate in this study.

2.4. Hepcidin-25 extraction procedure

All the experiments were performed at 4°C , as shown in the detailed workflow diagram (Fig. 1). Two microliters of internal hepcidin standard solution were added to 50 μL of serum sample in a 1.5-mL LoBind tube, vortexed for 10 s, and a 4% TCA solution was added in a 1:1 ratio. Samples were then vortexed for a few seconds and centrifuged at 17,000g for 5 min in order to obtain a clear supernatant. The supernatant was transferred to a new LoBind tube and stored overnight at -20°C . Samples were thawed on ice and a further centrifugation step was performed at 17,000g for 5 min. Supernatant was transferred to a new LoBind tube and dried in a vacuum concentrator (Labconco, Kansas city, USA). Samples were resuspended with 10 μL of $\text{H}_2\text{O}/\text{ACN}/\text{FA}$ (79.9:20:0.1 v/v/v), vortexed at 1000 rpm for 10 min, and centrifuged for 3 min at 17,000g at RT before being transferred into glass

vial inserts. Samples were all prepared in duplicate. Calibration standards were prepared using the same extraction procedure as with the biological samples.

2.5. Development of the MRM method

2.5.1. LC separation procedures

- Nano LC experiments were carried out on a 1260 nano-LC system (Agilent Technologies) combined with a HPLC-chip cube MS interface (Agilent Technologies). Peptides were loaded onto a ProtID-Chip-43 analyzer (Agilent Technologies) comprising a 43 mm × 75 μm analytical column and a 40 nL trap-column packed with Zorbax 300A 5 μm C18. The mobile phase was composed of $\text{H}_2\text{O}/\text{ACN}/\text{FA}$ (phase A, 97:3:0.1 v/v/v and phase B, 10:90:0.1 v/v/v). Four microliters of the sample were loaded into the trapping column at a flow rate of 2.5 $\mu\text{L}/\text{min}$, with the capillary pump delivering an isocratic enrichment phase composed of 15% B. Seven microliters of flush volume were used to clear the trapping column of un-retained compounds. Trapped molecules were then separated on the analytical column using the nanopump at a flow rate of 0.6 $\mu\text{L}/\text{min}$. A 9-min gradient was performed, starting with 3% of solvent B and increasing linearly to 100% within 7 min. The column was washed for 2 min and re-equilibrated for 1 min with 97% solvent A.
- Standard LC experiments were performed on a 1290 standard LC system equipped with a 300 SB-C18 reverse-phase Zorbax column (1.0 × 150 mm, 3.5 μm) maintained at 60°C . The mobile phases used were equivalent to those used in the nano LC separation procedure. Seven- μL samples were separated on a linear gradient ranging from 15% to 100% solvent B and run for 5 min at a flow rate of 100 $\mu\text{L}/\text{min}$. The column was then washed for 1 min with 100% solvent B and re-equilibrated for 3 min with 15% solvent B.

2.5.2. Mass spectrometry analysis

Mass spectrometry detection was performed using the 6490 Triple Quadrupole mass spectrometer (Agilent technologies, Waldbronn, Germany) operating in the positive mode and the MRM mode. The LC-MS/MS data were monitored with MassHunter Software (Agilent technologies, Waldbronn, Germany). The standard LC-ESI source used was the Agilent Jet Stream (AJS). The ESI was set up using the following settings: capillary tension 3000 V, gas flow rate 14 L/min at a temperature of 200°C , sheath gas flow rate 11 L/min at a temperature of 250°C , and a 20-psi nebulizer gas flow pressure.

The nano LC-ESI source used was Agilent Chipcube. The ESI spray was set as follows: capillary voltage 1700–2100 V, nebulization gas flow rate 11 L/min, temperature 150°C .

Precursor ions were selected on the basis of their abundance when standard peptide was injected in the Full-Scan mode (see Supplementary data 1). The precursor ions targeted were 559.4 m/z ($z = 5$) in the case of the endogenous hepcidin and 560.6 m/z ($z = 5$) in that of the heavy standard. Hepcidin charge states of 4^+ and 5^+ were

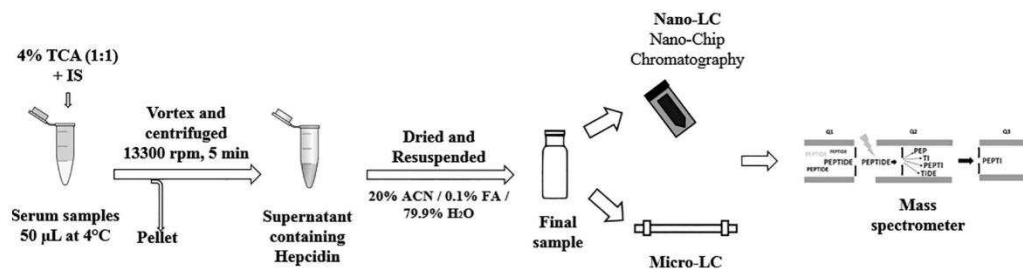


Fig. 1. Experimental hepcidin quantitation procedure: from protein precipitation in serum to LC/MS analysis.

found to be the two most intense ions using our LC/MS configuration. These two charge states were widely detected and used for hepcidin quantification in many previous works [3,16,18,21–23]. We selected charge state of 5⁺ for the final MRM method. Precursor ions were transferred to the MS (first quadrupole) with a fragmentor voltage of 380 V, a Cell Accelerator Voltage of 4 V, a high pressure ion funnel RF set at 180 V and a low pressure ion funnel RF set at 80 V.

The MRM mode was run with a Dwell time of 40 ms in a wide resolution setup (1.2 Da) on the quadrupoles (MS1 and MS2). The optimized MRM method was performed with both light and heavy hepcidin standards. Collision energies (CE) were optimized and optimum values were listed in Table 2.

MassHunter Quantitative Analysis Software (Agilent Technologies) was used to process the data. All transitions per peptide were automatically detected in specific retention time windows.

2.5.3. MS quality control (QC)

HSA Peptides Standard Mix provided by Agilent Technologies was resuspended with 15% ACN/85% Water/0.1% Formic Acid at 10 pmol/ μ L (HSA Stock solution).

BSA standard Tryptic digest was resuspended at 1 pmol/ μ L (BSA Stock solution) by adding 15% ACN/85% Water/0.1% Formic Acid. BSA Stock solution was diluted with the same solvent at 10 fmol/ μ L to obtain the “BSA Dilution Solution”.

HSA Stock solution was diluted using BSA Dilution Solution to obtain a solution with a concentration of 1 fmol/ μ L. One microliter was injected into the nano LC or standard LC/MS.

MS analysis was performed using the MRM mode by monitoring the transitions of the peptide LVNEVTEFAK (575.5 \rightarrow 937.5; 575.5 \rightarrow 823.4; 575.5 \rightarrow 694.4).

2.6. Data processing and statistics

Data processing was performed with the MassHunter Quantitative Analysis Software (Agilent technologies). All the replicate results used to draw up the calibration curves were loaded into the software database. An automatic quantification method was used to process the data in order to obtain the equation curve giving the best fit with the experimental points. The two transitions 559.4 \rightarrow 694.8 (light hepcidin) and 560.6 \rightarrow 696.8 (heavy hepcidin) were used as quantifiers and automatically detected in specific retention time windows. The transitions selected had to be highly specific and to include no cross-contamination between light and heavy hepcidin standards during the MS experiments (see Supplementary data 2). Other transitions were used as qualifiers.

2.7. Calculating the cost of LC-MS hepcidin analysis

The cost of hepcidin analysis was calculated with nano LC/MS vs standard LC/MS. Costs of the hepcidin standard, the sample preparation, the system and LC-MS/MS consumables (including analytical columns) were taken into account in the calculations.

2.8. Validation of the method

2.8.1. Linearity

The calibration curve was established by performing linear regression analysis, and validated based on the criterion of a Pearson correlation $r^2 > 0.99$. Calibration standards were prepared by adding a variable amount of hepcidin-25 (0; 5; 10; 20; 50; 100; 200 ng/mL) and a fixed amount of labeled hepcidin-25 (100 ng/mL). Linearity was assessed across 7-point calibration standards ranging from 0 to 200 ng/mL. For this purpose, appropriate dilutions of 200 μ g/mL hepcidin-25 stock solutions (0.125 and 1.25 ng/ μ L) were prepared with H₂O/ACN/FA (80:20:0.1, v/v/v). The labeled hepcidin-25 was spiked into normal goat serum used as surrogate matrix at a final concentration of 100 ng/mL.

2.8.2. Limit of Quantification (LOQ)

The Limit of Quantification (LOQ) was defined as the concentration of the lowest calibration point with a hepcidin-25/labeled hepcidin-25 RSD ratio $> 20\%$.

2.8.3. Precision

The intermediate precision of the entire protocol was determined by preparing two calibration points, one at 50 ng/mL and the other at 200 ng/mL. These points were measured on 4 different days.

The repeatability of the LC/MS data was tested on 6 calibration standards by injecting the same sample 4 times in a row. RSD was calculated using the LC/MS hepcidin-25/labeled hepcidin-25 area ratio.

2.8.4. Selectivity and carry-over

The selectivity of the method was determined by comparing blank serum samples spiked with the hepcidin-25 standard. MRM chromatograms obtained with the blank samples were analyzed to detect any interferences in the retention time window of the hepcidin-25 standard.

Carry-over was assessed by analyzing blank samples directly before and after the LC-MRM runs with the highest calibration standards (200 ng/mL).

3. Results and discussion

In the present study, an analytical comparison was made between standard LC vs nano LC for quantifying hepcidin in clinical settings. For this purpose, 24 human serum samples were prepared and analyzed using the same MRM method with both LC configurations (Fig. 1). The labeled hepcidin used as the internal standard showed identical physicochemical properties (retention time, fragmentation) to those of endogenous hepcidin. Endogenous hepcidin and SIS showed the same behavior during the preparation and the chromatographic process, while the mass difference of 10 amu attributable to the heavy AA in the internal standard made it possible to detect each compound separately.

To prepare the samples, a simple protein precipitation step was performed upstream of the mass spectrometry analysis. It was previously established that TCA precipitation was suitable for peptides/proteins with a molecular weight of < 3 kDa [15]. This simple procedure made it possible to detect and quantify hepcidin in a complex biological matrix and to achieve good reproducibility. The Hepcidin recovery rates were determined by calculating the ratio between the concentration obtained using the classical protocol and that obtained by spiking light hepcidin before the LC/MS injection. An average recovery rate of 59.4% was obtained. This simple procedure made it possible to detect and quantify hepcidin in a complex biological matrix and to achieve good reproducibility.

3.1. Optimization of HPLC parameters

Nano LC/MS (0.075 mm ID, 0.6 μ L/min) and standard LC/MS (1.0 mm ID, 100 μ L/min) methods were tested and compared as means of quantifying serum hepcidin. The nano LC configuration used here was developed by Agilent Technologies: this standard fluidic chip technology was specifically designed for use with nano LC/MS (C18 Chip/MS). Nano ESI spray needle, nano column, pre-concentration column and valve were all included in the chip device. This nano-chip system gives more robust and reproducible results due to the miniaturization of the nano chromatography, with which there is almost no dead volume and there are no capillary connections.

In the case of the standard LC configuration, a classical C18 1.0 mm ID column was used without the pre-concentration column.

Nano LC peptide separation required samples being loaded into a trapping column. In a previous study [9], several sample loading solutions were tested and the optimum conditions were found to consist in loading the samples with 15% of solvent B (90% ACN, 0.1% FA) at a 2.5 μ L/min flow rate using the capillary pump. In the case of the

standard LC configuration, samples were loaded directly into the C18 column with 15% of solution B.

It has been established that nano LC combined with MS gives the best sensitivity, whereas the advantage of standard LC is its robustness, as explained by Olkowicz et al. [24]. Depending on the system available at a clinical laboratory, some compromises have to be made in order to obtain satisfactory LC/MS quantifications. It is worth noting that the LC flow rate depends on the internal diameter (ID) of the column used. A LC column with an ID of at least 2.1 mm was run at a flow rates of 400 $\mu\text{L}/\text{min}$ or more. A 1.0-mm ID column was run at flow rates of 50–100 $\mu\text{L}/\text{min}$, in what is called the standard LC mode. A 0.3 mm ID column was run at flow rates of 1–10 $\mu\text{L}/\text{min}$, in what is called the capillary LC mode. The nano LC column, which was 0.05–0.1 mm in ID, was run at flow rates of 0.075–0.600 $\mu\text{L}/\text{min}$, in what is called the nano LC mode.

3.2. Nano-LC chip cube vs standard LC

On a nano-LC system, the pre-concentration step is mandatory in order to speed up the analysis and eliminate unwanted molecules such as salts before the peptides of interest are loaded into the column [24–27]. The hepcidin analysis was performed here within only 10 min, which is faster than usual for a nano LC method. However, the chip cube system is not very versatile as very few parameters can be optimized, which can cause bottlenecks. The fixed pre-concentration step can lead, for example, to a loss of target molecules. In fact, in comparison with the standard LC, the nano LC system was found to have two particularly prohibitive disadvantages as far as clinical applications are concerned: it suffers from leakages and dead volume problems [28,29].

3.3. Evaluation of chromatographic performances

The performances of the two liquid chromatography systems were also assessed by comparing the chromatographic resolution (Full Width at Half Maximum, FWHM) and the reproducibility of the retention times. An example of Hepcidin peak on nano LC and micro LC is presented in Fig. 2. This figure corresponds to a QC sample at a concentration of 50 ng/mL. The hepcidin resolution peak obtained with nano LC FWHM and standard LC FWHM was equal to 5.2 s in both cases. The hepcidin retention time recorded with nano LC was 3.14 min to a 10-min LC run with a CV of 2.35%. With the standard LC method, it was 4.49 min to a 9-min LC run with a CV of 0.89%. The performances of the two LC systems were both satisfactory, but the retention times were more variable in the case of the nano LC system. The pre-column and nano-column used with the nano LC system also have a more limited loading capacity and therefore tend to introduce variations in the case of highly complex samples such as serum. While setting up the experiments with the nano LC system, only 4 μL of the 10- μL samples could be loaded before being injected because the hepcidin was lost at greater injection volumes, as indicated by the saturation of the pre-column and the column [30]. With the standard LC, 7 μL of the sample could be loaded thanks to the greater capacity of the column and the absence of a pre-column, resulting in a similar level of sensitivity to that of the nano LC method. With the nano system, the use of a low flow rate is sufficient to obtain the required sensitivity. Karas et al. previously established that the low flow rate occurring in the case of the nano LC method was due to the efficient ionization obtained because of the presence of small well desolvated droplets [31,32]. The labeled hepcidin was perfectly co-eluted, as shown by the transition peaks observed during all the experiments performed with the two LC methods.

3.4. Source parameters

The nano ESI chipcube source does not require any particular optimization procedure. The only parameter checked was the capillary

tension (ranging between 1700 and 2100 V), which was set at the beginning of each analysis. With the standard LC source, the following 6 parameters were optimized in order to increase the ionization of the target molecule (Table 1): the capillary tension 3000 V (range 2700–3500 V), the gas flow rate 14 L/min (range 11–15 L/min), the source temperature (200 °C, range: 150–200 °C), the sheath gas flow rate (11 L/min, range: 11–12 L/min), the sheath gas temperature (250 °C, range: 250–325 °C) and the nebulizer pressure (20 psi, range: 15–40 psi).

3.5. Assessment of the analytical performances

3.5.1. Linearity

To determine the linearity, calibration curves were drawn up in the 0–200 ng/mL clinical concentration range. In the case of the nano LC/MS analysis, the calibration curve was linear when the origin was not taken into account and the weighting ratio 1/y was applied. R^2 obtained with the following equation $y = 1.0546x + 0.0297$ was equal to 0.96659 (see Supplementary data 3). It is worth noting that similar results were obtained with the standard LC/MS method: equation $y = 1.1753x + 0.1443$ when the origin was not taken into account and no weighting was applied, and the R^2 obtained was equal to 0.99389. As a good linearity of calibration curve was observed for both methods, the LC/MS methods can be considered as reliable. Since all the experimental conditions were similar (in terms of the hepcidin standard, sample preparation, model matrix and mass spectrometer data acquisition), the performances showed similar levels of linearity.

3.5.2. LOQ/LOD

Calibration curves ($n = 4$) were used to define the LOQ for hepcidin quantification in a real matrix. This parameter was defined as the concentration of the lowest calibration point with a hepcidin-25/labeled hepcidin-25 RSD area ratio < 20%. Calibration points of 5 ng/mL were detected in both systems at high CV levels (28% on nano LC, and 38% on standard LC). At a concentration of 10 ng/mL, the CVs were below 20% in both systems. 10 ng/mL was therefore taken to be the LOQ in both cases, corresponding to equivalent performances.

3.5.3. Precision and accuracy of the method

Intra-assay precision and accuracy were determined by analyzing four replicate calibration points on the curve on the same day. With the nano LC, the intra-assay precision was up to 7% at the 50-ng/mL point and 19% at the lowest point quantified (10 ng/mL). The intra-assay accuracy was almost 100% with the 20, 50, 100 and 200 ng/mL points and 82% with the least concentrated points (10 ng/mL) (Table 3). With the standard LC method, the intra-assay precision was up to 8% with the 50 ng/mL point and 6% with the lowest point quantified (10 ng/mL). The intra-assay accuracy was almost 100% (97–113%) with all the calibration points (Table 3). The accuracy obtained with the standard LC method was greater than with the nano LC method, as previously established by Olkowicz et al. [24]. This difference may have been due to the fact that the spray in the source is more highly stabilized in the case of the standard LC method than the nano LC method [33,34].

In order to test the inter-assay precision and the accuracy of the two systems, 2 points on the calibration curve were selected (at concentrations of 50 and 200 ng/mL) as quality control (QC) samples and analyzed on four separate days. With the nano LC system, the inter-assay precision was around 9–10% and the accuracy was approximately 81% in the case of both QCs. With the standard LC system, the inter-assay precision was around 12–13% and the accuracy was approximately 109% in both QCs. (Table 4).

The performances of the two LC systems were found to be very similar in terms of the precision. All the values obtained were within the range of the bioanalytical criteria (80–120%) [16].

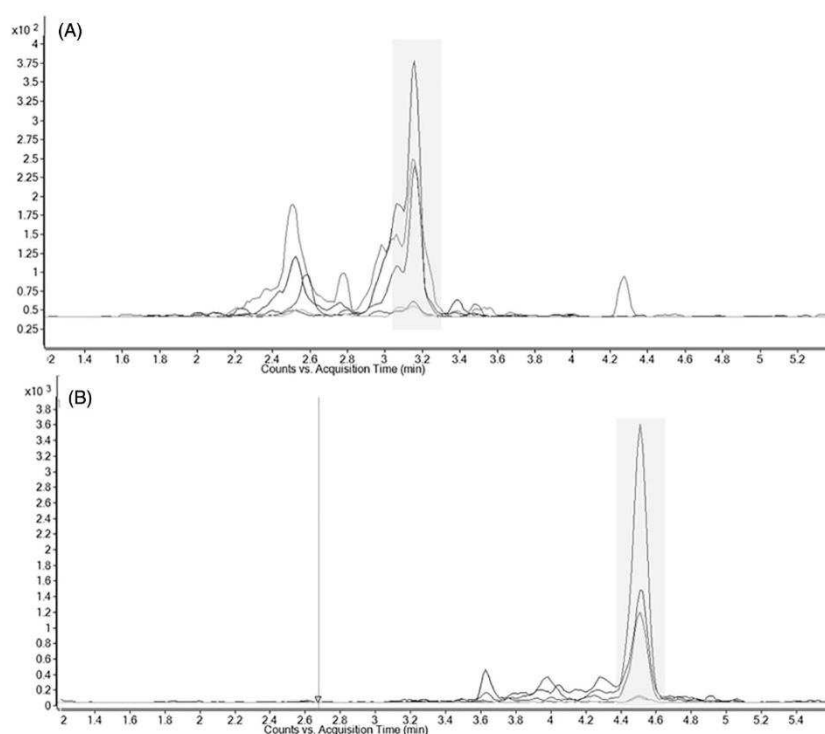


Fig. 2. QC corresponding to 50 ng/mL analyzed on nanoLC (A) and microLC (B). In grey, hepcidin elution windows.

Table 1

Details of the LC-ESI parameters of nano and standard LC methods used for hepcidin-25 quantitation.

LC parameters	Standard LC	Nano LC
Run time (min)	9	10
Flow rate ($\mu\text{L}/\text{min}$)	100	0.6
Gradient evolution: % phase B	15 to 100	3 to 100
Gradient time (min)	5	7
ESI source parameters	Standard	Nano
Capillary voltage (V)	3000	1700–2100
Nebulization gas flow (a.u)	20 psi	11 L/min
Source temperature ($^{\circ}\text{C}$)	200	150
Desolvation temperature ($^{\circ}\text{C}$)	250	–
Desolvation gas pressure (L/min)	11	–

Table 2

MRM parameters optimized for the quantitation of hepcidin-25.

	Precursor ion (m/z)	MRM transitions (m/z)	Collision energy (V)
Hepcidin-25 (light)	559.4	1042.0	19
		983.0	19
		764.6	11
		694.8	11
Hepcidin-25 (heavy)	560.6	645.0	11
		1045.5	19
		985.0	19
		766.7	11
		696.8	11
		646.2	11

Table 3

Analytical performances: intra-assay CV and intra-assay precision of hepcidin peptide determinations.

Concentration (ng/mL)	Intra-assay CV (%)	Intra-assay CV (%)	Intra-assay precision accuracy (%)	
			Nano LC	Standard LC
5	28	38	76	93
10	19	6	82	113
20	8	16	106	104
50	7	8	103	109
100	17	3	100	97
200	13	5	109	100

Table 4

Analytical performances: inter-assay CV and inter-assay precision of hepcidin light peptide determinations.

Concentration (ng/mL)	Inter-assay CV (%)	Inter-assay CV (%)	Inter-assay precision accuracy (%)	
			Nano LC	Standard LC
50	9	12	79	113
200	10	13	82	106

3.5.4. Selectivity and carry-over

The selectivity of the two LC methods was tested by checking the presence of interference peaks at the hepcidin retention times in blank samples (0 ng/mL of hepcidin-25 in normal goat serum). The background noise observed differed between methods: it was higher with the nano-flow MS method due to the sensitivity of the equipment. The

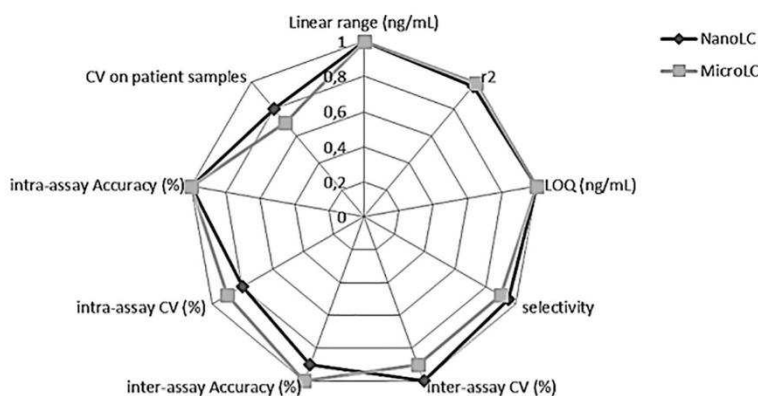


Fig. 3. An analytical comparison between nano LC/MS & standard LC/MS parameters.

matrix effect calculated in the case of the micro-LC/MS method gave a satisfactory percentage of 93.5% (Supplementary data 5 and 6). As can be seen in Fig. 3, a good level of selectivity was found to exist with both the standard LC and the nano LC method, which both gave similar intensity peaks in the MS noise.

The occurrence of carry-over was tested by analyzing blank samples directly before and after LC-MRM runs with the highest calibration standard (200 ng/mL). With the standard LC system, the transition (559 → 694.8) corresponded to areas of 85 and 72 on the pre and post blanks, respectively. With the nano LC system, the transition (559 → 694.8) corresponded to areas of 410 and 327 on the pre and post blanks, respectively. No carry-over was therefore detectable with either of the two LC systems.

3.6. Comparison between hepcidin assays

In order to compare the two hepcidin assays, 24 sera were prepared (Fig. 1) and analyzed using nano LC-MS and standard LC-MS.

Twenty-four patients (20 men and 4 women, mean age 57.2 years, mean weight 77.9 kg) were recruited to participate in this study (see Supplementary data 4). Two sub-populations were defined as those with ferritin levels < 300 ng/mL and > 300 ng/mL corresponding to a w/w iron deficiency (mean values 5.6 ng/mL and 10.9 ng/mL in patients with ferritin levels < 300 ng/mL and > 300 ng/mL, respectively).

Hepcidin-25 was quantified in all the samples in duplicate. Mean CV values were found to be lower in the nano LC than the standard LC data (10.2% vs 14.1%), although they were still acceptable. Statistical

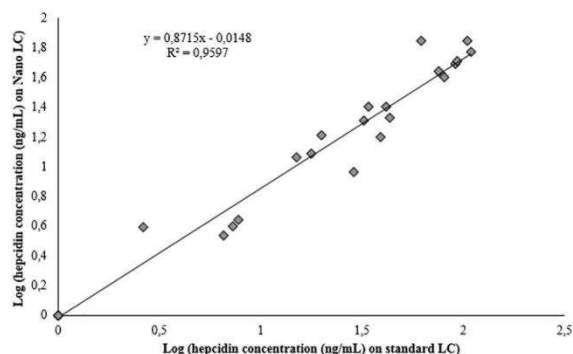


Fig. 4. Correlation between nano & standard LC injection for quantifying hepcidin-25 samples.

comparisons between the two analytical LC methods yielded a strong positive correlation, with a $R^2 = 0.9597$ (Fig. 4). Even if the two LC/MS methods tended to give similar concentration levels, the absolute values were slightly different (see Supplementary data 4). The overall concentrations obtained with the standard-flow method were underestimated 0.87-fold in comparison with the nano-flow method. Due to the sensitivity of the nano-LC/MS method, greater noise integration was processed, which increased the area ratio between endogenous/labeled hepcidin and hence the concentration in the samples analyzed by nano-LC/MS.

3.7. The best choice for clinical applications: nano or standard LC/MS?

First, in keeping with previous data in the literature, nano LC/MS was found to be the more sensitive method thanks to the use of a pre-concentration step and the efficiency of the ionization process occurring in the nano-source. In terms of the robustness, the standard LC method was more satisfactory than the nano LC method. These conclusions are in agreement with the work of Percy et al. [35], who established that the standard-flow method involves less variability and fewer retention time switches, and thus increases the multiplexing potential. However, the latter author has suggested that the nano-flow may be appropriate in some cases, when the peptides targeted require maximum sensitivity. QC samples were used to test this point on our system. 1 fmol of digested HSA injected gave the transition 575.5 → 937.5 an area of 89,624 on the nano LC and 396 on the standard flow LC. In the case of hepcidin quantitation, there was no need for a particularly high sensitivity because the peptides were clearly detected using the standard-LC method. Although the selectivity did not differ between the two methods, the accuracy and the precision depended greatly on the stability of the spray in the source. Olkowicz et al., showed that the instability of the spray in the nano LC method affects the accuracy and the precision of the method. Under the sprayer conditions used in this work (see Material and methods section), the sprayer was found to be stable, and no problems were encountered with the chip cube. It is worth noting that the use of labeled standard was beneficial since it compensated for any loss of intensity due to the stability of the sprayer.

When dealing with clinical applications, the overall cost of the 2 methods also has to be taken into account, including that of the sample preparation step, the chemicals (ACN, FA, etc.), and the consumables required (columns, vials, etc.). The cost of standards was identical in both cases, amounting to 1.0 euros per sample. MS data acquisition was performed using the same mass spectrometer in the same environment (gases, power supply, air conditioning, etc.) and cost 7.0 euros per sample. Other parameters which had to be considered were the price of the standard LC column (633 euros) versus the ProtID-Chip-43 column (808 euros) and the number of runs per column: 2100 with the

standard LC column and 700 with the nano chip column. The final cost per sample worked out at 8.3 euros in the case of the standard LC method vs 9.2 euros in that of the nano LC method.

The above pre-analytical, analytical and financial comparisons between the nano LC/MS and micro LC/MS methods for the clinical quantitation of hepcidin led unexpectedly to a draw. However, although successful clinical performances depend on the ability of the method to perform reliable, cost-effective assays, the equipment already available at a clinical lab must also be taken into account. The nano LC/MS system, especially the nano LC Triple quadrupole, which is particularly flexible, is not often present these days in clinical environments. In therapeutic drug monitoring (TDM) procedures, for example, which are one of the main applications of LC-MS in the clinical field, standard LC and triple quadrupole MS are mostly used [19]. Lastly, the problems arising with nano LC systems are usually difficult to identify because the very low flow rates result in less robustness and less availability [18].

4. Conclusion

During the last 10 years, several assays based on immunochemical and mass spectrometry methods have been developed for measuring hepcidin in human blood and urine samples. The present comparison between two experimental methods have helped to identify the most appropriate reference method for measuring hepcidin-25 in human serum in routine clinical settings.

Several MS-based methods for quantifying hepcidin, such as the SELDI-TOF and LC-MS/MS methods, have been previously presented. However, as LC-MS/MS in the MRM mode is currently the reference method of peptide and protein quantification, choosing the type of HPLC coupling is of great importance. In this study, MS methods combined with nano and standard LC were compared using the same sample preparation, the same standards and the same MS analyzer to quantify hepcidin. Both combined systems gave very similar results, although the standard LC showed slightly greater versatility and robustness.

These results open new perspectives for the clinical analysis of peptides and proteins. Although the analytical performances of the nano-flow and standard-flow platforms were found to be very similar, the best method for hepcidin quantitation was still the standard-flow platform. First, the robustness of the standard-flow method was preferred to the sensitivity of the nano-flow method. The latest triple quadrupole methods are highly sensitive equipment's. Secondly, the routine methods used in clinical settings must be easy to use and give rise to fewer troubleshooting problems (such as the leakage and sprayer problems encountered with nano-flow equipment). Standard LC/MS configurations, which are already available at most clinical laboratories, decrease the cost of analysis, increase the flexibility of the system (since many LC packing phases are available and a wide range of buffers can be used), increase the robustness and are easy to use by clinical technicians. The standard-flow platform therefore gives the best compromise as well as being less expensive and requiring fewer consumables. Hepcidin quantification therefore provides a really good example of how the MS quantification of peptides and proteins can be usefully applied in clinical settings, as hepcidin is a relevant biomarker for which there exist no equivalent ELISA assays so far.

Acknowledgements

The authors would like to specially thank Jessica Blanc for revising the manuscript.

Disclosure of statement

The authors report no conflict of interest.

Funding

This research did not receive any specific grant from funding agencies in the public, commercial, or not-to-profit sectors.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data to this article can be found online at <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2018.04.003>.

References

- [1] J.J. Kroot, C.M. Laarakkers, A.J. Geurts-Moespot, N. Grebenchtchikov, P. Pickkers, A.E. van Ede, H.P. Peters, E. van Dongen-Lases, J.F. Wetzels, F.C. Sweep, H. Tjalsma, D.W. Swinkels, Immunochemical and mass-spectrometry-based serum hepcidin assays for iron metabolism disorders, *Clin. Chem.* 56 (2010) 1570–1579.
- [2] J.J. Kroot, H. Tjalsma, R.E. Fleming, D.W. Swinkels, Hepcidin in human iron disorders: diagnostic implications, *Clin. Chem.* 57 (2011) 1650–1669.
- [3] B. Rochat, D. Peduzzi, J. McMullen, A. Favre, E. Kottelat, B. Favrat, J.D. Tissot, A. Angelillo-Scherrer, M. Bromirski, S. Waldvogel, Validation of hepcidin quantification in plasma using LC-HRMS and discovery of a new hepcidin isoform, *Bioanalysis* 5 (2013) 2509–2520.
- [4] C.H. Park, E.V. Valore, A.J. Waring, T. Ganz, Hepcidin, a urinary antimicrobial peptide synthesized in the liver, *J. Biol. Chem.* 276 (2001) 7806–7810.
- [5] C. Pigeon, G. Ilyin, B. Courselaud, P. Leroyer, B. Turlin, P. Brissot, O. Loreal, A new mouse liver-specific gene, encoding a protein homologous to human antimicrobial peptide hepcidin, is overexpressed during iron overload, *J. Biol. Chem.* 276 (2001) 7811–7819.
- [6] G. Nicolas, M. Bennoun, I. Devaux, C. Beaumont, B. Grandchamp, A. Kahn, S. Vaulont, Lack of hepcidin gene expression and severe tissue iron overload in upstream stimulatory factor 2 (USF2) knockout mice, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 98 (2001) 8780–8785.
- [7] J.J. Kroot, E.H. Kemna, S.S. Bansal, M. Busbridge, N. Campostrini, D. Girelli, R.C. Hider, V. Koliarakis, A. Mamelaki, G. Olbina, N. Tomosugi, C. Tselepis, D.G. Ward, T. Ganz, J.C. Hendriks, D.W. Swinkels, Results of the first international round robin for the quantification of urinary and plasma hepcidin assays: need for standardization, *Haematologica* 94 (2009) 1748–1752.
- [8] J.J. Kroot, A.E. van Herwaarden, H. Tjalsma, R.T. Jansen, J.C. Hendriks, D.W. Swinkels, Second round robin for plasma hepcidin methods: first steps toward harmonization, *Am. J. Hematol.* 87 (2012) 977–983.
- [9] C. Delaby, C. Beaumont, Serum hepcidin assay in 2011: where do we stand? *Ann. Biol. Clin.* 70 (2012) 377–386.
- [10] N. Grebenchtchikov, A.J. Geurts-Moespot, J.J. Kroot, M. den Heijer, H. Tjalsma, D.W. Swinkels, F.G. Sweep, High-sensitive radioimmunoassay for human serum hepcidin, *Br. J. Haematol.* 146 (2009) 317–325.
- [11] N.U. Stoffel, C. Zeder, E. Fort, D.W. Swinkels, M.B. Zimmermann, D. Moretti, Prediction of human iron bioavailability using rapid c-ELISAs for human plasma hepcidin, *Clin. Chem. Lab. Med.* 55 (2017) 1186–1192.
- [12] S. Altamura, J. Kiss, C. Blattmann, W. Gilles, M.U. Muckenthaler, SELDI-TOF MS detection of urinary hepcidin, *Biochimie* 91 (2009) 1335–1338.
- [13] S. Handley, L. Couchman, P. Sharp, I. Macdougall, C. Moniz, Measurement of hepcidin isoforms in human serum by liquid chromatography with high resolution mass spectrometry, *Bioanalysis* 9 (2017) 541–553.
- [14] D.W. Swinkels, D. Girelli, C. Laarakkers, J. Kroot, N. Campostrini, E.H. Kemna, H. Tjalsma, Advances in quantitative hepcidin measurements by time-of-flight mass spectrometry, *PLoS One* 3 (2008) e2706.
- [15] C. Delaby, J. Vialaret, P. Bros, A. Gabelle, T. Lefebvre, H. Puy, C. Hirtz, S. Lehmann, Clinical measurement of Hepcidin-25 in human serum: is quantitative mass spectrometry up to the job? *EuPA Open Proteom.* 3 (2014) 60–67.
- [16] V. Houbart, G. Cobraiville, F. Lecomte, B. Debrus, P. Hubert, M. Fillet, Development of a nano-liquid chromatography on chip tandem mass spectrometry method for high-sensitivity hepcidin quantitation, *J. Chromatogr. A* 1218 (2011) 9046–9054.
- [17] C. Delaby, P. Bros, J. Vialaret, A. Moulinier, V. Delatour, A. Gabelle, S. Lehmann, C. Hirtz, Quantification of hepcidin-25 in human cerebrospinal fluid using LC-MS/MS, *Bioanalysis* 9 (2017) 337–347.
- [18] T. Lefebvre, N. Dessendier, D. Houamel, N. Ialy-Radio, C. Kannengiesser, H. Manceau, C. Beaumont, G. Nicolas, L. Gouya, H. Puy, Z. Karim, LC-MS/MS method for hepcidin-25 measurement in human and mouse serum: clinical and research implications in iron disorders, *Clin. Chem. Lab. Med.* 53 (2015) 1557–1567.
- [19] H. Li, M.J. Rose, L. Tran, J. Zhang, L.P. Miranda, C.A. James, B.J. Sasu, Development of a method for the sensitive and quantitative determination of hepcidin in human serum using LC-MS/MS, *J. Pharmacol. Toxicol. Methods* 59 (2009) 171–180.
- [20] T. Ganz, G. Olbina, D. Girelli, E. Nemeth, M. Westerman, Immunoassay for human serum hepcidin, *Blood* 112 (2008) 4292–4297.
- [21] N. Murao, M. Ishigai, H. Yasuno, Y. Shimonaka, Y. Aso, Simple and sensitive quantification of bioactive peptides in biological matrices using liquid chromatography/selected reaction monitoring mass spectrometry coupled with tri-chloroacetic acid clean-up, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 21 (2007) 4033–4038.
- [22] S.I. Hwang, Y.Y. Lee, J.O. Park, H.J. Norton, E. Clemens, L.W. Schrum, H.L. Bonkovsky, Effects of a single dose of oral iron on hepcidin concentrations in

- human urine and serum analyzed by a robust LC-MS/MS method, *Clin. Chim. Acta* 412 (2011) 2241–2247.
- [23] O. Iitkonen, J. Parkkinen, U.H. Stenman, E. Hamalainen, Preanalytical factors and reference intervals for serum hepcidin LC-MS/MS method, *Clin. Chim. Acta* 413 (2012) 696–701.
- [24] M. Olkiewicz, I. Rybakowska, S. Chlopicki, R.T. Smolenski, Development and analytical comparison of microflow and nanoflow liquid chromatography/mass spectrometry procedures for quantification of cardiac troponin T in mouse hearts, *Talanta* 131 (2015) 510–520.
- [25] E. Chambers, D.M. Wagrowski-Diehl, Z. Lu, J.R. Mazzeo, Systematic and comprehensive strategy for reducing matrix effects in LC/MS/MS analyses, *J. Chromatogr. B Anal. Technol. Biomed. Life Sci.* 852 (2007) 22–34.
- [26] C. Cote, A. Bergeron, J.N. Mess, M. Furtado, F. Garofolo, Matrix effect elimination during LC-MS/MS bioanalytical method development, *Bioanalysis* 1 (2009) 1243–1257.
- [27] F. Gosetti, E. Mazzucco, D. Zampieri, M.C. Gennaro, Signal suppression/enhancement in high-performance liquid chromatography tandem mass spectrometry, *J. Chromatogr. A* 1217 (2010) 3929–3937.
- [28] M. Vollmer, T. van de Goor, HPLC-Chip/MS technology in proteomic profiling, *Methods Mol. Biol.* 544 (2009) 3–15.
- [29] J. Sestak, D. Moravcova, V. Kahle, Instrument platforms for nano liquid chromatography, *J. Chromatogr. A* 1421 (2015) 2–17.
- [30] P. Xu, D.M. Duong, J. Peng, Systematical optimization of reverse-phase chromatography for shotgun proteomics, *J. Proteome Res.* 8 (2009) 3944–3950.
- [31] M. Karas, U. Bahr, T. Dulcks, Nano-electrospray ionization mass spectrometry: addressing analytical problems beyond routine, *Fresenius J. Anal. Chem.* 366 (2000) 669–676.
- [32] A. Schmidt, M. Karas, T. Dulcks, Effect of different solution flow rates on analyte ion signals in nano-ESI MS, or: when does ESI turn into nano-ESI? *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* 14 (2003) 492–500.
- [33] G.A. Valaskovic, J.P. Murphy 3rd, M.S. Lee, Automated orthogonal control system for electrospray ionization, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* 15 (2004) 1201–1215.
- [34] B.B. Schneider, X. Guo, L.M. Fell, T.R. Covey, Stable gradient nanoflow LC-MS, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* 16 (2005) 1545–1551.
- [35] A.J. Percy, A.G. Chambers, J. Yang, D. Domanski, C.H. Borchers, Comparison of standard- and nano-flow liquid chromatography platforms for MRM-based quantitation of putative plasma biomarker proteins, *Anal. Bioanal. Chem.* 404 (2012) 1089–1101.

4.3 Conclusions et nouveaux éléments

La quantification d'hepcidine a été développée au laboratoire en 2013. Notre système LC-MS a évolué d'une configuration nanoLC à une configuration standard LC car la robustesse du système nano était problématique sur les deux premières années d'utilisation. Ce changement de configuration nous a permis d'écrire la publication présente dans le chapitre 3 mais surtout de gagner en robustesse. Entre 2013 et 2018, le dosage d'hepcidine a été réalisé 13108 fois, pour un coût d'analyse de 8,3 euros le point (Figure 49).

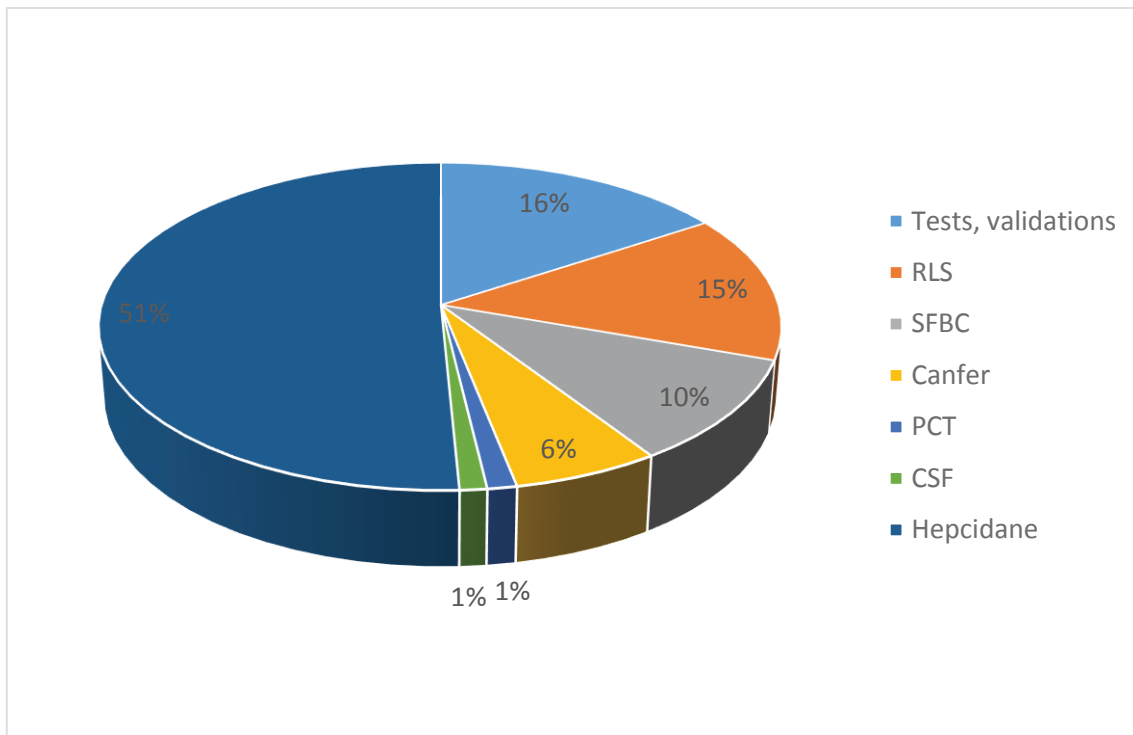


Figure 49: Répartition des dosages d'hepcidine en fonction des programmes de recherche. Les analyses sont principalement réalisées dans le sérum hormis la mise au point, la valorisation, et le dosage de quelques échantillons de LCR (CSF) du laboratoire.

Ce nombre d'analyses se répartit entre :

- **Différents tests et analyses nécessaires pour les validations analytiques.** Les validations analytiques ont été réalisées sur le sérum en configuration nanoLC, puis en configuration microLC. Une validation de méthode a aussi été réalisée pour pouvoir doser l'hepcidine dans le LCR, donnant lieu à une publication [277].
- Des **dosages d'échantillons de LCR** du laboratoire sans programme de recherche associé.
- Des **dosages dans le sang** ont été réalisés pour différents programmes de recherches cliniques.

Le programme CANFER a représenté 6% des analyses. Dans la tâche incombant à la PPC, il s'agissait de doser l'hepcidine dans le contexte des carences en fer au cours de la chimiothérapie de première intention dans les cancers métastatiques (*publication en cours d'écriture*).

Dans le programme RLS (Restless Legs Syndrome) l'hepcidine a été dosée pour vérifier l'association entre le niveau d'hepcidine sérique et le syndrome des jambes sans repos [276]. Enfin, 1% de nos dosages a été réalisé pour le programme PCT (Porphyrie Cutanée Tardive).

La dernière étude clinique qui représente 51% des analyses est l'étude Hecpidane (une publication en cours d'écriture, et [284]). Cette étude avait pour but de réaliser l'analyse médico-économique de l'intérêt du dosage par spectrométrie de masse quantitative de l'hepcidine pour le diagnostic de la carence martiale en présence d'une anémie en réanimation.

Pour finir, un travail d'harmonisation du dosage d'hepcidine par spectrométrie de masse est en cours entre les villes de Bordeaux, Paris, Bruxelles, et Montpellier grâce à la Société Française de Biologie Clinique (SFBC) (*Publication en cours d'écriture*).

Les analyses réalisées sur une période de 6 ans ont permis de valider de nombreux paramètres analytiques :

- Des tests de stabilité ont été réalisés après la publication initiale. Il s'agit de tests de stabilité sur l'échantillon préparé et stocké avant analyse à -20°C, ou dans le passeur d'échantillon à 4°C.

Les résultats ont montré que la stabilité à 4°C est très limitée car une baisse de l'intensité du signal MS est observée dès les premiers points de cinétique mais cette baisse est compensée par l'utilisation du standard marqué avec un biais de 3,2% après 15 heures (Figure 50 et 51). Ces résultats sont similaires sur un échantillon QC et sur un point de gamme faible (25 ng/mL).

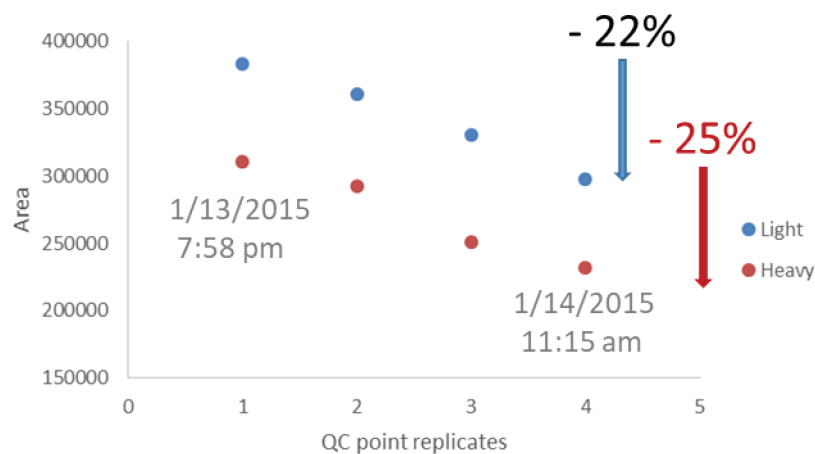


Figure 50: Suivi de la stabilité d'hepcidine sur un échantillon QC à 50 ng/mL après extraction conservé à 4°C. En bleu est représenté l'aire d'hepcidine endogène, et en rouge l'aire de l'hepcidine marquée. Le début des analyses a commencé le 13 janvier à 19h58 pour finir le 14 janvier à 11h15.

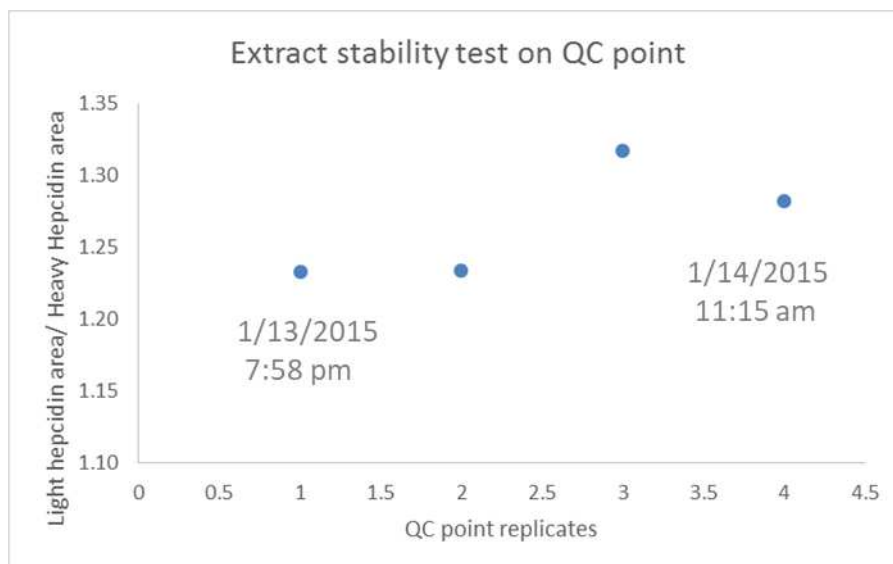


Figure 51: Suivi de la stabilité d'hepcidine sur un échantillon QC à 50 ng/mL après extraction conservé à 4°C. Le ratio d'aire (aire d'hepcidine endogène /aire de l'hepcidine marquée) est représenté. Le début des analyses a commencé le 13 janvier à 19h58 pour finir le 14 janvier à 11h15.

La stabilité sur échantillons préparés a été étudiée sur un stockage de 12 jours à -20°C. L'hepcidine a été retrouvée stable 8 jours à -20°C, puis une baisse de l'intensité du signal MS a été observée entre le huitième et le douzième jour. Cette baisse n'est observée que sur l'hepcidine marquée ce qui induit un biais de quantification (Figure 52).

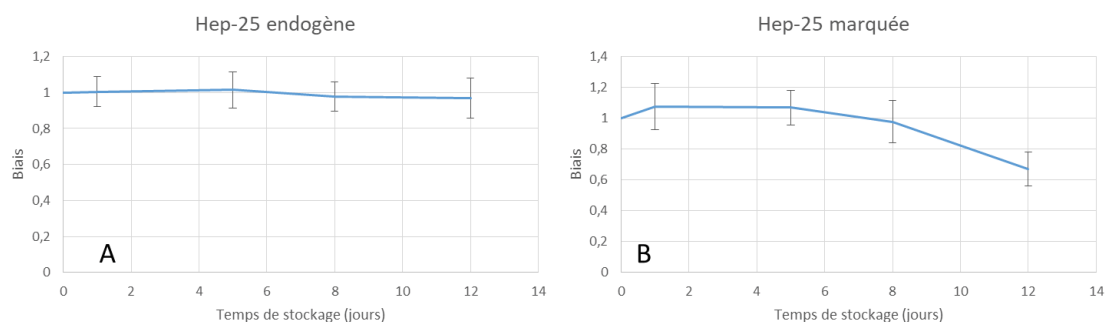


Figure 52: Suivi du biais sur l'hepcidine endogène (A) et marquée (B) sur 8 échantillons préparés et stockés à -20°C.

Sur les points de gamme d'étalonnage, une baisse de l'intensité du signal MS non compensée par le standard marqué de l'hepcidine est observée à partir du premier jour (Figure 53).

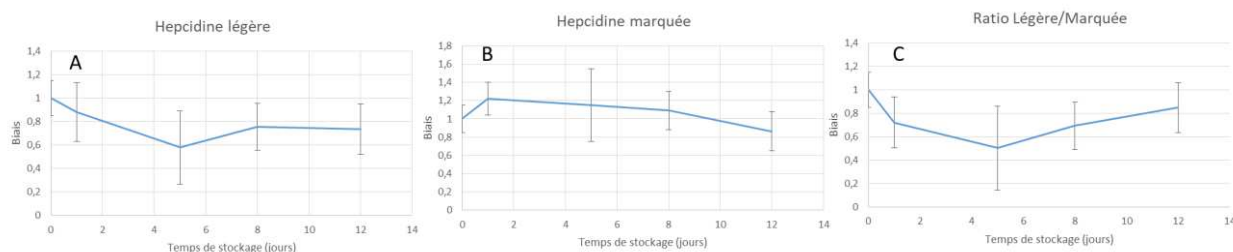


Figure 53: Suivi du biais analytique sur l'hepcidine endogène (A), marquée (B), et le ratio des aires (C) sur 7 points de gamme préparés et stockés à -20°C.

En plus des paramètres analytiques évalués dans l'article scientifique, le dosage d'hepcidine sur un temps long a permis d'étudier les paramètres de stabilité après préparation d'échantillons. Des recommandations évitant l'introduction de biais dans le cas d'analyses décalées par rapport à la préparation d'échantillons ont été introduites. L'étude de ces points a permis de se rapprocher d'une analyse compatible avec une utilisation en routine clinique.

5 Chapitre 4 : la quantification sérique d'un anticorps monoclonal thérapeutique, le Bevacizumab avec immuno-enrichissement

5.1 Le dosage des anticorps monoclonaux thérapeutiques. Cas particulier du Bevacizumab

Le dosage des anticorps thérapeutiques est un domaine en pleine expansion car de nombreuses nouvelles molécules appartenant à cette famille sont mises sur le marché chaque année (3 à 5 par an depuis 2002 [285]).

Les anticorps monoclonaux thérapeutiques sont actifs par liaison à leur antigène à la surface des cellules.

Pour beaucoup d'anticorps thérapeutiques, la relation entre la dose optimale, l'efficacité et les effets secondaires, sur de grande population de patients ne sont pas connus ce qui ne permet pas d'établir les gammes d'utilisation clinique. Par ailleurs, la pharmacocinétique et la pharmacodynamique des anticorps peuvent être impactées par des co-traitements. Par conséquent, le suivi de la quantité de drogue présente dans le sang de patient est recommandé pour ajuster la quantité de drogue à administrer et ainsi optimiser l'efficacité et diminuer les effets secondaires [286-289].

Le Bevacizumab (Avastin®, Genentech, Inc., San Francisco, USA) est un anticorps humanisé de la sous-classe IgG1 capable de lier le VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor). Le VEGF est une glycoprotéine qui est importante pour l'angiogenèse [290]. La liaison entre le VEGF et le Bevacizumab inhibe l'angiogenèse et limite la progression de la tumeur [291, 292]. Le Bevacizumab a été la première molécule autorisée contre le cancer colorectal métastatique en 2004 [293].

Les paramètres pharmacocinétiques et pharmacodynamiques de cette molécule ont été déterminés durant les phases cliniques et sont compatibles avec un modèle à deux compartiments dont la modélisation des concentrations théoriques sanguines montre un plateau vers 90 mg/mL avec une administration de 5mg/kg toutes les deux semaines (Figure 54) [294].

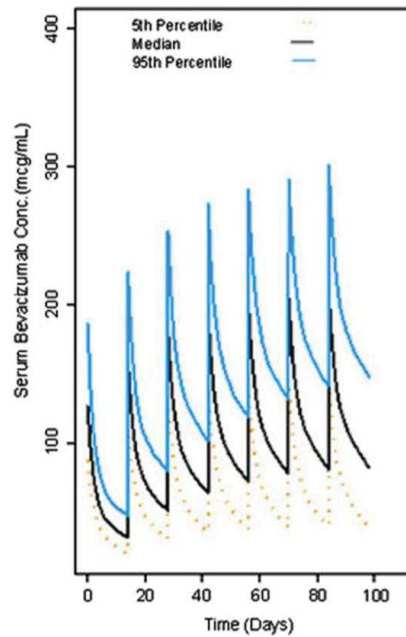


Figure 54: Concentrations théoriques du modèle à l'état d'équilibre après administration de Bevacizumab à 5 mg / kg toutes les 2 semaines [294].

Les plus grandes variables sont le sexe et le poids. Le temps de demi-vie est d'environ 20 jours mais avec une grande variabilité inter-individuelle (11 à 50 jours) [295]. Cette grande variabilité peut être une explication des différentes réponses au traitement. Dans un traitement standardisé (quantité fixe sur des périodes de temps fixes), un patient chez qui la demi-vie du Bevacizumab est de 55 jours aura rapidement une concentration sérique plus grande qu'un patient chez qui la demi-vie du Bevacizumab est de 11 jours. Si la demi-vie est trop courte, la quantité de Bevacizumab ne sera pas suffisante et l'efficacité du traitement ne sera pas optimum. Dans le cas opposé, la quantité sera trop importante conduisant à des effets secondaires. Les effets secondaires décrits sont principalement des problèmes vasculaires (saignement, phlébite, ou embolisme).

Devant cette grande variabilité inter-individuelle, Caulet *et al.* [296] ont re-étudié les variables impactant la pharmacocinétique du Bevacizumab. La distribution de la drogue dans le corps est dépendante de la taille et du génotype 3/3 FCGRT (IgG receptor FcRn large subunit p51). La cinétique d'élimination est dépendante de la concentration en Antigène carcino-embryonnaire (CEA) et en VEGF, ainsi qu'à la présence de métastases hépatiques. Pour conclure, une faible concentration en Bevacizumab est principalement liée à une concentration en VEGF et à une charge tumorale élevée. Pour ces raisons, les auteurs recommandent d'adapter la quantité administrée de Bevacizumab pour chaque patient et ainsi améliorer l'efficacité du traitement. Devant le nombre important de variables, un moyen serait de doser directement le Bevacizumab sérique.

Le développement des protéines médicaments a nécessité l'amélioration des techniques analytiques. En comparaison des médicaments basés sur des petites molécules, l'analyse de biothérapeutiques est d'une tout autre complexité de par la structure et les modifications que ces composés peuvent subir. L'analyse d'un biothérapeutique est réalisée par une approche bottom-up pour couvrir un maximum la séquence protéique, par une analyse top-down pour déterminer le poids moléculaire, et par analyse des motifs de glycosylation [297].

Dans le cas d'un dosage chez les patients, l'analyse directe n'est pas réalisable à cause de la complexité de l'échantillon. Le dosage des anticorps est principalement réalisé par des

immuno-dosages grâce à leurs sensibilités et leurs débits [298, 299]. Cependant le développement de nouveaux dosages est couteux en termes de temps et d'argent pour pouvoir développer des anticorps les plus spécifiques possibles.

Après le développement d'un dosage spécifique, la spécificité et la précision d'un immuno-dosage peuvent être perturbés par des réactions croisées avec des anticorps endogènes ou des auto-anticorps [300, 301].

L'autre technique analytique de choix est l'analyse LC-MS de par sa grande spécificité. Dans le chapitre précédent sur l'apolipoprotéine E, une préparation protéomique classique est réalisée avec des étapes de dénaturation/réduction-alkylation/digestion/ et nettoyage des peptides. Dans le cas de l'analyse des anticorps, une simplification de l'échantillon basée sur une interaction avec de la protéine A est utilisée pour pouvoir réaliser une analyse MS reproductible et sensible.

Le challenge analytique pour détecter une protéine médicament est toujours présent car les immunoglobulines sont une des classes de protéines les plus abondantes dans le sérum. Cette grande quantité d'immunoglobulines est une source potentielle de variabilité lors de l'analyse MS (interférences et suppression ionique) mais peut aussi affecter la quantification en affectant le taux de récupération de la molécule cible lors de l'étape d'immuno-affinité. Pour éviter cela, une capture basée sur l'antigène peut être mis en œuvre. L'antigène, le VEGF dans notre cas, peut être immobilisé, permettant ainsi une capture beaucoup plus sélective du Bévacicumab. Une application a été publiée sur l'inflximab [302]. Cette préparation d'échantillon plus propre, permet de réduire le bruit analytique et ainsi d'abaisser la LLOQ. Cette approche permet aussi d'accéder à la fraction de la drogue capable de lier l'antigène qui est la fraction disponible pour aller lier le VEGF et ainsi disponible pour agir pour ses propriétés anti-pathologiques.

Après ces différentes étapes de purification, les anticorps sont processés classiquement comme dans une approche bottom-up (dénaturation/réduction-alkylation/digestion/nettoyage des peptides/analyse LC-MS). Ce nombre d'étape important doit être normalisé par un standard interne pour corriger les variabilités dues à chaque étape et ainsi améliorer la répétabilité des dosages. Cet ajout dans l'échantillon brut permet aussi de corriger les rendements de chaque étape pour avoir un dosage le plus juste possible. Pour une meilleure justesse des résultats il est recommandé d'utiliser la protéine marquée. De plus en plus d'anticorps thérapeutiques marqués sont disponibles sur le marché mais pas toutes les molécules. La société Promise vient de mettre sur le marché le Bevacizumab $^{13}\text{C}_{15}\text{N}$. Sigma développe aussi un anticorps marqué universel (SILuTMMab) qui est conçu pour avoir des peptides spécifiques utilisables dans de nombreuses études d'anticorps mais aussi dans différentes espèces. Il s'agit d'un IgG1 kappa avec un marquage $^{13}\text{C}_{15}\text{N}$ sur les lysines et les arginines.

5.2 Résultats

5.2.1 Introduction

Dans l'article suivant publié dans Bioanalysis, le Bevacizumab a été dosé à partir de 5 µL de sérum grâce à deux approches de préparation d'échantillon basées sur une immunopurification avec de la protéine A :

- Protéine A immobilisée sur une phase chromatographique à l'intérieur de cartouches utilisées par le robot AssayMap Bravo
- Protéine A immobilisée sur billes dans le kit nSMOL.

Les deux approches sont similaires dans les étapes mises en œuvre et la principale différence est la première étape avec de la protéine A immobilisée dans des cartouches (approche sur le AssayMap Bravo), ou sur des billes (approche nSMOL). La particularité de ces billes est d'avoir des pores de 100nm de diamètre au fond desquelles la protéine A est liée. Après interaction anticorps-Protein A, le domaine CDR (Complementary Determining Region) est orienté vers l'extérieur des billes. Suite à différents lavages, la digestion trypsique ne va pas se faire en solution après une étape d'élution, mais directement sur les billes avec une trypsine immobilisée sur des nanoparticules de 200nm. La gêne stérique va conduire à une digestion ménagée de l'anticorps avec une digestion favorisée du CDR dans l'approche nSMOL, par rapport à l'autre approche où la digestion complète est réalisée en solution.

De par la quantité croissante d'anticorps thérapeutiques mise sur le marché, nous avons fait le choix de développer une approche générique basée sur une capture protéine A qui permettra la purification d'IgGs humanisés et du standard interne universel.

5.2.2 Article Scientifique

What sample preparation should be chosen for targeted MS monoclonal antibody quantification in human serum?

Jérôme Vialaret¹, Sophie Broutin², Célia Pugnier¹, Sophie Santelé¹, Aurore Jaffuel³, Alan Barnes⁴, Laurent Tiers¹, Laurent Pelletier⁴, Sylvain Lehmann¹, Angelo Paci² & Christophe Hirtz^{*1}

¹University of Montpellier, LBPC- IRMB, CHU Montpellier, 80 rue Augustin Fliche, Montpellier, France

²Service de Pharmacologie, Département de Biologie et Pathologie Médicales, Gustave Roussy et Université Paris Saclay, Villejuif, France

³Shimadzu Corporation, Marne-la-Vallée, France

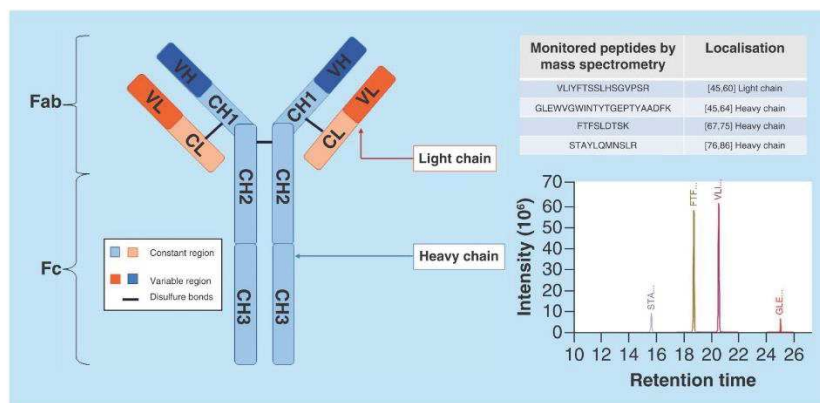
⁴Shimadzu Corporation, Manchester, UK

⁵Grenoble Institut des Neurosciences, Grenoble, France, Université Joseph Fourier, Grenoble, France

*Author for correspondence: christophe.hirtz@umontpellier.fr

Aim: Monoclonal antibody-based treatment of cancer has been established as one of the most successful therapeutic strategies. **Materials & methods:** In this work, we developed a workflow based on an automated protein-A capture and LC-MS/MS analysis to quantify bevacizumab on patient serum during treatment. This analytical approach was fully validated and compared with a commercially available Monoclonal antibody-based treatment preparation (nanosurface and molecular-orientation limited kit). **Results:** The analytical comparison of the two preparative workflows based on protein-A capture gave similar results with a better lower limit of quantification for the nanosurface and molecular-orientation limited kit (0.26986 vs 1.9565 µg/ml). **Conclusion:** LC-MS/MS has clear advantages compared with ELISA when considering method development time, multiplexing capacities and absolute quantification with internal standardization.

Graphical abstract:



First draft submitted: 29 January 2018; Accepted for publication: 16 March 2018; Published online: 17 May 2018

Keywords: automation • bevacizumab • MS • nSMOL • protein-A purification • therapeutic drug monitoring

Over the last decade, significant advances have been made in oncology with the emergence of molecular targeted therapies including small molecules such as kinase inhibitors and monoclonal antibodies (mAbs). Antibody based-

newlands
press

therapy for cancer is one of the most successful and important strategies for treating patients with hematological malignancies and solid tumors [1]. The use of mAbs have shown benefits in response rate, free-progression survival and in some cases overall survival however primary or secondary drug resistance, persistence of cancer stem cells and drug adverse effects still limit their ability to stabilize or cure malignant diseases in the long term. Moreover, it is well established that clinical outcomes can be highly variable with some patients responding remarkably well while others do not, with side effects that can lead to interruption or definitive cessation of the treatment [2,3].

In clinical practice, inter and inpatient pharmacokinetic (PK) variability with mAbs has been observed and estimated up to 100% [4]. Several parameters influencing mAb PK have been suggested including: weight, sex, albumin levels, immunization and drug target whose expression is correlated to the tumor mass. It has been hypothesized that interindividual PK variability could explain part of the interpatient differences in clinical response. Several studies have shown preliminary results supporting this hypothesis in particular with cetuximab [5] and bevacizumab (Avastin[®] [Roche, Boulogne-Billancourt, France]) [6]. Bevacizumab is a humanized immunoglobulin IgG1 monoclonal antibody targeting VEGF and displaying antiangiogenic properties. Bevacizumab is approved in several cancers including metastatic colorectal cancer (mCRC), renal cell carcinoma, and ovarian and breast neoplasms [7]. PK studies have reported a large interindividual variability with a CV of PK parameters ranging from 25 to 100% with part of this variability attributed to sex, weight and serum albumin [8]. Nugue *et al.* [9] developed an ELISA assay based on suspension array technology allowing bevacizumab quantification. The high interindividual variability, in terms of blood concentrations, showed that blood concentrations above the median were associated with side effects, whereas, values below the median favor inefficacy indicating bevacizumab concentrations could be a prognostic/response biomarker. More recently, Caulet *et al.* [6] showed a relationship between serum concentrations of bevacizumab and clinical efficacy in mCRC, suggesting a longer survival with a bevacizumab concentration above 15 mg/l 14 days after the first administration of bevacizumab.

These two studies used immunological techniques, such as ELISA, considered so far as the analytical gold standard method for the quantitation of mAbs [10]. Immunoassays are simple to perform routinely after method development has been completed; they also offer high sensitivity and high throughput capabilities. Nevertheless, these assays present some challenges: poor linearity, lack of specificity (depending on the antibody) and no internal standard. Moreover, ELISA assays can only detect the active or free and partial free form of the mAb, and do not allow identification of the total form of the mAb and metabolic alterations or post-translational modifications of the mAbs.

In order to evaluate the impact of total bevacizumab concentrations in clinical responses, we developed a highly specific LC-MS/MS assay by multiple reaction monitoring (MRM), which is an alternative technique for identification and quantification of mAb compared with ELISA [11]. The analytical strategy was designed to quantify the total fraction of bevacizumab kinetics in human plasma using a sample preparation protocol to prefractionate the plasma sample with protein-A bound pipette tips followed by a trypsin digest and LC-MS/MS analysis. Sample pretreatment is necessary for the quantitation of mAb due to the complex matrix posed by human plasma. For the first time, this validated and automated prefractionation approach was compared with a commercially available kit based on the principle of nano surface and molecular-orientation limited (nSMOL) proteolysis (Figure 1) [12] for the bioanalysis of antibody drugs. Data were normalized using SILumAb as internal standard and compared with 23 patient serum samples already dosed using homebrew ELISA assay [9]. In this study, we aimed to show that different preparation protocols can be used depending on the needs (throughput, ease of use) and that LC-MRM is ready to be used in clinical laboratories for mAbs quantification.

Materials & methods

Chemicals used

Acetic acid from Merck-Millipore (Darmstadt, FR Germany); Phosphate buffered saline (PBS) 10X from Biowest; Trifluoroacetic acid (TFA) from Sigma Aldrich (MO, USA); Sodium chloride (NaCl), Ammonium bicarbonate, Sodium hydroxide (NaOH), Hydrochloric acid (HCl) 37%, Assay MAP Cartridge Rack Protein A W5, polypropylene vial from Agilent technologies (CA, USA); Trypsin/Lys-C mix from Promega (WI, USA); Acetonitrile ULC/MS, formic acid ULC/MS, Water ULC/MS from Biosolve (Dieuze, France); Protein LoBind tubes 0.5 ml from Eppendorf (Hambourg, Germany). nSMOL kit composition from Shimadzu Corporation: Immunoglobulin collection resin 1 ml, Binding solution (Solution A), Wash solution 2 (Solution B), Reaction solution (Solution C), FG beadsTM trypsin DARTTM, and reaction stop solution (quenching liquid).

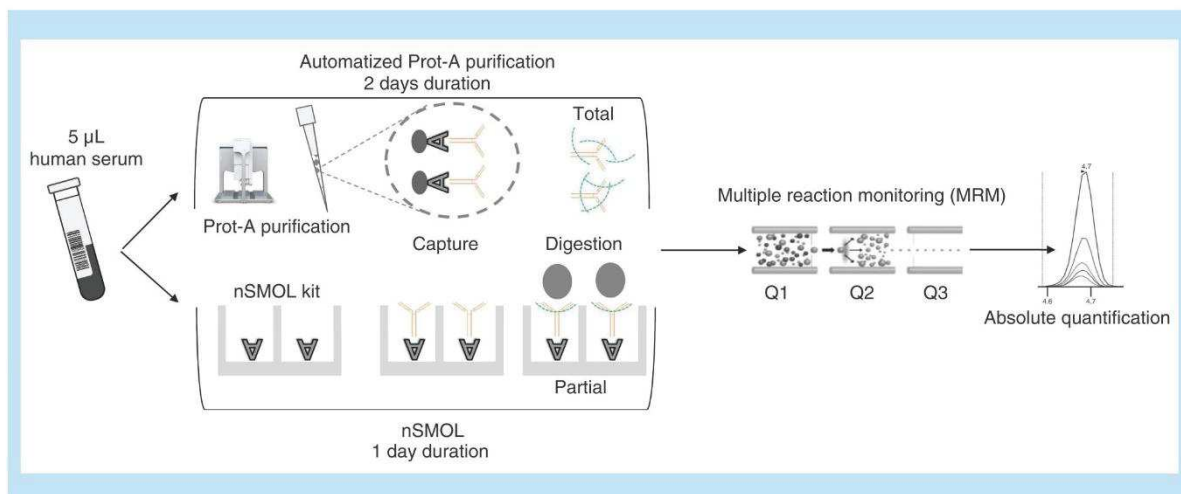


Figure 1. Sample preparation workflows: automated Prot-A purification and nano-surface and molecular-orientation limited. Each approach allow the quantification of proteotypic peptides resulting from the digestion of protein-A bound bevacizumab. Prot-A tips generate peptides from the total monoclonal antibodies; nSMOL generates peptides from the variable region (complementarity-determining region) only. nSMOL: Nano-surface and molecular-orientation limited.

Samples

Pooled serum

Pooled serum samples originated from a sample collection of patients from Montpellier neurological and Clinical Research Memory Centers (CMRR) for cognitive or behavioral disorders (Biobank officially registered # DC-2008–417). All patients provided informed consent.

Patient's samples

Serum patient samples ($n = 23$) were obtained from patients followed up at the Grenoble University Hospital for braincancer as described in Nugue *et al.*[9]. Briefly, three patients were included in this study with a combined therapy of irinotecan and bevacizumab. Bevacizumab was intravenously infused at 10 mg/kg of body weight every 2 weeks. Blood samples were taken just before bevacizumab infusion. All patients provided written informed consent for participation in this study (CBR.GSI.ENR.003 V4, Grenoble University Hospital). The informed consent document and the whole study was approved by the hospital ethics committee (Comité de Protection des Personnes).

mAb standard

SILuMAB was used as internal standard. Label incorporation was determined by the manufacturer as $> 98\%$ by MS

Lyophilized *SILuMAB* was resuspended at 100 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ according to the manufacturer instructions. After centrifugation at $10,000 \times g$, 500 μl of milliQ water containing 0.1% of formic acid was added. The preparation was mixed five-times by inversion followed by 15 min on a rotary shaker at room temperature. The prepared solution of *SILuMAB* was stored at -20°C before use. Bevacizumab solution (25 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$) (Avastin; Genentech, Inc., CA, USA) was used for the LC-MRM method and calibration curves.

Automated Prot-A purification workflow

IgG purification with protein-A tips

A total of 5 μl of serum was acidified, diluted and spiked with internal standard by adding 45 μl of buffer containing $1 \times$ PBS, acetic acid 5%, and *SILuMAB* (80 ng). IgG purification was performed using AssayMAP Protein-A W5 Cartridges on AssayMAP Bravo platform (Agilent Technologies, CA, USA) following manufacturer instructions. Briefly, an initial syringe wash was performed three-times using wash station. Then Protein A cartridges were

primed (100 μ l 1 \times PBS at 300 μ l/min) and equilibrated (50 μ l 1 \times PBS at 10 μ l/min). Samples (50 μ l) were loaded at a flow rate of 2 μ l/min, washed twice with 1 \times PBS, and eluted with HCl 12N, NaCl 100 mM (25 μ l at a flow rate of 5 μ l/min). Acid neutralization of samples was performed using 15 μ l of NaOH solution at 20 mM.

Trypsin/LysC mixed digestion

Samples obtained after IgG purification were digested using an equivalent volume of TRIS 100 mM, pH 8.5, 5 μ l of Trypsin/Lys C (1 μ g/ μ l) and incubated under constant agitation at 37°C for 24 h. The proteolysis was stopped with 3 μ l of formic acid. Sample was transferred to LCMS vial.

nSMOL workflow

IgG purification with protein-A beads

The protocol was adapted slightly from manufacturer's instructions. Briefly, 12.5 μ l of the immunoglobulin collection resin was transferred into the filter cup (0.22 μ m filter tube, Merck). Then 46 μ l of solution A containing SILuMAB (80 ng) was added and vortexed gently. A total of 5 μ l of serum sample was added and reacted for 15 min at room temperature with low speed shaking. The filter cup was centrifuged for 1 min at 10,000 \times *g* into a 2 ml waste collection tube (Sarstedt). A total of 100 μ l of solution A was added and the sample was centrifuged for 1 min at 10,000 \times *g* (repeated three-times). A total of 100 μ l of solution B was added to the filter and centrifuged with the same parameters (repeated three-times).

Limited tryptic proteolysis

The filter cup was transferred to a nSMOL reaction tube (Shimadzu Corporation). A total of 40 μ l of solution C was transferred to the filter cup. A total of 5 μ l of vortexed FG beads[®] Trypsin was added and the tube lid was closed and sealed using tape. The solution was incubated for 5 h at 50°C in a water saturated environment. A total of 2.5 μ l of quenching liquid was added to the filter cup. Seal tape was removed and the sample was centrifuged at 10,000 \times *g* for 1 min. The Eppendorf tube was placed on a magnetic stand for 1 min. The sample was then transferred to a vial for LC-MS/MS analysis.

LC-MS/MS/MS analysis

LC separation

LC separation of tryptic peptides was carried out on a Nexera XR liquid chromatography system (Shimadzu Corporation). Peptides were resolved using a reversed-phase column (Shim-pack GISSFTF-HP C18, 3 μ m, 150 \times 2.1 mm) at a flow rate of 400 μ l/min, and a temperature at 50°C. A 10 min multistep gradient was performed using solvent B (99.9% acetonitrile and 0.1% formic acid), starting with 2.7% and increasing to 19% in 1 min, to 26.1% at 6 min. At 6.1 min, the column was flushed for 2 min with 81% of solvent B and then reconditioned with 2.7% of solvent B for 2 min.

MRM analysis

Peptide analyses were carried out on a QqQ MS system (LCMS-8060, Shimadzu Corporation, Kyoto, Japan) in positive ion mode. The ESI source was set as follows: DL: 150°C, heat block: 250°C, interface: 400°C, nebulizer gas: 2 l/min, drying gas: 5 l/min, heating gas: 15 l/min. The multiple sclerosis operated in MRM mode with a maximum loop time of 636 ms. Quadrupole resolution was unit to Q1 and Q3. Collision energies (CE) and transferred parameters were optimized for all the peptide transitions of interest. LabSolutions software (version 5.86) was used for data acquisition and analysis.

Analytical validation

Blank, calibration curve & quality control sample for bevacizumab LC-MRM assays

Blank samples corresponded to LC-MS grade water injected onto the LC-MS/MS system. Calibration curves were generated using blank serum for matrix. Bevacizumab was quantified with FTFSLDTSK transition (523.25 > 797.40) and normalized using the DTLMISR transition (423.20 > 516.30).

Linearity was evaluated by measuring a ten-point calibration curve for the automated Prot-A purification (0.000; 1.957; 5.087; 10.175; 25.436; 66.240; 153.330; 306.660; 511.110 and 766.667 μ g/ml) including heavy standard (SILuTMMAB) spiked in a constant amount (80 ng). Three quality controls (QC) were used for analytical validation of automated Prot-A: 1.9565 μ g/ml (QC1); 50 μ g/ml (QC2) and 100 μ g/ml (QC3) (Supplementary Figure 1).

Linearity for nSMOL was evaluated by measuring a 12-point calibration curve (0.000; 0.269; 0.783; 1.957; 5.087; 10.175; 25.436; 66.240; 153.330; 306.660; 511.110 and 766.667 µg/ml) including heavy standard (SILu™MAB) spiked in a constant amount (80 ng). Three QCs were used for analytical validation of nSMOL: 0.26986 µg/ml (QC1); 50 µg/ml (QC2) and 100 µg/ml (QC3).

Linearity over four-orders of magnitude was evaluated by measuring a freshly prepared calibration curve each day. Calibration standards were measured three-times and each concentration was tested for outliers (Dixon test; $p = 99\%$) and normal distribution (David test, $p = 99\%$). The calibration curve was established by linear regression and validated according to the criteria of Pearson correlation $r^2 > 0.99$.

Lower limit of quantification

LLOQ was the lowest concentration of analyte in a sample which could be quantified reliably with acceptable accuracy and precision ($n = 5$).

Accuracy

The QC samples were analyzed against a calibration curve and the obtained concentrations were compared with the nominal values. Accuracy was reported as percentage of the nominal value. Accuracy was evaluated for the values of the QC samples (QC1, QC2, QC3) obtained within a single run (within run accuracy) and in different runs (between-run accuracy). Within-run accuracies were determined by analyzing five samples for QC1, QC2 and QC3, in a single LC-MS/MS batch. For the validation of between-run accuracy, QC samples from three LC-MS/MS runs were analyzed on three different days.

Precision

Precision was expressed as the CV. Precision was calculated using QC samples within a single batch run and between different batch runs. For the validation of the within-run precision, five samples per QC level in a single run were analyzed. For the validation of the between-run precision, QC samples from three batch runs were analyzed on three different days.

Selectivity, dilution integrity & carry over

The selectivity of the method was demonstrated by comparing blank serum and spiked serum. MRM chromatograms for the blank samples were analyzed for interferences in the retention time window. The effect of dilution was assessed by analysis of serum sample spiked with bevacizumab (750 µg/ml), and diluted three-, six- and nine-fold by serial dilution with blank serum. Carry-over was evaluated by analyzing blank samples directly after LC-MS/MS runs of the highest calibration standards. The matrix effect was assessed by comparison of the peak areas of the bevacizumab proteotypic peptides in serum and in ammonium bicarbonate 50 mM.

Comparison of serum bevacizumab concentration between ELISA & LC-MS/MS assays

Patients serum samples ($n = 23$) were prepared and analyzed as described above. The results were compared with the concentration values previously obtained using homebrew (i.e., developed in-house) Bioplex assay by Nugue *et al.* [9].

Data treatment & statistics

LabSolutions software (version 5.86) was used to acquire and review LC-MS/MS data. All replicate results for the calibration curves were loaded into the software. Transitions for bevacizumab (523.25 > 797.40 m/z) and SILuMAB (423.20 > 516.30 m/z) were used to calculate peak area ratios for quantitation.

Statistical analyses were performed using MedCalc® version 12.7.8.0 (MedCalc Softwares, Belgium). The Mann-Whitney test was used to compare categorical variables between groups. The significance threshold was set to $p < 0.05$.

Results

Proteotypic peptides selection

Initially, for bevacizumab quantification, four proteotypic peptides were experimentally selected based on a list of theoretical MRM transitions generated by Skyline® software. Specificity of each selected peptide was confirmed by searching against UniProtKB/Swiss-Prot human protein database. These peptides were situated at the N-terminus

Table 1. Optimized multiple reaction monitoring method and selected target compounds.

Compound group	Compound name	Precursor ion (m/z)	Product ion (m/z)	Q1 prebias (V)	Collision energy (V)	Q3 prebias (V)
SiluMab	DTLMISR	423.20	629.35	-16	-16.2	-30
SiluMab	DTLMISR [†]	423.20	516.30	-16	-16.2	-30
SiluMab	DTLMISR	423.20	385.25	-16	-16.2	-30
SiluMab	DTLMISR	423.20	217.10	-16	-16.2	-30
Bevacizumab	FTFSLDTSK	523.25	650.35	-20	-22.0	-26
Bevacizumab	FTFSLDTSK	523.25	563.30	-20	-20.0	-22
Bevacizumab	FTFSLDTSK	523.25	450.20	-32	-23.0	-14
Bevacizumab	FTFSLDTSK	523.25	335.20	-20	-28.0	-27
Bevacizumab	FTFSLDTSK [†]	523.25	797.40	-20	-17.0	-32
Bevacizumab	FTFSLDTSK	523.25	399.20	-36	-19.0	-22

[†]Quantifier transition.

part, 45–60 (VLIYFTSSLHSGVPSR) of the light chain and 45–64 (GLEWVGWINTYTGEPTYAADFK), 67–75 (FTFSLDTSK), and 76–86 (STAYLQMNSLR) of the heavy chain. These four proteotypic peptides were evaluated for the comparison of the two sample prefractionation workflows (automated Prot-A purification vs nSMOL) (data not shown). FTFSLDTSK peptide was selected as surrogate peptide for the two workflows due to its analytical performance. This peptide was also considered as surrogate peptide for bevacizumab LC–MS/MS quantification in other publications [12,13].

LC-MRM method development

For both the bevacizumab proteotypic peptide (FTFSLDTSK) and the SILuMab proteotypic peptide (DTLMISR) four MRM transitions were measured with the LC–MS/MS method (Table 1). In order to verify the specificity of the chosen proteotypic peptide, we analyzed control serum from patient without any cure (bevacizumab) considered as ‘blank’ serum (Supplementary Figure 2). As DTLISR peptide contains methionine residue, we carefully checked, before SILuMab aliquoting and storage, the specific transitions corresponding to the oxidized form of the peptide using LC-MRM analysis. If no peaks were detected, the standard was qualified for the analysis. Surrogate peptides were selected as the most sensitive, accurate and reliable transitions resulting in the selected transition 523.26 > 797.40 for FTFSLDTSK and 423.20 > 516.30 for DTLISR. The MRM method was optimized for CE, Q1 and Q3 voltages using LabSolutions software. CE, Q1 and Q3 pre-bias were optimized for each transition of bevacizumab peptide in order to obtain the most sensitive method (Table 1). Specificity of the method was confirmed by validating the absence of interference peaks in blank serum at the specific retention time (4.65 min) of bevacizumab. The total duration of the LC–MS/MS run was 10 min which is comparable to other high throughput clinical analyses.

Analytical validation

LLOQ was evaluated using calibration curves and determined with independently prepared and analyzed QC samples (variability <20%). For the automated Prot-A purification workflow, the LLOQ was 1.9565 µg/ml with a precision of 1.7% and accuracy of 115.8% (Table 2). For the nSMOL workflow, the LLOQ was 0.26986 µg/ml with a precision of 1.0% and accuracy of 109.5%.

The calibration curves were established using linear regression and validated according to the criteria of Pearson correlation $r^2 > 0.99$ (Figure 2). The automated Prot-A purification workflow measured linear MS response from 1.957 to 766.667 µg/ml ($y = 1.0918x + 10.8395$) with an r^2 of 0.9959. The RSD for all calibration curve points was 22.90%, an average CV of 2.6% and an average accuracy of 100.6%. For the nSMOL workflow, linearity was measured from 0.269 to 766.667 µg/ml ($y = 1.0439x + 60.1451$), with an r^2 of 0.9970, a RSD for all calibration curve points was 20.80%, an average CV of 3.1% and an average accuracy of 101.6%.

Accuracy and precision were evaluated based on the values obtained with three QC samples (QC1, QC2, QC3) within a single batch run (within run accuracy: $n = 5$) and for different batch runs (between-run accuracy: 3 runs on 3 days). QC1 corresponded to the LLOQ for both workflows (0.26986 µg/ml for nSMOL and 1.9565 µg/ml for automated Prot-A purification), QC2 corresponded to 15 µg/ml, and QC3 corresponded to 100 µg/ml (Table 2).

Table 2. Analytical validation of the LC-multiple reaction monitoring method for bevacizumab quantification using automated Prot A capture and nano-surface and molecular-orientation limited preparation.

Sample preparation	Within-run precision (%)	Within-run accuracy (%)	Between-run precision (%)	Between-run accuracy (%)
Automated Prot A capture				
QC1	1.7	115.8	8.5	103.9
QC2	1.7	101.4	2.5	106.1
QC3	3.5	89.2	2.5	86.6
nSMOL				
QC1	1.0	109.5	9.1	101.2
QC2	4.5	98.1	4.9	92.1
QC3	4.5	102.8	2.9	101.1
QC1 corresponded to LLOQ.				

Stability of the samples stored in the autosampler at 4°C for two days was evaluated and showed no significant differences (<20%). The absence of carry-over effects was confirmed by analyzing blank (LC–MS grade water) LC-MRM chromatogram following the highest calibration point injection. Dilution integrity of the samples was evaluated showed a consistent linear regression coefficient ($R^2 > 0.99$). Matrix effects were assessed by comparing LC-MRM peak areas obtained with bevacizumab spiked at 100 µg/ml in serum for both protein-A workflows and spiked in ammonium bicarbonate. Peak areas obtained for automated Prot-A purification workflow were found to be 82% lower than those recorded with the calibration solution and 74% lower for nSMOL workflow.

LLOQ and ULOQ of Homebrew ELISA developed by Nogue *et al.* were determined as 0.008 and 1 mg/l, respectively. Variability was evaluated on 15 independent assays. CV of 6% were obtained for LLOQ and 12% for ULOQ. HLOQ, LLOQ, CV and inaccuracy were also calculated using a series of 15 independent assays. The CV varied from 6 to 25% over the 0.001 mg/l to 6 mg/l range and remained below 15% from 0.008 to 6 mg/l. LLOQ and LHOQ were determined respectively as 0.008 and 1 mg/l and inaccuracy was 1.48%.

Patient samples analysis

A total of 23 serum samples corresponding to three patients treated during 112, 112 and 154 days with a combined therapy of irinotecan and bevacizumab were processed using automated Prot-A purification and nSMOL workflow. LC–MS/MS results were compared with bevacizumab concentrations initially determined using immunoassay based on suspension array technology [9]. Bevacizumab concentrations measured by LC–MS/MS were found to be significantly higher than those measured by the Bioplex assay ($p < 10^{-4}$) (Figure 3). The median levels obtained for nSMOL, automated Prot-A purification and Bioplex were of 192.63 µg/ml [min < LOQ; max 307.45 µg/ml], of 250.60 [min < LOQ; max 528.29 µg/ml] and of 162.05 µg/ml [min < LOQ; max 289.39 µg/ml] respectively. Within the limit of this patient study, bevacizumab serum concentrations were plotted for each analytical method following drug administration cycles for each patient (Figure 4). Pharmacokinetic profiles obtained with the two protein-A methods and Bioplex were compared showing broadly similar results for the three approaches with cycle-8 corresponding to the apex dose (Figure 4).

In terms of patient serum bevacizumab concentration, several differences were observed between patients. For patient-1, higher concentrations were found with the automated Prot-A purification whereas nSMOL workflow and Bioplex had similar results. For patient-2, results were very similar for the three assays. For patient-3, both protein-A based workflows showed similar concentrations but Bioplex measured lower levels. For the last two cycles nSMOL workflow exhibited lower concentrations compared with the automated Prot-A purification.

Discussion

For this study, we developed and validated a simple, sensitive, accurate and rapid MS method allowing quantification of the total form of bevacizumab in human serum. Our LC–MS/MS method combined automated protein-A purification, Trypsin/LysC mixed digestion and quantification using targeted MS (LC-MRM mode) in the presence of an internal standard, SILumAb. We performed an analytical comparison of this in-house protocol with a commercially available kit (nSMOL) previously validated for mAbs capture and proteolysis [14,15].

Quantification of mAbs is of clinical importance but few methods have currently been proposed. Indeed, most mAbs display a large PK interindividual variability that could be correlated to clinical response, as it has been

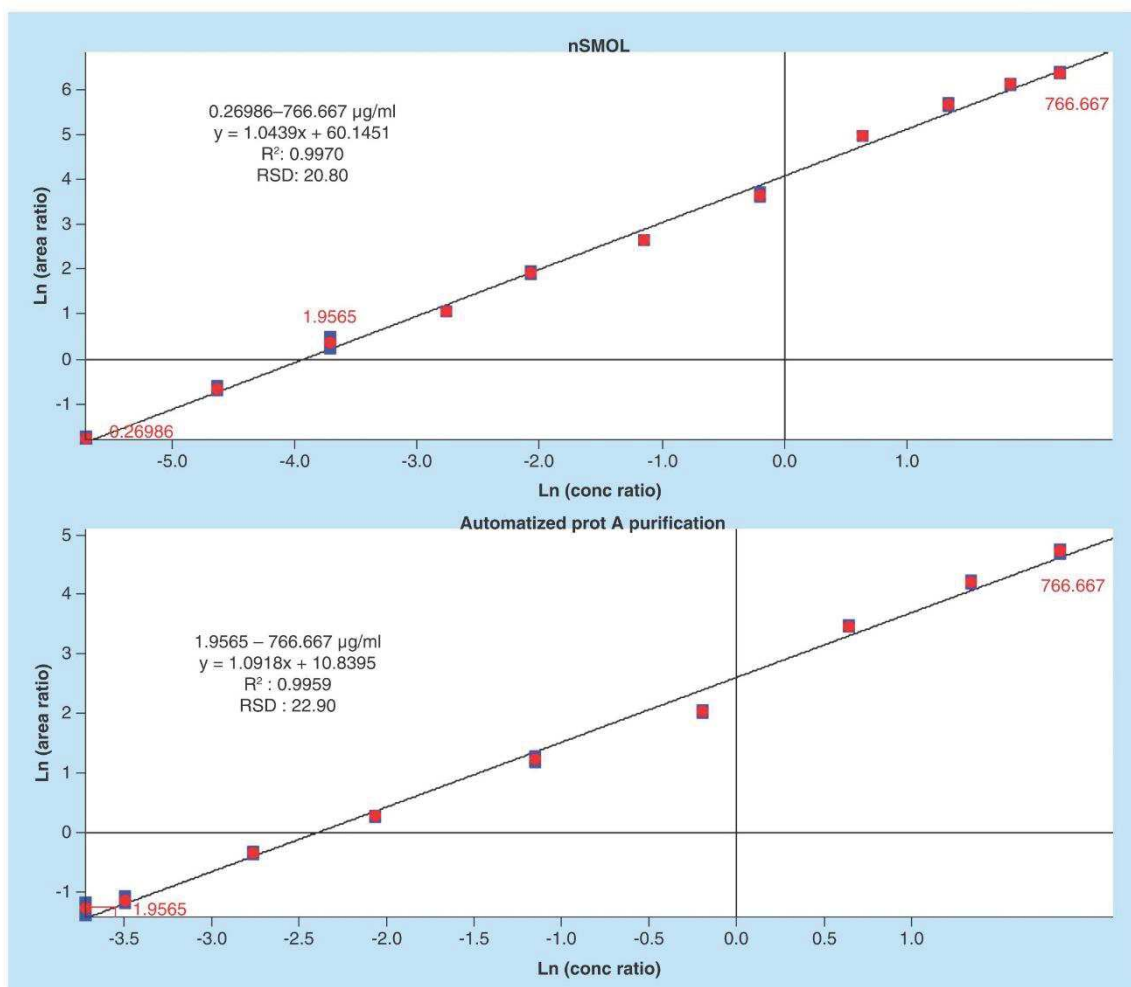


Figure 2. Calibration curves obtained with Automatized Prot-A purification and nSMOL workflows six repetitions; ten-point calibration curve for the automatized Prot A immunopurification (0; 1.9565; 5.087; 10.175; 25.436; 66.24; 153.33; 306.66; 511.11 and 766.667 µg/ml) and 12-point calibration curve for nSMOL (0; 0.26986; 0.7826; 1.9565; 5.087; 10.175; 25.436; 66.24; 153.33; 306.66; 511.11 and 766.667 µg/ml).

suggested in particular for bevacizumab, a humanized immunoglobulin IgG monoclonal antibody targeting VEGF. Nugue *et al.*^[9] pointed out the high interindividual variability in terms of blood concentrations and showed that blood concentrations above the median were associated with side effects, whereas values below the median favor inefficacy. More recently, Caulet *et al.*^[6] showed a relationship between serum concentrations of bevacizumab and clinical efficacy in mCRC, suggesting a longer survival with a bevacizumab concentration above 15 mg/l 14 days after the first administration of bevacizumab. Nevertheless, these studies used ELISA based assays, considered as the standard method for mAbs quantification, only allowing quantification of the free form of bevacizumab. Until now the role of the total form in therapeutic drug monitoring of mAbs is unknown and dedicated analytical methods are needed to accurately measure the total concentration.

The development of our in-house automated protein-A purification/LC-MRM method and the nSMOL protocol both allow quantification of the total form of bevacizumab in human serum. Quantification results showed

Figure 3. Bevacizumab concentrations comparison between nano-surface and molecular-orientation limited, automated Prot-A purification and Bioplex ELISA.

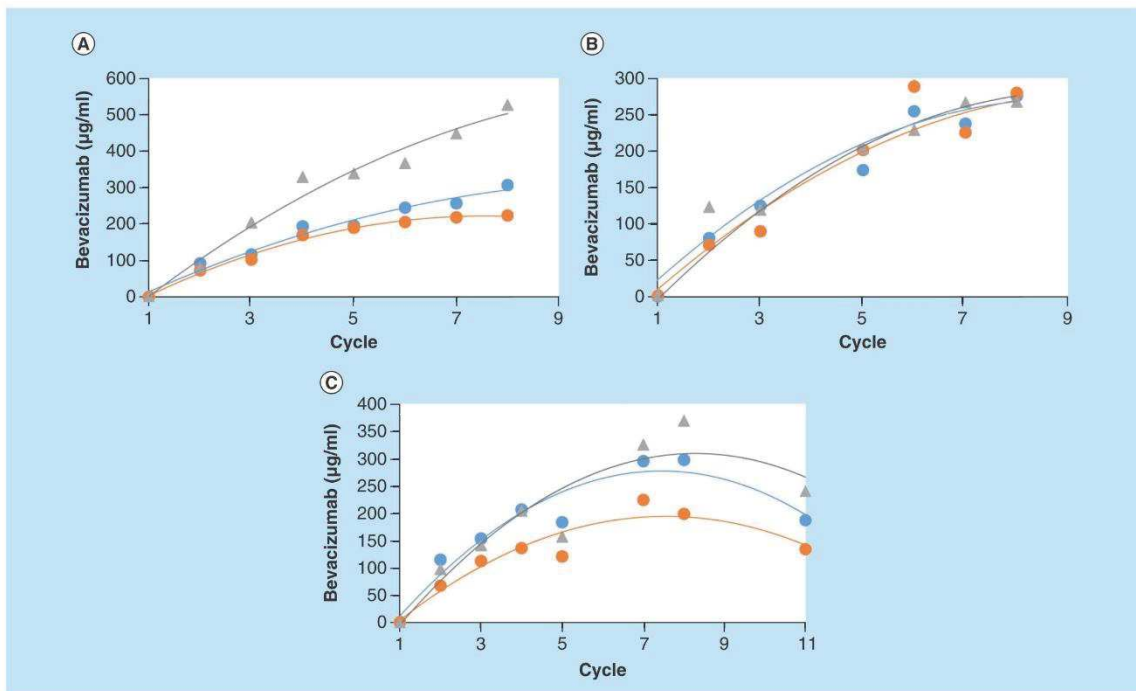
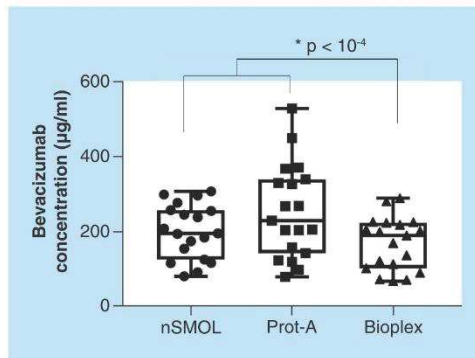


Figure 4. Bevacizumab quantification on serum samples from three patients (A, B, C). Value for nSMOL preparation (blue), Automated protein-A (gray), and Bioplex (orange). nSMOL: Nano-surface and molecular-orientation limited.

that levels measured with the LC-MRM method were significantly higher than those measured with the ELISA based assay (Figure 3). This result could be explained by the hypothesis that the LC-MRM method quantifies the total form of the mAb while the ELISA assay only allows the quantification of the free forms but further analysis on larger datasets are mandatory to conclude this point. Quantification results obtained for nSMOL and Bioplex exhibited a lowest point dispersion compared with the automated Prot-A purification. This phenomenon could be explained by the added elution steps necessary for this workflow.

Indeed, in proteomics experiments, matrix effect can drastically modify the results. To normalize matrix effect and the variability occurring during the sample preparation, internal standard is commonly used. Unfortunately, labeled Bevacizumab was not commercially available and for our development we used SllumAb, which is recognized as

an ‘universal standard’ for mAb assays. During the process, SIlumAb was spiked directly in the patient serum to normalize all the sample preparation steps including protein-A capture and elution. In theory, additional step like elution for protein-A variability should be normalized using SIlumAb. Experimental data showed that CVs were found to be higher. That means that if SIlumAb is a good internal standard, it is not perfect and in order to obtain better CVs, labeled Bevacizumab (with the same physicochemical properties) should be required.

Proteotypic peptides were first identified and (FTFSLDTSK) was selected for the quantification in agreement with previously published work and has been shown to exhibit no interference with human plasma [12,13]. This peptide is situated on the heavy chain of the complementarity-determining regions 2 part of the variable chains and is specific to bevacizumab.

Comparison of the LLOQ for both LC-MRM methods showed that nSMOL protocol exhibited better sensitivity (0.2698 vs 1.9565 µg/ml) comparable to the LLOQ of ELISA assays. Interestingly, the nSMOL method, which is designed as a solid–solid proteolysis for Fab-selective limited proteolysis, resulted in higher dynamic range than the automated prot-A purification which performs conventional tryptic proteolysis regarded as fully digesting the purified mAb.

Both LC-MRM methods were linear up to the highest calibration standard (766.67 µg/ml) which was higher compared with the ELISA assay (<200 mg/l). In this study, we quantified total bevacizumab in 23 patient serum samples and we observed concentrations up to 307.44 demonstrating the need for a wider dynamic range. It is also important to consider the dynamic range obtained with the PK studies from the viewpoint of the added practical clinical significances.

A further point of differentiation between ELISA and LC–MS/MS methods is the inclusion of internal standards in LC–MS/MS which helps to enhance precision and accuracy in the method. In this work, SILu™MAB, a stable isotope labeled universal monoclonal antibody standard, was used for mAbs absolute quantification [16,17]. The advantage of this approach lies in the generic nature of this stable isotope labeled full-length IgG1-κ antibody opening opportunities for its use in other mAb quantitative methods. While a labeled corresponding antibody would be the preferred internal standard, the cost and availability limit its application in routine analysis. By including a stable isotope labeled full-length IgG1-κ antibody as an internal standard, differences in sample preparation are corrected and this may help to improve the accuracy and reproducibility of the LC–MS/MS assay therefore only requiring a single analytical run (unlike ELISA which often requires duplicate analysis to confirm the result is within 20% CV).

Finally, we observed that patient values were found to be higher for protein-A workflow only in patient 1 samples (Figure 4) compared with the two other. We had access to only three patient kinetics for the clinical validation and then we wonder that something occurred on the serum of this patient. Larger cohort of patient kinetics is mandatory to figure out what occurred for this patient.

What sample preparation method should be chosen for mAbs quantification?

In this study, we compared an in-house protocol developed using the AssayMAP Bravo platform (an automated protein-A purification and Trypsin/LysC mixed digestion; Agilent Technologies) with a ready-to-use commercial kit (nano-surface and molecular-orientation limited (nSMOL) proteolysis, which is a Fab-selective limited proteolysis approach; Shimadzu Corporation) (Table 3). The first observation concludes that both sample preparation strategies are broadly similar in terms of quantitative performance, linearity ($r^2 < 0.996$) and reproducibility (<6%), and that nSMOL results in higher sensitivity. The second observation relates to the ease of use. The nSMOL kit is a userfriendly method protocol which is relatively quick (less than a day in this study) whereas the fully automated method may require a higher skill level to use and maintain. The automated protein-A purification is better suited to high sample numbers however it is also slower due to the longer tryptic proteolysis step with sample processing time taking 2 days. Both methods use a limited sample volume.

Conclusion

To conclude, in this study, the analytical comparison of the automated protein-A purification protocol with the commercially available kit (nSMOL) gave relatively similar results given the low number of patient analyzed. Obviously, further analysis and data is needed to confirm the differences obtained between the LC–MS methods and the reference ELISA used by Nugue *et al.* There were however clear advantages of quantifying by LC–MS/MS compared with homebrew ELISA when considering the method development times of the different assays. Based on the overall result obtained, we showed that LC-MRM is more flexible, robust and can be multiplexed compared

Table 3. Comparison of monoclonal antibody (bevacizumab) preparation strategies.

	Automated prot-A purification	nSMOL
Analytical performances		
LLOQ	1.9565 µg/ml	0.26986 µg/ml
Repeatability	2.30%	3.30%
Reproducibility	4.50%	5.60%
Sample processing		
Number of samples in parallel	96	24
Liquid handling	Automated	Manual
Workflow	Training needed	User friendly
Technician	Dedicated and trained people	Open access
Time	<1 day	<2 days

nSMOL: Nano-surface and molecular-orientation limited.

with the homebrew ELISA method. With LC–MS/MS, the same internal standard protein (SILumAb) has been validated for different assays. LC–MS/MS analysis can benefit both high and low throughput challenges for clinical laboratories. High throughput can be tackled by multiplexing, therefore reducing the time taken measuring standards and QCs. Low sample volumes equally benefit from multiplexing because sample preparation and analysis are the same for different target compounds. We showed here that LC–MS/MS is a method of choice for mAbs quantification in clinical environment regardless of the sample preparation chosen.

Future perspective

The study results presented in this paper is the first report comparing two different methods of sample preparation for LC–MS/MS quantification of bevacizumab in human serum. This preliminary study may require more experimental data but patient samples are currently difficult to obtain. We already planned to analyze a larger cohort of patient kinetics in order to clinically validate our LC–MS/MS approach. Based on protein-A purification, the two methods described herein exhibit different advantages: throughput for automated protein-A purification and ease of use/sensitivity for nSMOL. Both methods giving satisfactory reliability and sensitivity to support PK evaluations of antibody drugs and having the advantage of being applicable to any other therapeutic monoclonal IgG. With the use of internal standards, LC–MS/MS is a bioanalytical method that can fulfil the clinical guidelines requirements and represent the future for PKs studies of mAbs. LC–MS/MS is undeniably a complementary approach to ELISA methods that quantify free or partially free fraction of mAb but provide a new dimension with the possibility of multiplexing and also overcome bias previously reported with ELISA assays.

Executive summary

Background

- The application of the LC-MRM MS approach to monoclonal antibodies (mAbs) quantification in serum samples.
- LC–MS/MS is a breakthrough technology in the clinical field.
- There are considerable analytical advantages of using LC–MS/MS for mAbs follow-up in cancer cure.

Experimental

- Analytical comparison of automated prefractionation approach with a commercially available kit based on the principle of nano-surface and molecular-orientation limited proteolysis for the bioanalysis of antibody drugs in serum samples.

Results

- Analytical comparison of LC–MS/MS methods produced broadly similar results given the low number of patients analyzed.

Conclusion

- LC–MS/MS was the method of choice for mAbs quantification regardless the sample preparation method chosen due to better accuracy, dynamic range, specificity and flexibility for multiplexing assays.

Author's contributions

Please list the contributions of each author to the piece; please refer to the Author Disclosure Form for our authorship criteria. J Vialaret performed study conception and acquisition of data, drafting of manuscript. S Broutin performed study conception and design, drafting of manuscript. C Pugnier performed acquisition of data. S Santel  performed acquisition of data. A Jaffuel performed critical revision. A Barnes performed critical revision. L Tiers performed acquisition of data. L Pelletier performed critical revision. S Lehmann performed critical revision. A Paci performed study conception and design. C Hirtz performed study conception and design, drafting of manuscript.

Financial & competing interests disclosure

This work has been supported by Fondation ARC UNICANCER. The authors have no other relevant affiliations or financial involvement with any organization or entity with a financial interest in or financial conflict with the subject matter or materials discussed in the manuscript apart from those disclosed.

No writing assistance was utilized in the production of this manuscript.

Ethical disclosure

The authors state that they have followed the principles outlined in the Declaration of Helsinki for all human experimental investigations. In addition, for investigations involving human subjects, informed consent has been obtained from the participants involved.

References

Papers of special note have been highlighted as: ● of interest; ●● of considerable interest

1. Scott AM, Wolchok JD, Old LJ. Antibody therapy of cancer. *Nat. Rev. Cancer* 12(4), 278–287 (2012).
- **Evidence that monoclonal antibodies are one of the most successful and important strategies for treating patients with hematological malignancies and solid tumors.**
2. Gao B, Yeap S, Clements A, Balakrishnar B, Wong M, Gurney H. Evidence for therapeutic drug monitoring of targeted anticancer therapies. *J. Clin. Oncol.* 30(32), 4017–4025 (2012).
3. Wu JY, Wu XN, Ding L *et al.* Phase I safety and pharmacokinetic study of bevacizumab in Chinese patients with advanced cancer. *Chin. Med. J. (Engl.)* 123(7), 901–906 (2010).
4. Widmer N, Bardin C, Chatelut E *et al.* Review of therapeutic drug monitoring of anticancer drugs part two—targeted therapies. *Eur. J. Cancer* 50(12), 2020–2036 (2014).
5. Becher F, Ciccolini J, Imbs DC *et al.* A simple and rapid LC–MS/MS method for therapeutic drug monitoring of cetuximab: a GPCO-UNICANCER proof of concept study in head-and-neck cancer patients. *Sci. Rep.* 7(1), 2714 (2017).
6. Cauler M, Lecomte T, Bouche O *et al.* Bevacizumab pharmacokinetics influence overall and progression-free survival in metastatic colorectal cancer patients. *Clin. Pharmacokinet.* 55(11), 1381–1394 (2016).
7. Han K, Jin J, Maia M, Lowe J, Sersch MA, Allison DE. Lower exposure and faster clearance of bevacizumab in gastric cancer and the impact of patient variables: analysis of individual data from AVAGAST phase III trial. *AAPS J.* 16(5), 1056–1063 (2014).
8. Ternant D, Ceze N, Lecomte T *et al.* An enzyme-linked immunosorbent assay to study bevacizumab pharmacokinetics. *Ther. Drug Monit.* 32(5), 647–652 (2010).
9. Nugue G, Bidart M, Arlotto M, Mousseau M, Berger F, Pelletier L. Monitoring monoclonal antibody delivery in oncology: the example of bevacizumab. *PLoS ONE* 8(8), e72021 (2013).
- **Development of bevacizumab ELISA assay with a broad sensitivity for the follow-up of patient during treatment.**
10. Ezan E, Bitsch F. Critical comparison of MS and immunoassays for the bioanalysis of therapeutic antibodies. *Bioanalysis* 1(8), 1375–1388 (2009).
11. Hirtz C, Vialaret J, Gabelle A, Nowak N, Dauvilliers Y, Lehmann S. From radioimmunoassay to mass spectrometry: a new method to quantify orexin-A (hypocretin-1) in cerebrospinal fluid. *Sci. Rep.* 6, 25162 (2016).
12. Iwamoto N, Umino Y, Aoki C, Yamane N, Hamada A, Shimada T. Fully validated LCMS bioanalysis of Bevacizumab in human plasma using nano-surface and molecular-orientation limited (nSMOL) proteolysis. *Drug Metab. Pharmacokinet.* 31(1), 46–50 (2016).
13. Legeron R, Xuereb F, Chaignepain S *et al.* A new reliable, transposable and cost-effective assay for absolute quantification of total plasmatic bevacizumab by LC–MS/MS in human plasma comparing two internal standard calibration approaches. *J. Chromatogr. B. Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.* 1070, 43–53 (2017).
- **LC–MS/MS method for absolute quantification of bevacizumab using two internal standards.**
14. Iwamoto N, Takanashi M, Hamada A, Shimada T. Validated LC/MS bioanalysis of rituximab CDR peptides using nano-surface and molecular-orientation limited (nSMOL) proteolysis. *Biol. Pharm. Bull.* 39(7), 1187–1194 (2016).

15. Iwamoto N, Shimomura A, Tamura K, Hamada A, Shimada T. LC-MS bioanalysis of Trastuzumab and released emtansine using nano-surface and molecular-orientation limited (nSMOL) proteolysis and liquid-liquid partition in plasma of Trastuzumab emtansine-treated breast cancer patients. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 145, 33–39 (2017).
16. Li H, Ortiz R, Tran L *et al.* General LC-MS/MS method approach to quantify therapeutic monoclonal antibodies using a common whole antibody internal standard with application to preclinical studies. *Anal. Chem.* 84(3), 1267–1273 (2012).
17. Furlong MT, Ouyang Z, Wu S *et al.* A universal surrogate peptide to enable LC-MS/MS bioanalysis of a diversity of human monoclonal antibody and human Fc-fusion protein drug candidates in pre-clinical animal studies. *Biomed. Chromatogr.* 26(8), 1024–1032 (2012).

5.3 Conclusions et nouveaux éléments

Le dosage du Bevacizumab a été réalisé au laboratoire dans le contexte d'une collaboration avec l'institut Gustave Roussy et plus précisément le docteur Angelo Paci. Cette collaboration a permis de mettre en place deux approches permettant de quantifier des anticorps par spectrométrie de masse :

- une solution robotisée basée sur des cartouches protéine A pour un coût environné de 37,1 euros le point
- une approche basée sur la technologie nSMOL pour un coût environné de 74,7 euros le point.

Au sein du laboratoire, ces approches génériques ont permis de doser le Bevacizumab ainsi que deux autres anticorps thérapeutiques. De plus, des dosages multiplex sont réalisables avec ces approches comme, par exemple, le dosage multiplex du Bevacizumab, Nivolumab, et Pembrolizumab [303].

D'un point de vue pratique, ces deux approches n'ont pas apporté pas les mêmes avantages. Pour un laboratoire possédant déjà la solution d'automatisation, la réalisation de projet sur cartouche protéine A est facile à mettre en œuvre car elle est automatisée et permet un débit d'analyse important. Un personnel formé à l'utilisation du robot est nécessaire. Pour des collaborateurs ou des laboratoires non équipés de cette solution d'automatisation, l'utilisation de kit nSMOL est une très bonne alternative car elle très facile à utiliser même pour du personnel non formé à la préparation d'échantillon protéomique, et de ce fait très robuste. Cependant, l'utilisation de ce kit a un coût plus élevé.

Concernant le Bevacizumab, quelques précisions ont pu être apportées par rapport à l'article. Le choix du peptide « quantifier » a été réalisé avec la plus grande précaution. Cette molécule bien caractérisée avant injection, pourrait subir de nombreuses modifications (PTMs et troncations) après administration. De plus, la digestion trypsique pourrait être affectée par ces modifications, et les peptides générés pourraient avoir des stabilités différentes pendant l'étape de digestion. Pour ce faire, 4 peptides spécifiques ont été dosés lors d'une première étude : VLIYFTSSLHSGVPSR [45-60] sur les chaînes légères ; et sur les chaînes lourdes GLEWVGWINTYTGEPTYAADFK [45-64] ; FTFSLDTSK (avec et sans coupure manquée RFTFSLDTSK) [67-75] ; STAYLQMNSLR (avec et sans oxydation de la méthionine) [76-86].

Des résultats corrélés entre les quatre peptides ont été obtenus sur les dosages de patients ce qui démontre que des modifications *in-vivo* n'ont pas lieu ou n'affectent pas la quantification de cette molécule (Tableau 6).

Tableau 6: Etude de corrélation des différents peptides dosés sur 94 échantillons.

		GLEWVGVWINT YTGEPTYAADF K	RFTFSLDTSK	STAYLQMNSLR	STAYLQMoxNSLR	VLIYFTSSLHSGVP SR
FTFSLDTSK	Correlation coefficient	0,919	0,889	0,932	0,738	0,864
	Significance Level P	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001
	n	94	94	94	94	94

Lors de la validation analytique, deux peptides ont obtenu des performances analytiques supérieures : FTFSLDTSK et GLEWVGVWINTYTGEPTYAADFK. En cours d'étude, deux publications ont été publiées sur cette molécule utilisant le même peptide «quantifier» FTFSLDTSK [124, 304] que celui que nous avons retenu.

La quantification de ces quatre peptides protéotypiques distribués sur la séquence de l'anticorps a aussi permis de comparer plus en détail les deux approches se basant sur la protéine A. Dans le cas des cartouches protéine A (AssayMap), la digestion est réalisée en solution avec une enzyme, un ratio enzyme/protéine, un tampon, une durée, et une température bien définis. Dans le cas de l'approche nSMOL, les paramètres précédemment listés étaient différents et généraient les peptides protéotypiques avec des rendements différents. Par conséquent, la vérification expérimentale du peptide «quantifier» a été nécessaire. Dans ce cas particulier, le peptide FTFSLDTSK était toujours bien généré dans les deux situations, ce qui confirma la sélection de celui-ci.

Par ailleurs, la comparaison de méthodes a été réalisée sur 3 patients dans la publication, mais sur ce projet, une cohorte de 15 patients a été suivie ce qui représente 96 échantillons au total. Les résultats qui ont été obtenus étaient bien corrélés avec le dosage Bioplex [305].

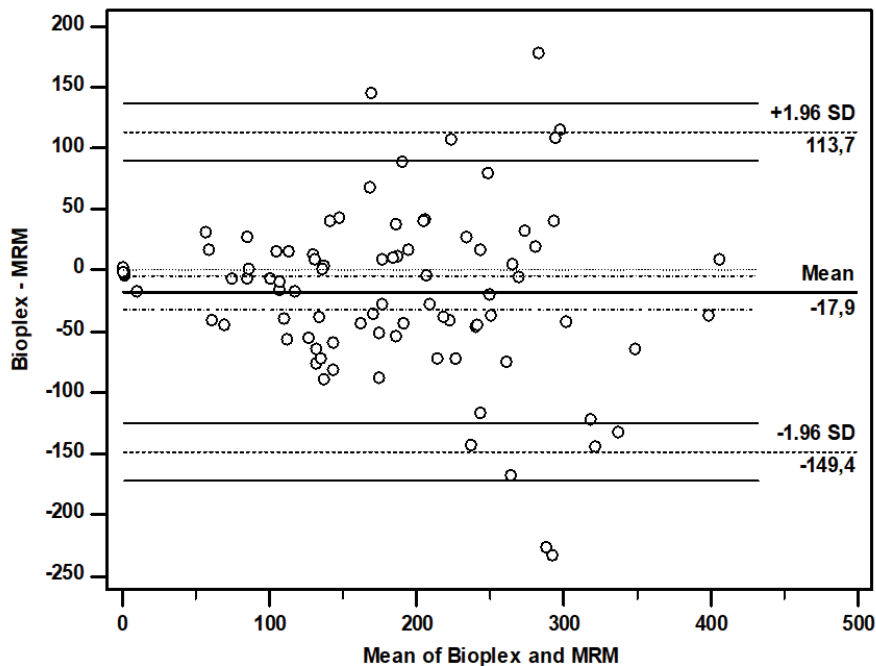


Figure 55: Représentation Bland-Altman des valeurs de dosage obtenues par Bioplex et par MRM.

La comparaison des concentrations obtenues entre les deux approches a été réalisée par une évaluation de la concordance de Bland et Altman (Figure 55). Cette évaluation a montré un faible biais de -17,9 indiquant des valeurs obtenues supérieures avec la méthode MRM. La précision diminue dans les valeurs de fortes concentrations même si les points, restent dans les limites de concordance ; exception faite des 4 outliers.

Nugue *et al.* [305] ont développé un essai Bio-plex basé sur du VEGF immobilisé sur des billes magnétiques. Ce dosage a permis donc de doser la fraction capable de lier l'antigène. Dans la publication originale, les auteurs ont été capables de stratifier les patients en fonction de leur niveau de Bévécizumab sérique et l'efficacité de leur traitement (Figure 56).

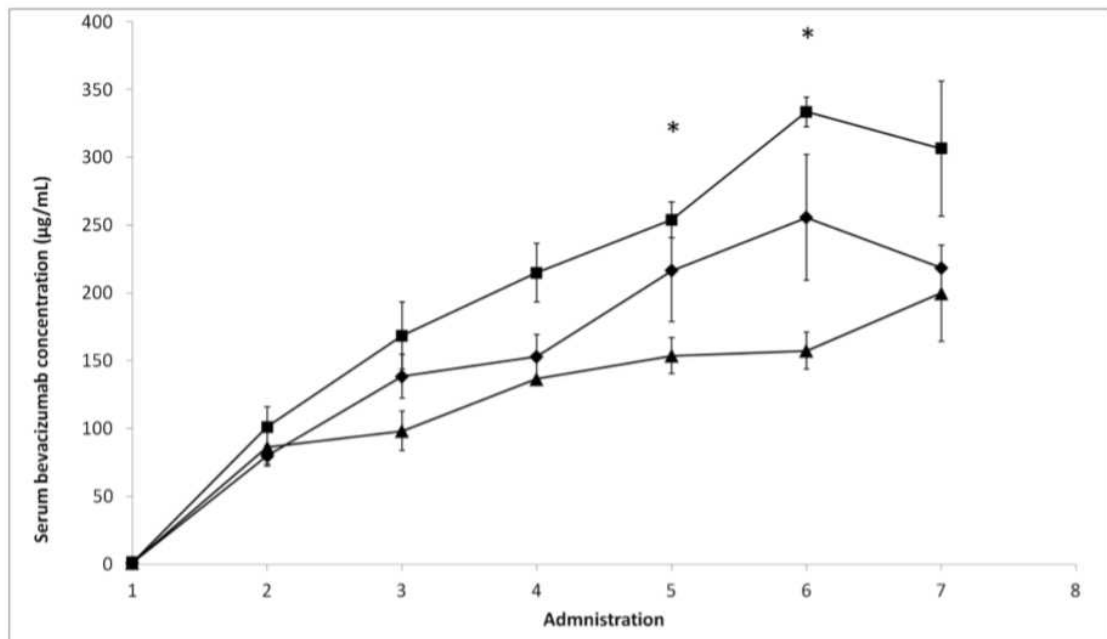


Figure 56: Concentration de Bévécizumab sérique en fonction des cycles de traitements. Le carré correspond à la médiane des patients avec effets secondaires (n=5); le triangle correspond à la médiane des patients avec rechute (n=4); le losange correspond à la médiane des patients répondant favorablement au traitement (n=4).

Cette stratification n'a pas été concluante à partir des données générées par nos approches suggérant une quantification totale du Bévécizumab.

Le dosage du Bévécizumab a pu être réalisé dans du sérum de patients atteints de glioblastome à partir de deux méthodologies différentes qui ont été validées. Les deux approches ont des avantages et inconvénients différents pour une utilisation routinière.

Ces méthodologies « généralistes » car permettant une purification d'anticorps non-spécifique a pu être appliquée à d'autres anticorps et pourrait l'être dans une analyse multiplex. La comparaison avec une autre approche basée sur une capture *via* l'antigène n'a pas permis d'obtenir des résultats strictement similaires.

6 Chapitre 5 : Développement et validation de méthodes de protéomique innovantes pour des applications de biochimie clinique : discussions/conclusions

6.1 Le phénotypage de l'Apolipoprotéine E, facteur de risque de la maladie d'Alzheimer

Une méthode de phénotypage de l'apolipoprotéine E à partir d'un faible volume de sang basée sur de la spectrométrie de masse a été mise en place en 2016. Dans le but de gagner en débit et en reproductibilité, ce protocole a été raccourci et automatisé. La nouvelle version de ce protocole est aujourd'hui compatible en termes de temps, de débit et de coût, avec une analyse de routine.

L'intérêt de développer une méthode analytique compatible avec une utilisation de routine est une anticipation des besoins futurs.

En 1993, l'ApoE4 a été identifié comme le facteur de risque génétique principal de la maladie d'Alzheimer. Il n'existe pas à ce jour de traitement préventif de la maladie d'Alzheimer aussi le fait de connaître son phénotype ApoE ne conduit pas à des mesures préventives spécifiques de la maladie. Cependant le phénotypage ApoE est actuellement réalisé dans le cadre de la recherche clinique sur la maladie d'Alzheimer pour mieux comprendre cette maladie et pour développer des traitements efficaces en stratifiant mieux les groupes de patients.

D'importants efforts sont en cours pour développer un test sanguin pour évaluer le risque d'une personne à développer la maladie d'Alzheimer. Deux publications récentes ont démontré la faisabilité de ce test et sa capacité à indiquer un facteur de risque plus précocement dans l'évolution de la pathologie [306, 307]. Les résultats de ces études ont été plus performants en incluant le phénotype ApoE comme variable ce qui a rendu l'analyse de celui-ci indispensable à partir de la même prise de sang.

A l'intérieur du protocole développé, l'utilisation de peptides marqués est cruciale dans le but d'automatiser aussi la partie interprétation des données. La co-élution stricte va permettre d'intégrer plus facilement le pic par les logiciels de retraitement de données (Figure 57).

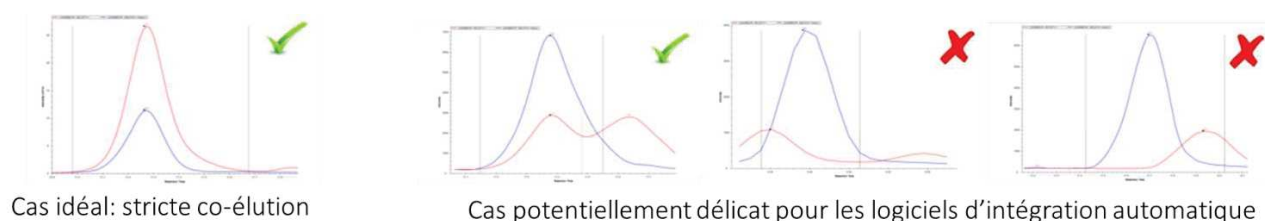


Figure 57: Exemple de rapport fourni pour montrer la présence du peptide cible (en rouge) confronté au peptide standard (bleu). La coche verte indique si la présence du peptide a été validée, et la croix rouge indique l'opposé.

Les ratios de transition ont aussi été utilisés par les logiciels de quantification pour « identifier » les analyses potentiellement problématiques (Tableau 7).

Tableau 7: Ratio de transition pour les différents peptides d'ApoE. Le ratio de transition a été calculé sur les peptides marqués spikés dans 30 plasmas de patients différents

Compound Name	Precursor Ion	Product Ion	Transition ratio
LGADMEDVCGR	611,8	981,0	0,63 ± 0,02
LGADMEDVCGR	611,8	866,0	0,52 ± 0,02
LGADMEDVCGR	611,8	735,0	1,00
CLAVYQAGAR	554,8	764,4	0,76 ± 0,02
CLAVYQAGAR	554,8	665,3	1,00
CLAVYQAGAR	554,8	502,3	0,26 ± 0,01
LGADMEDVR	503,5	835,4	0,76 ± 0,04
LGADMEDVR	503,5	764,3	1,00
LGADMEDVR	503,5	649,3	0,71 ± 0,03
LGADMEDVR	503,5	518,3	0,52 ± 0,03
LAVYQAGAR	475,0	764,4	0,93 ± 0,08
LAVYQAGAR	475,0	665,3	1,00
LAVYQAGAR	475,0	502,3	0,54 ± 0,04

La présence du peptide marqué permet de démontrer grâce à la réponse en spectrométrie de masse et au temps de rétention chromatographique que l'analyse LC-MS a fonctionné. L'approche de référence pour contrôler toutes les étapes du protocole consiste en l'ajout de PSAQ mais l'ApoE marquée n'est malheureusement pas disponible. Wang *et al.* [308] ont produit leur propre ¹⁵N ApoE4 dans le but de quantifier les différentes isoformes d'ApoE.

Comme nous l'avons vu dans le chapitre 1, l'approche par spectrométrie de masse est quantitative grâce à l'utilisation de standards, ce qui est le cas dans notre approche. A la différence de Wang *et al.*, des peptides standards ont été utilisés ce qui nécessite de s'assurer que la digestion trypsique a bien été complète pour éviter d'introduire un biais à cette étape. Nos travaux et ceux de Proc *et al.* [309] ont indiqué une digestion rapide de l'apolipoprotéine. Proc *et al.* [309] ont observé un maximum de digestion à 4 heures. Nos travaux ont indiqué, suivant les peptides, un maximum entre 1 et 3 heures de digestion. A l'opposé, des digestions longues (> 14h) ont aussi été utilisées en combinaison avec des ratios élevés d'enzyme/protéine à digérer de 1/30 [310] ou 1/10 [311] contre 1/70 dans notre étude. La quantification par des SIS peptides est donc délicate à réaliser en fonction du protocole et de la cinétique de digestion.

Un autre point intéressant est que les peptides suivis pour déterminer le phénotype ApoE contiennent des acides aminés modifiables (cystéines, méthionine, et glutamine).

Pour éviter une oxydation partielle des méthionines pendant le protocole de préparation d'échantillon, une étape d'oxydation à l'aide de peroxyde d'hydrogène pendant 24 heures a été rajoutée pour obtenir une oxydation complète [310, 311]. Outre la durée, la concentration de réactif d'oxydation ont été des paramètres importants car la forme réduite, la forme mono-oxydée, et la forme dioxydée sont en équilibre. De plus, une trop forte réaction d'oxydation peut induire l'oxydation de tyrosines présentes dans deux des peptides d'ApoE.

Dans les échantillons de plasma avec le protocole de préparation de Simon *et al.* [310], une oxydation naturelle a été observée par ratio d'aire oxydée/non oxydée, en moyenne de 4%. Dans les travaux de Martinez-Morillo *et al.* [187], en moyenne 2,5% des méthionines étaient oxydées dans le plasma, et 1,5% dans le LCR. L'oxydation naturelle étant très limitée, et l'étape d'oxydation présentant beaucoup d'inconvénients (durée, production d'un mélange et de

réactions secondaires), elle n'a pas été utilisée. La quantification multiplex par spectrométrie de masse de la forme réduite et la forme mono-oxydée peut être réalisée pour éviter des erreurs de quantification.

Dans une approche de phénotypage comme dans notre étude, la forme oxydée présente en très faible quantité (<5%) n'a pas été suivie.

Une autre modification de l'ApoE possible est une déamidation des glutamines (CLAVYQAGAR ; LAVYQAGAR). Cette modification n'est pas séparée par chromatographie et est difficilement détectable sur un système quadripolaire opérant en résolution de base 0,7Th, sur des espèces di- ou tri-chargées. Le taux de déamidation qui a été trouvé après 24 heures de digestion a été d'environ 35 % suivant les peptides. Cette déamidation a affecté autant le SIS peptide spiké que le peptide endogène généré par la digestion ce qui a induit un très faible biais analytique (5%) [311].

La cystéine N-terminale a présenté une cyclisation pendant l'étape de digestion [312]. Le pourcentage de cyclisation a été en moyenne de 51% dans le LCR, 60% dans le plasma, et de 72% pour les SIS peptides. Ces pourcentages différents ont prouvé que cette modification a pu induire un biais de quantification.

Pour résumer, le phénotypage par LC-MRM a été développé dans notre laboratoire pour être compatible avec une mise en place d'analyse de routine. L'ajout de SIS peptide est réalisé pour valider les performances analytiques. A contrario, ils n'ont pas été utilisés pour doser les différents phénotypes car ces peptides ne sont pas des peptides «quantifier» (optimums de digestion variables, et de nombreuses modifications possibles). De plus, la quantification de ces différents phénotypes n'a pas aidé à différencier les patients ayant ou pas la maladie d'Alzheimer [313].

Les méthodes de phénotypage basées sur une analyse de spectrométrie de masse, ou de l'isoélectrofocalisation (hydragel) ont permis un rendu de résultats dans la journée avec une préparation d'échantillon d'une durée d'environ cinq heures.

Cette méthode est basée sur une analyse de spectrométrie de masse a été appliqué sur 150 patients dont le génotype ApoE était déjà connu. Une population volontairement éloignée de la répartition normale en phénotype ApoE a été sélectionnée pour être certain de la validité de la méthode sur les phénotypes rares que sont E2/E2 ou E4/E4. Trois patients sur les 150 ont été discordants entre le phénotype et le génotype identifiés. Les deux techniques de phénotypage ont 100% de concordance. Les échantillons ont été re-génotypés dans un autre laboratoire et un échantillon a donné le même résultat que les phénotypes, mais deux patients sont restés discordants.

D'autres études ont déjà démontré des discordances entre les résultats de génotype et de phénotype. Ce point peut constituer un frein pour le transfert du génotypage ApoE qui est la méthode de référence, vers le phénotypage ApoE.

Le phénotypage ApoE est atteignable à partir d'un faible volume d'échantillon dans des délais et des coûts compatibles avec une utilisation de routine hospitalière.

6.2 La quantification absolue de l'hepcidine dans le cadre des pathologies liées au métabolisme du fer

- Dans le chapitre 3, l'hepcidine 25 a été dosée grâce à une approche top-down qui a l'avantage dans cette application d'être simple, robuste et sensible.

L'hepcidine étant un acteur central du métabolisme du fer. Elle est impliquée dans de nombreuses pathologies liées à un déséquilibre du métabolisme comme l'anémie, l'inflammation chronique, les maladies des reins ou le cancer [269]. L'intérêt de disposer d'une méthode compatible avec une utilisation clinique est donc important.

Dans la publication présentée au chapitre 3, 24 patients répartis sur la gamme de concentration clinique ont été dosés à partir de seulement 50µL de sérum. Ce dosage s'est appuyé sur deux protocoles identiques où seulement la partie LC a été modifiée. Le but de ce travail était de comparer un système nanoLC (colonne de 0,075mm de diamètre interne avec étape de pré-chargement de l'échantillon – source nano ESI), et un système LC standard (colonne de 1mm de diamètre interne – source ESI) qui correspond plus à un mode micro-bore. La configuration LC standard a ensuite été utilisée pour plus de 13000 analyses d'hepcidine.

- Dans l'étude présentée au chapitre 3, malgré des différences présentes au niveau de la chromatographie et de la source ESI, les performances analytiques obtenues étaient proches.

La configuration nanoLC est théoriquement, et expérimentalement [314], plus sensible mais moins robuste qu'une configuration standard LC. Sur un digestat simple d'albumine humaine analysé sur les deux configurations, la configuration nanoLC a été environ 200 fois plus sensible que la configuration standard LC. Par contre, pour les dosages d'hepcidine, la LOQ trouvée a été similaire dans les deux configurations. Le système nanoLC était plus sensible mais il était aussi plus sensible pour détecter le bruit (l'effet matrice de l'échantillon). Le signal sur bruit n'a donc pas été amélioré et par conséquent les LOQ étaient proches. De plus, du bruit a sûrement été intégré avec le pic d'hepcidine ce qui est revenu à une surestimation des quantités d'hepcidine dans la configuration nanoLC. Cette surestimation a pu être observée par le facteur de corrélation (0,87) de la corrélation des dosages qui ont été obtenus avec les deux systèmes LC. Pour conclure sur cet aspect de comparaison, dans le cas d'un échantillon complexe comme du sérum seulement simplifié par une précipitation des protéines, les performances de la nanoLC n'ont pas été mises en avant comme, par exemple, sur les dosages des traces dans un échantillon propre ou très purifié.

- Dans les travaux complémentaires qui ont été réalisés pour continuer la validation de la méthode de dosage de l'hepcidine, une différence de comportement notable était présente pour l'hepcidine non marquée par rapport à l'hepcidine marquée et l'hepcidine endogène. Malgré des comportements similaires (temps de rétention, forme de pic, ratio des transitions), une différence dans les deux standards utilisés doit être présente. Ce test de stabilité a été un outil intéressant pour se rendre compte de stabilités différentes potentiellement dues à une structure tridimensionnelle différente permettant des interactions avec d'autres protéines, ou

avec les parois des contenants différentes (adsorption). Ce point pourrait être évalué lors de la caractérisation du matériel de référence primaire. Pour les points de gamme, il était préférable de re-préparer la gamme à chaque série.

Pour les stabilités d'échantillons prêts, un stockage maximum à -20°C de 8 jours étaient souhaitable. Ces phénomènes de stabilité des échantillons préparés peuvent avoir différentes explications. L'hepcidine pourrait s'oxyder en position 21. Cette oxydation a été démontrée comme dépendante de la température de la colonne LC et du temps d'attente dans le passeur d'échantillon [275].

De plus, il a été reporté que l'hepcidine était capable de se lier à l'alpha-2-macroglobuline et à l'albumine. Ce taux de liaison était variable de 3 à 89 % selon les publications [267, 315]. Il n'a pas été élucidé si cette liaison a un impact sur les performances des méthodes de quantification de l'hepcidine et sur son activité biologique [316]. L'hepcidine-25 pourrait aussi s'agréger [275, 317, 318], ou s'adsorber sur les surfaces hydrophobes [319-321].

D'autres paramètres analytiques n'ont pas été évalués mais auraient pu l'être dans la validation de méthode. L'étude de parallélisme n'a pas été effectuée et aucune publication ne référence ce paramètre. Les tests de stabilité de l'échantillon et des solutions concentrées de standard n'ont pas été réalisés. Les conditions de travail utilisées ont été rigoureuses et protectrices : stockage en aliquot dans des tubes LoBind à -80°C ; chaque aliquot est utilisé directement après décongélation et ne subit donc pas de cycle congélation/décongélation. Les tubes de standards ont été en plus filmés pour éviter toute évaporation potentielle. Les données de la littérature montrent une stabilité du plasma lyophilisé sur six mois à différentes températures [322].

Ces paramètres et ceux évalués dans la publication originale sont résumés dans le tableau 8.

L'hepcidine-25 a pu être quantifiée dans du sérum de patients à partir d'un système nanoLC et d'un système standardLC avec des performances analytiques très proches. Ces performances ont été très satisfaisantes et ont permis une utilisation à plus grande échelle sur un grand nombre de projets de recherche et d'échantillons. Au cours de ces analyses d'autres paramètres de validation comme la stabilité après préparation ont pu être évalués et d'autres ne l'ont pas été en se basant sur les données de la littérature.

6.3 La quantification sérique du Bevacizumab (mAb) par LC-MRM avec immuno-enrichissement

Depuis les dix dernières années, les anticorps monoclonaux thérapeutiques sont devenus une de classes de drogues majeures développées par l'industrie pharmaceutique. Entre 2000 et 2015, la FDA a reçu des demandes d'accréditation pour 80 anticorps monoclonaux thérapeutiques [323], et en 2014, 44 de ces molécules étaient sur le marché. Ils sont répandus aujourd'hui dans une très grande variété d'applications médicales en oncologie, pour des maladies auto-immunes et inflammatoires [285].

Dans ce travail nous avons développé et validé deux méthodes analytiques permettant le dosage du Bevacizumab dans le sérum de patients. Ces deux méthodes se différenciaient par la partie pré-analytique. La première étape de purification était basée sur une interaction de la cible avec de la protéine A, immobilisée sur deux supports différents. L'étape suivante de digestion a été réalisée aussi dans des conditions différentes. En dernière étape, l'analyse des peptides a été réalisée sur le même système analytique avec les mêmes conditions analytiques. De par la grande diversité des immunoglobulines et de par les deux différents protocoles de préparation, une attention toute particulière a été portée sur la sélection du peptide « quantifier ».

Les deux méthodes ont été validées selon les critères explicités dans le chapitre 4. Tous les paramètres évalués étaient dans les tolérances d'acceptation. La grosse différence entre les deux approches étant la sensibilité qui a été atteinte par une des deux approches.

Ces méthodes ont été appliquées sur trois patients suivis pendant leur traitement pour un cancer cérébral (glioblastome) ce qui correspondait à 23 échantillons analysés en duplicat.

Les résultats obtenus par les deux approches développées étaient statistiquement supérieurs aux dosages réalisés par une approche Bioplex. Ce phénomène est assez courant dans les publications dosant ces molécules [324, 325] car le dosage LBA (ligand Binding Assay) est souvent réalisé par immobilisation de l'antigène dont seulement la fraction de la molécule capable de lier l'antigène est dosé. A l'opposé, les approches génériques utilisant une purification par protéine A ou G permettent de doser la fraction totale de la drogue. En regardant en détail chaque patient de notre étude, des différences étaient notables entre les deux approches basées sur la LC/MS pour le patient 1, et pas pour les patients 2 et 3. Devant le faible nombre de patient il a été compliqué de trouver la cause de cette différence.

Le SILuTMMAB, a été utilisé comme standard dans notre étude et a pu avoir des rendements de capture et de digestion différents de la cible. Ces paramètres n'ont pas été complètement évalués lors de la validation analytique des deux différentes approches (cartouches protéine A, et nSMOL). Le rendement de capture du Bevacizumab sur cartouche protéine A a été le seul paramètre évalué et a donné un rendement moyen de 35%. Ce rendement faible a démontré la nécessité d'évaluer ces paramètres à l'avenir. D'ailleurs, il est intéressant de noter que ces paramètres n'ont pas non plus été évalués dans les autres articles sur ce domaine d'application [302-304]. Tous les paramètres évalués lors de la validation de méthodes ont été résumés dans le tableau 8.

Nugue *et al.* [305] ont proposé un immunodosage Bio-plex basé sur du VEGF immobilisé sur des billes magnétiques qui permettait de stratifier les patients en fonction de leur niveau de

Bévacizumab sérique et l'efficacité de leur traitement. Cette stratification n'a pas été concluante à partir des données générées par nos approches.

Ce résultat indiquait que le dosage par la méthodologie Bioplex et par l'approche développée basée sur la spectrométrie de masse ne dosaient pas la même molécule ou la même fraction de la molécule. En effet, dans l'approche développée, la fraction totale a été récupérée grâce aux interactions avec la protéine A alors que la fraction capable de lier le VEGF a été capturée sur l'approche Bioplex. Cette hypothèse pourrait être vérifiée par immobilisation du VEGF sur une cartouche du BRAVO assayMap et ainsi capturer la même fraction avec deux méthodes de détection différentes. L'hypothèse des différents ADAs (Anti-Drug Antibodies) pouvant interagir sur la capture, ou la détection (en Bioplex), est encore plus difficile à démontrer.

Pour conclure, une étape de fractionnement simple, basée sur de la protéine A, a permis grâce à la spécificité de l'analyse MS de doser avec une bonne sensibilité la molécule cible. L'avantage de cette méthodologie est d'autant plus grand pour les anticorps thérapeutiques qui sont de plus en plus humanisés et donc similaires aux protéines endogènes. Les quantités dosées peuvent différer avec d'autres méthodes de dosage, et ces variations peuvent correspondre à des fractions différentes (Liant/non liant, actif/non actif contre la cible) de la même molécule. Leurs facilités d'utilisations et leurs performances analytiques permettent d'envisager une utilisation à grande échelle.

6.4 La validation analytique d'une méthode LC-MS

La validation analytique de méthodes LC-MS est une étape indispensable pour en évaluer les performances analytiques. Dans le Tableau 8 sont rassemblés tous les tests réalisés et les performances obtenues pour les trois applications présentées durant ce travail de thèse. Tous les paramètres sauf six, sont en accord avec les tolérances données dans les recommandations FDA [326], EMA [327], et CLSI C50-A [328].

L'accès à des standards de qualité analytique voire à un matériau de référence, et à des QCs bien caractérisés et stables dans le temps sont des prérequis indispensables pour commencer une validation de méthode. La droite d'étalonnage est réalisée en fonction de la gamme des valeurs cliniques et la sensibilité de la méthode développée.

De plus, pour le dosage de biomarqueurs endogènes, des échantillons blancs ne sont pas disponibles. Des matrices « modèles » sont donc utilisées. Dans le cas des évaluations de spécificité, sélectivité, et d'interférences, six différentes sources de matrice blanches doivent être testées d'après les recommandations.

L'analyse de QCs permet d'établir le parallélisme, la répétabilité, la fidélité intermédiaire, la justesse et le taux de récupération. Les méthodes analytiques sont généralement en dessous des critères d'acceptations pour ces paramètres. La contamination des échantillons est généralement très faible et l'effet matrice est généralement très fort sur les dosages de biomarqueurs protéiques.

Par ailleurs, des échantillons répartis sur la gamme clinique sont nécessaires pour mener à bien les différents tests de stabilité. Les études de stabilité ne sont généralement pas ou peu réalisées. Pour le dosage d'hepcidine qui est l'application qui est en place depuis des années et qui est très utilisée, des études de stabilité après préparation d'échantillons ont été réalisées. Pour les autres étapes (stabilité de l'échantillon initial, stabilité des standards, ...), des protocoles bien établis basés sur l'expérience du laboratoire sur le dosage des biomarqueurs protéiques, et sont scrupuleusement respectés pour éviter tout biais.

Tableau 8: Tableau récapitulatif de tous les paramètres analytiques évalués pour les trois différentes applications qui sont hors des seuils d'acceptation

Paramètres à valider	Apolipoprotéine E	Hepcidine 25	Bevacizumab (approche manuelle)	
QC	Mix of plasma samples containing all the phenotypes	Model matrix spiked with known quantity of hepcidin	Commercial blank plasma spiked with known quantity of bevacizumab	
Standard	SIS Peptide with heavy arginine (13C6,15N4); 5pmol/μL in 5% (v/v) acetonitrile/H2O measured by AAA after resuspension; Concentration Precision 5-10%; Peptide purity >97%; isotopic enrichment >99%	Human hepcidin standard (DTHFPICIFCCGCHRSKCGMCKKT) and internal hepcidin standard (DTHFPICIFCCGCHRSKCGMCKKT) [13C6,15N4] Arg16 were purchased with a purity >97% assessed by RP-HPLC and mass spectrometry. Standard peptides were synthesized with the same amino acid sequence (25 AA) and folding (4 disulfite bridges Cys 7–23; 10–13; 11–19; 14–22) as the endogenous human hepcidin-25.	SILuMAb was used as internal standard. Incorporation was determined by the incorporation of the SILuMAb at 100 μg/μl according to the manufacturer's instructions.	
Reference Material	NA	NA	Bevacizumab solution (25 μg/ml) Genentech, Inc., CA, U.S.A.	
Droite d'étalonnage	Point de calibration unique	0,00; 5,00; 10,00; 20,00; 50,00; 100,00; 200,00 ng/mL	0.00; 0.27; 0.78; 1.96; 5.09; 10.18; 153.33; 306.66; 511.11 and 702.22 ng/ml	
	LGADMEDVC(Alk)GR* : 3,33 pmol			
	C(Alk)LAVYQAGAR* : 6,66 pmol			
	LAVYQAGAR* : 0,20 pmol			
	LGADMEDVR* : 1,25 pmol			
Linéarité	LGADMEDVC(Alk)GR	Modèle linéaire	Modèle linéaire avec une pondération 1/y	Modèle linéaire
		y = 2E+06x - 3042,5 R ² = 0.9994		
	C(Alk)LAVYQAGAR	Modèle linéaire	y = 1,1753x + 0,1443	y = 1.0439x + 60,14
		y = 398230x - 16915 R ² = 0.9998		
	LAVYQAGAR	Modèle linéaire	R ² = 0,9939	R ² = 0.9970
		y = 1E+06x - 2546,9 R ² = 0.9970		
	LGADMEDVR	Modèle linéaire		
		y = 2E+06x - 983,29 R ² = 0.9992		
Sensibilité de la méthode	LGADMEDVC(Alk)GR	LLOQ: 2,28 fmol/μL; biais 10,7%; CV 2,1%	LLOQ: 10 ng/mL; biais 13,0%; CV 6,0%	LLOQ: 0,26986 μg/ml; biais 9,5%
	C(Alk)LAVYQAGAR	LLOQ: 13,70 fmol/μL; biais 23,5%; CV 20,0%		
	LAVYQAGAR	LLOQ: 1,23 fmol/μL; biais 29,5%; CV 23,4%		
	LGADMEDVR	LLOQ: 7,72 fmol/μL; biais 10,2%; CV 17,6%		

Paramètres à valider	Apolipoprotéine E		Hepcidine 25	Bevacizumab (approche ma	
Spécificité / Sélectivité / Interférences	Analyse de la matrice blanche	NA		38,0%	
	Analyse d'échantillons blancs provenant d'au moins 6 différentes sources	NA		16,6% sur 23 échantillon	
	Analyse d'échantillons de patients	LGADMEDVC(AIk)GR	(611,76 -> 866,35) / (611,76 -> 735,31): 54,0%	(559,4 -> 645,0) / (559,4 -> 694,8): 47,9%	(523,3->650,3) / (523,3->79
			CV sur des échantillons de patients (42): 4,7 %		CV sur des échantillons de pa
			(611,76 -> 981,38) / (611,76 -> 735,31): 60,2%	CV sur des échantillons de patients (59): 17,5%	
		CV sur des échantillons de patients (42): 5,3 %	CV sur des échantillons de pa		
		(554,78 -> 764,40) / (554,78 -> 665,34): 75,4%			CV sur des échantillons de patients (59): 16,5%
		CV sur des échantillons de patients (42): 12,2 %	CV sur des échantillons de pa		
		(554,78 -> 502,27) / (554,78 -> 665,34): 25,9%		CV sur des échantillons de pa	
		CV sur des échantillons de patients (42): 17,2 %	(559,4 -> 764,6) / (559,4 -> 694,8): 44,0%		(523,3->335,2) / (523,3->79
		(474,77 -> 764,4) / (474,77 -> 665,34): 93,7%		CV sur des échantillons de pa	
		CV sur des échantillons de patients (42): 5,3 %			(523,3->399,2) / (523,3->79
(474,77 -> 502,3) / (474,77 -> 665,34): 54,2%	CV sur des échantillons de patients (59): 16,5%	(523,3->399,2) / (523,3->79			
CV sur des échantillons de patients (42): 3,3 %		CV sur des échantillons de pa			
(503,24 -> 835,36) / (503,24 -> 764,32): 104,9%			CV sur des échantillons de pa		
CV sur des échantillons de patients (13): 3,3 %	CV sur des échantillons de pa				
(503,24 -> 649,30) / (503,24 -> 764,32): 71,6%		CV sur des échantillons de pa			
CV sur des échantillons de patients (13): 5,7 %					

Paramètres à valider	Apolipoprotéine E	Hepcidine 25	Bevacizumab (approche mar
Effet Matrice	NA	NA	100 µg/mL dans le sérum ou de bicarbonate 50mM:
Parrallélisme	NA	NA	750 µg/ml dilué en série 3, 6 et 9 f blanc. Régression linéaire avec ur
Répétabilité	LGADMEDVC(AIk)GR	23,4% (42 échantillons)	10 ng/mL: 6%
	C(AIk)LAVYQAGAR	10,5% (42 échantillons)	20 ng/mL: 16%
	LAVYQAGAR	11,9% (42 échantillons)	50 ng/mL: 8%
	LGADMEDVR	15,7% (19 échantillons)	100 ng/mL: 3%
Fidélité intermédiaire	NA	200 ng/mL: 5%	QC1: 1,0%
		50 ng/mL: 12%	QC2: 4,5%
Justesse	NA	200 ng/mL: 13%	QC3: 4,5%
		50 ng/mL: 13%	QC1: 1,2%
Contamination des échantillons	Pas de contamination sur le blanc suivant	Pas de contamination sur le blanc suivant	QC2: 7,9%
Taux de récupération	NA	200 ng/mL: 6%	QC3: 1,1%
		10 ng/mL: 68.2%	
		50 ng/mL: 58.7%	
Stabilité	Stabilité des échantillons bruts	NA	Pas de contamination sur le
	stabilité des échantillons préparés	NA	NA
	Stabilité des standards	Pas évalué mais peptides modifiables donc stabilité incertaine	Stable 8 jours à -20°C NA pour les solutions mères La gamme d'étalonnage doit être préparée au moment

Durant la validation analytique, l'évaluation de la reproductibilité sur une semaine est généralement réalisée. Ce test est adapté à une analyse ponctuelle pour un programme de recherche donné. Dans le cas d'une analyse de routine, la reproductibilité des résultats doit être assurée sur des semaines, des mois voire des années. Pour répondre à cette contrainte, des échantillons de contrôle qualité (QC) sont utilisés. La reproductibilité des valeurs obtenues sur les QC permet d'évaluer la reproductibilité du dosage au long cours. Ce suivi nécessite une grande quantité d'échantillons de QC caractérisés et stables dans le temps.

Des efforts internationaux entre laboratoires ont lieu pour qualifier et produire ces échantillons de QC, nommés matériaux de référence secondaires (sRM). Un matériau de référence secondaire est un échantillon brut (ex : plasma) où la quantité en molécule cible est connue. Ce matériau doit avoir démontré de bonnes propriétés de stabilité liées aux bonnes pratiques d'opération livrées avec ce standard. Il s'agit des conditions de stockage du matériau secondaire, des conditions de remise en suspension si cet échantillon est envoyé sous forme sèche (lyophilisé) ou des performances de stabilité en fonction du nombre de cycle congélation/décongélation, par exemple. Ce matériau secondaire a une quantité connue en cible d'intérêt dosée par une méthode de référence comme la spectrométrie de masse.

La justesse de la valeur absolue d'une protéine ne peut être garantie que par un standard complètement caractérisé qui est nommé le matériau de référence primaire ou certified reference material (CRM). Ce matériau de référence primaire est utilisé par une méthode analytique sans biais d'un anticorps de capture ou de détection qui est la spectrométrie de masse. Grâce au CRM, l'analyse par LC-MS du matériau de référence secondaire va permettre de connaître la valeur juste de la protéine cible dans cet échantillon biologique. Cependant, malgré de gros efforts internationaux (ex : Joint Committee for Traceability in Laboratory Medicine (JCTLM), ou International Federation of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine (IFCC)), peu de CRMs sont commercialement disponibles pour des biomarqueurs protéiques. La liste publiée par l'union européenne (<https://ec.europa.eu/jrc/en>) le 20 Mars 2019 inclut la thyroglobuline (BCR-457), l'apolipoprotéine A1 (BCR-393), PSA (BCR-613), et l'hémoglobine HbA0 (IRMM-467).

Malgré l'accès très limité aux matériaux de référence (CRM et matériau secondaire) pour pouvoir calibrer les dosages sur une valeur « vrai », les laboratoires hospitaliers doivent pouvoir travailler dans le temps et sur différents sites.

Pour vérifier cette harmonisation de résultats entre laboratoires hospitaliers utilisant différentes techniques, l'accréditation COFRAC des méthodes suivant le document « SH GTA 04 rev 01 - COFRAC » aide à identifier les sources de biais et aide dans l'effort d'harmonisation.

6.5 Conclusions

Les trois applications qui ont été développées pendant ce travail de thèse s'appuient sur une analyse par spectrométrie de masse. Ces applications diffèrent sur les objectifs analytiques (Phénotypage ApoE vs quantification absolue d'hepcidine), les approches (Bottom-up pour le Bevacizumab vs Top-down pour l'hepcidine), les molécules dosées (protéine endogène pour l'hepcidine vs protéine exogène pour le Bevacizumab) et l'applicabilité (plus de 10000 dosages d'hepcidine vs des applications futures pour l'ApoE). Malgré ces différences, le développement et la validation des méthodes ont été réalisés avec succès. Il est intéressant de noter que les procédures de validation évoluent en permanence en fonction des nouveaux domaines d'application pour une même molécule, selon les changements de normes, l'apparition de nouveaux réactifs comme les standards par exemple, ou encore, selon les performances analytiques des couplages LC-MS.

Une méthode analytique la plus répétable possible est mise en place en limitant les sources de variabilités telles que la préparation d'échantillon, le standard ou la matrice utilisés. Pour une approche de type bottom-up, la définition du peptide «quantifier» demande la multiplication d'analyses LC-MS mais elles sont indispensables pour avoir une méthode la plus juste possible. Par ailleurs, la validation analytique est une étape essentielle afin de garantir des résultats fiables (sans interférences), répétables et reproductibles. L'ensemble des méthodes développées satisfont les critères de validation internes au laboratoire et permettent leur utilisation en routine clinique.

Une fois la validation analytique réalisée, le laboratoire doit s'assurer qu'il obtient des résultats spécifiques à la molécule cible et qu'il pourra reproduire ces résultats sur plusieurs semaines. Le laboratoire devra en général, lors de la validation de méthode, comparer sa méthode à la méthode de référence ou à la méthode précédemment utilisée. L'expérience nous montre que les résultats obtenus par spectrométrie de masse et par une autre méthode (qui peut être aussi basée sur de la spectrométrie de masse), sont corrélés mais la pente de la droite de corrélation n'est généralement pas égale à un. De multiples paramètres peuvent être impliqués dans cette différence de quantification comme les standards utilisés, la matrice utilisée, la procédure de réalisation de la gamme de calibration ainsi que les performances analytiques des deux méthodes comparées.

Afin d'harmoniser les méthodes analytiques entre les différents services et instituts, la validation inter-laboratoire est une étape incontournable. L'objectif étant de s'assurer de la précision de la méthode au moyen d'un matériau de référence secondaire notamment. Ce matériau doit lui-même être calibré avec un CRM.

Toutes ces étapes démontrent le processus complexe entre le développement d'une méthode analytique et son utilisation en routine par les laboratoires de biologie clinique.

7 Conclusion Générale

Ce travail de thèse en validation des acquis de l'expérience (VAE) m'a permis de prendre du recul sur les travaux réalisés au cours de ces dernières années au sein de la PPC. J'ai développé de nombreuses méthodes d'analyse dont le dénominateur commun était le dosage de biomarqueurs protéiques par spectrométrie de masse :

- Phénotypage de l'apolipoprotéine E
- Dosage de l'hepcidine dans le sang
- Dosage du Bevacizumab dans le sérum.

Dans le document de la VAE, d'autres applications de développements LC-MS ont été brièvement décrites.

- Le phénotypage de l'apolipoprotéine E par LC-MS permet, grâce à une détection semi-quantitative de 4 peptides spécifiques, de déterminer le risque de développer une pathologie Alzheimer. Cette approche bottom-up a de nombreux avantages pratiques qui en font une analyse compatible avec une analyse de routine.
- Le dosage de l'hepcidine 25 par une approche top-down permet de quantifier cette protéoforme spécifiquement dans le sérum. Cette approche permet donc de surpasser la technique ELISA utilisée jusqu'à récemment
- Enfin, le dosage du Bevacizumab a été développé par une approche bottom-up qui a nécessité une sélection minutieuse du peptide « quantifier ». Les performances analytiques ont été comparées entre deux approches et dans les deux cas, les méthodes sont compatibles avec une utilisation clinique car validées analytiquement et en accord avec la gamme de valeur clinique.

Plus généralement, les méthodes analytiques basées sur la spectrométrie de masse permettent une observation « directe » de la molécule cible (*i.e.* sans passer par l'utilisation d'un anticorps). Cette caractéristique permet de quantifier une protéine qui peut être présent sous différentes protéoformes et ainsi se rapprocher au plus près de la réalité physio pathologique.

L'utilisation de standards marqués permet de compenser les biais introduits à chaque étape de la préparation d'échantillon, rendant ces méthodes relativement juste. Cependant, la caractérisation du standard reste toujours délicate et demande des études spécifiques pour s'assurer du titre et de l'évolution dans le temps de celui-ci. Ainsi, l'utilisation des standards et des QCs bien caractérisés permettent des validations de méthodes malgré l'augmentation des critères à valider au cours de ces dix dernières années. Les méthodes analytiques basées sur de la spectrométrie de masse sont parfaitement compatibles avec une utilisation clinique dont certaines sont déjà validées COFRAC au CHU de Montpellier (*e.g.* dosage d'amino-acides). Nous croyons que les méthodes LC-MS pour le dosage des biomarqueurs protéiques pourront être accréditées dans un futur très proche. Actuellement, ces analyses LC-MS sont classées en « dosages innovants » ce qui permet de les utiliser par anticipation.

En conclusion, la spectrométrie de masse est une méthode de choix qui a atteint un bon degré de maturité, au niveau analytique, qui devrait lui permettre de rentrer dans les laboratoires

cliniques pour le dosage de macromolécules comme les protéines. Leur facilité d'utilisation a aussi fait un bond en avant grâce à des logiciels plus intuitifs et des rendus de résultats plus automatisés. Cependant il reste encore un petit effort au niveau de l'automatisation du protocole dans son ensemble (*i.e.* du tube d'échantillon primaire au rendu de résultats en passant par le système LC-MS) et dans la robustesse afin de proposer des systèmes LC-MS de grade clinique pour la biochimie des protéines.

L'écueil de la robustesse des systèmes concerne la problématique des pannes systèmes, qui peuvent nécessiter un arrêt prolongé des analyses, ce qui n'est pas acceptable dans le domaine clinique. Une solution serait d'installer des systèmes en doublon ce qui impliquerait l'achat de 2 systèmes onéreux.

Le modèle économique des fournisseurs de spectromètre de masse n'est là pas adapté. Dans un contexte de diminution d'accès aux gros investissements, la vente de systèmes moins chers mais associés à des kits de dosage comprenant tout le nécessaire (solvant, standards, colonne,..) avec lesquels ils pourraient donc combler la marge perdue sur le prix des systèmes.

8 Références Bibliographiques

1. Yamazaki, Y., et al., *Apolipoprotein E as a Therapeutic Target in Alzheimer's Disease: A Review of Basic Research and Clinical Evidence*. CNS Drugs, 2016. **30**(9): p. 773-89.
2. Schipper, H.M., et al., *MicroRNA expression in Alzheimer blood mononuclear cells*. Gene Regul Syst Bio, 2007. **1**: p. 263-74.
3. Lashley, T., et al., *Molecular biomarkers of Alzheimer's disease: progress and prospects*. Dis Model Mech, 2018. **11**(5).
4. Shaham, O., et al., *A plasma signature of human mitochondrial disease revealed through metabolic profiling of spent media from cultured muscle cells*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2010. **107**(4): p. 1571-5.
5. Griffin, J.L. and J.P. Shockcor, *Metabolic profiles of cancer cells*. Nat Rev Cancer, 2004. **4**(7): p. 551-61.
6. Kori, M., et al., *Metabolic Biomarkers and Neurodegeneration: A Pathway Enrichment Analysis of Alzheimer's Disease, Parkinson's Disease, and Amyotrophic Lateral Sclerosis*. OMICS, 2016. **20**(11): p. 645-661.
7. Smith, L.M. and N.L. Kelleher, *Proteoform: a single term describing protein complexity*. Nat Methods, 2013. **10**(3): p. 186-7.
8. Ponomarenko, E.A., et al., *The Size of the Human Proteome: The Width and Depth*. Int J Anal Chem, 2016. **2016**: p. 7436849.
9. Dang, X., et al., *The first pilot project of the consortium for top-down proteomics: a status report*. Proteomics, 2014. **14**(10): p. 1130-40.
10. Li, Y.I., et al., *RNA splicing is a primary link between genetic variation and disease*. Science, 2016. **352**(6285): p. 600-4.
11. Wang, E.T., et al., *Alternative isoform regulation in human tissue transcriptomes*. Nature, 2008. **456**(7221): p. 470-6.
12. Picardi, E., et al., *REDIportal: a comprehensive database of A-to-I RNA editing events in humans*. Nucleic Acids Res, 2017. **45**(D1): p. D750-D757.
13. Su, A.A. and L. Randau, *A-to-I and C-to-U editing within transfer RNAs*. Biochemistry (Mosc), 2011. **76**(8): p. 932-7.
14. Vanderperre, B., et al., *Direct detection of alternative open reading frames translation products in human significantly expands the proteome*. PLoS One, 2013. **8**(8): p. e70698.
15. Loftfield, R.B. and D. Vanderjagt, *The frequency of errors in protein biosynthesis*. Biochem J, 1972. **128**(5): p. 1353-6.
16. Aebersold, R., et al., *How many human proteoforms are there?* Nat Chem Biol, 2018. **14**(3): p. 206-214.
17. Pagel, O., et al., *Current strategies and findings in clinically relevant post-translational modification-specific proteomics*. Expert Rev Proteomics, 2015. **12**(3): p. 235-53.
18. Ree, R., S. Varland, and T. Arnesen, *Spotlight on protein N-terminal acetylation*. Exp Mol Med, 2018. **50**(7): p. 90.
19. Dai, J., et al., *Identification of degradation products formed during performic oxidation of peptides and proteins by high-performance liquid chromatography with matrix-assisted laser desorption/ionization and tandem mass spectrometry*. Rapid Commun Mass Spectrom, 2005. **19**(9): p. 1130-8.
20. Zhang, Z., et al., *Identification of lysine succinylation as a new post-translational modification*. Nat Chem Biol, 2011. **7**(1): p. 58-63.
21. Xie, Z., et al., *Lysine succinylation and lysine malonylation in histones*. Mol Cell Proteomics, 2012. **11**(5): p. 100-7.

22. Zhang, K., et al., *Identification and verification of lysine propionylation and butyrylation in yeast core histones using PTMap software*. J Proteome Res, 2009. **8**(2): p. 900-6.
23. Tan, M., et al., *Lysine glutarylation is a protein posttranslational modification regulated by SIRT5*. Cell Metab, 2014. **19**(4): p. 605-17.
24. Tan, M., et al., *Identification of 67 histone marks and histone lysine crotonylation as a new type of histone modification*. Cell, 2011. **146**(6): p. 1016-28.
25. Choudhary, C., et al., *The growing landscape of lysine acetylation links metabolism and cell signalling*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2014. **15**(8): p. 536-50.
26. Murn, J. and Y. Shi, *The winding path of protein methylation research: milestones and new frontiers*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2017. **18**(8): p. 517-527.
27. Afjehi-Sadat, L. and B.A. Garcia, *Comprehending dynamic protein methylation with mass spectrometry*. Curr Opin Chem Biol, 2013. **17**(1): p. 12-9.
28. Lodish H, B.A., Zipursky SL, et al., *Molecular Cell Biology*. 4th edition. New York: W. H. Freeman, 2000(4th edition).
29. Xu, C. and D.T. Ng, *Glycosylation-directed quality control of protein folding*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2015. **16**(12): p. 742-52.
30. Rape, M., *Ubiquitylation at the crossroads of development and disease*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2018. **19**(1): p. 59-70.
31. Kerscher, O., R. Felberbaum, and M. Hochstrasser, *Modification of proteins by ubiquitin and ubiquitin-like proteins*. Annu Rev Cell Dev Biol, 2006. **22**: p. 159-80.
32. Hickey, C.M., N.R. Wilson, and M. Hochstrasser, *Function and regulation of SUMO proteases*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2012. **13**(12): p. 755-66.
33. Hendriks, I.A. and A.C. Vertegaal, *A comprehensive compilation of SUMO proteomics*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2016. **17**(9): p. 581-95.
34. Perez-Silva, J.G., et al., *The Degradome database: expanding roles of mammalian proteases in life and disease*. Nucleic Acids Res, 2016. **44**(D1): p. D351-5.
35. Griffiths, J., *A brief history of mass spectrometry*. Anal Chem, 2008. **80**(15): p. 5678-83.
36. Hamdi, A., et al., *Fast and facile preparation of nanostructured silicon surfaces for laser desorption/ionization mass spectrometry of small compounds*. Rapid Commun Mass Spectrom, 2018.
37. Junot, C., et al., *High resolution mass spectrometry based techniques at the crossroads of metabolic pathways*. Mass Spectrom Rev, 2014. **33**(6): p. 471-500.
38. Shi, T., et al., *Targeted quantification of low ng/mL level proteins in human serum without immunoaffinity depletion*. J Proteome Res, 2013. **12**(7): p. 3353-61.
39. Kuzyk, M.A., et al., *Multiple reaction monitoring-based, multiplexed, absolute quantitation of 45 proteins in human plasma*. Mol Cell Proteomics, 2009. **8**(8): p. 1860-77.
40. Lange, V., et al., *Selected reaction monitoring for quantitative proteomics: a tutorial*. Mol Syst Biol, 2008. **4**: p. 222.
41. Picotti, P. and R. Aebersold, *Selected reaction monitoring-based proteomics: workflows, potential, pitfalls and future directions*. Nat Methods, 2012. **9**(6): p. 555-66.
42. Gallien, S., S.Y. Kim, and B. Domon, *Large-Scale Targeted Proteomics Using Internal Standard Triggered-Parallel Reaction Monitoring (IS-PRM)*. Mol Cell Proteomics, 2015. **14**(6): p. 1630-44.
43. Rougemont, B., et al., *Scout-MRM: Multiplexed Targeted Mass Spectrometry-Based Assay without Retention Time Scheduling Exemplified by Dickeya dadantii Proteomic Analysis during Plant Infection*. Anal Chem, 2017. **89**(3): p. 1421-1426.
44. Chait, B.T., *Chemistry. Mass spectrometry: bottom-up or top-down?* Science, 2006.

- 314**(5796): p. 65-6.
45. Olsen, J.V., et al., *A dual pressure linear ion trap Orbitrap instrument with very high sequencing speed*. Mol Cell Proteomics, 2009. **8**(12): p. 2759-69.
 46. Wu, C., et al., *A protease for 'middle-down' proteomics*. Nat Methods, 2012. **9**(8): p. 822-4.
 47. Chen, E.I., et al., *Optimization of mass spectrometry-compatible surfactants for shotgun proteomics*. J Proteome Res, 2007. **6**(7): p. 2529-38.
 48. Rodriguez, J., et al., *Does trypsin cut before proline?* J Proteome Res, 2008. **7**(1): p. 300-5.
 49. Vandermarliere, E., M. Mueller, and L. Martens, *Getting intimate with trypsin, the leading protease in proteomics*. Mass Spectrom Rev, 2013. **32**(6): p. 453-65.
 50. Kim, M.S., et al., *A draft map of the human proteome*. Nature, 2014. **509**(7502): p. 575-81.
 51. Roepstorff, P. and J. Fohlman, *Proposal for a common nomenclature for sequence ions in mass spectra of peptides*. Biomed Mass Spectrom, 1984. **11**(11): p. 601.
 52. Johnson, R.S., et al., *Novel fragmentation process of peptides by collision-induced decomposition in a tandem mass spectrometer: differentiation of leucine and isoleucine*. Anal Chem, 1987. **59**(21): p. 2621-5.
 53. Giansanti, P., et al., *An Augmented Multiple-Protease-Based Human Phosphopeptide Atlas*. Cell Rep, 2015. **11**(11): p. 1834-43.
 54. Gauci, S., et al., *Lys-N and trypsin cover complementary parts of the phosphoproteome in a refined SCX-based approach*. Anal Chem, 2009. **81**(11): p. 4493-501.
 55. Swaney, D.L., C.D. Wenger, and J.J. Coon, *Value of using multiple proteases for large-scale mass spectrometry-based proteomics*. J Proteome Res, 2010. **9**(3): p. 1323-9.
 56. Guo, X., et al., *Confetti: a multiprotease map of the HeLa proteome for comprehensive proteomics*. Mol Cell Proteomics, 2014. **13**(6): p. 1573-84.
 57. Nagaraj, N., et al., *Deep proteome and transcriptome mapping of a human cancer cell line*. Mol Syst Biol, 2011. **7**: p. 548.
 58. Tran, J.C., et al., *Mapping intact protein isoforms in discovery mode using top-down proteomics*. Nature, 2011. **480**(7376): p. 254-8.
 59. Capriotti, A.L., et al., *Intact protein separation by chromatographic and/or electrophoretic techniques for top-down proteomics*. J Chromatogr A, 2011. **1218**(49): p. 8760-76.
 60. Schmit, P.O., et al., *Towards a routine application of Top-Down approaches for label-free discovery workflows*. J Proteomics, 2018. **175**: p. 12-26.
 61. Ntai, I., et al., *Precise characterization of KRAS4b proteoforms in human colorectal cells and tumors reveals mutation/modification cross-talk*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2018. **115**(16): p. 4140-4145.
 62. Kellie, J.F., et al., *Quantitative measurement of intact alpha-synuclein proteoforms from post-mortem control and Parkinson's disease brain tissue by intact protein mass spectrometry*. Sci Rep, 2014. **4**: p. 5797.
 63. Chanthamontri, C., J. Liu, and S.A. McLuckey, *Charge State Dependent Fragmentation of Gaseous alpha-Synuclein Cations via Ion Trap and Beam-Type Collisional Activation*. Int J Mass Spectrom, 2009. **283**(1-3): p. 9-16.
 64. Xia, Y., X. Liang, and S.A. McLuckey, *Ion trap versus low-energy beam-type collision-induced dissociation of protonated ubiquitin ions*. Anal Chem, 2006. **78**(4): p. 1218-27.
 65. Cannon, J.R., et al., *Characterization of green fluorescent proteins by 193 nm ultraviolet photodissociation mass spectrometry*. Proteomics, 2014. **14**(10): p. 1165-73.
 66. Cleland, T.P., et al., *High-Throughput Analysis of Intact Human Proteins Using UVPD and HCD on an Orbitrap Mass Spectrometer*. J Proteome Res, 2017. **16**(5): p. 2072-

- 2079.
67. Barelli, S., et al., *Plasma/serum proteomics: pre-analytical issues*. Expert Rev Proteomics, 2007. **4**(3): p. 363-70.
 68. Rai, A.J. and F. Vitzthum, *Effects of preanalytical variables on peptide and protein measurements in human serum and plasma: implications for clinical proteomics*. Expert Rev Proteomics, 2006. **3**(4): p. 409-26.
 69. Tuck, M.K., et al., *Standard operating procedures for serum and plasma collection: early detection research network consensus statement standard operating procedure integration working group*. J Proteome Res, 2009. **8**(1): p. 113-7.
 70. Shi, T., et al., *IgY14 and SuperMix immunoaffinity separations coupled with liquid chromatography-mass spectrometry for human plasma proteomics biomarker discovery*. Methods, 2012. **56**(2): p. 246-53.
 71. Dupin, M., et al., *Impact of Serum and Plasma Matrices on the Titration of Human Inflammatory Biomarkers Using Analytically Validated SRM Assays*. J Proteome Res, 2016. **15**(8): p. 2366-78.
 72. Incamps, A., et al., *Impact of biological matrix on inflammatory protein biomarker quantification based on targeted mass spectrometry*. Bioanalysis, 2018. **10**(17): p. 1383-1399.
 73. Omenn, G.S., et al., *Overview of the HUPO Plasma Proteome Project: results from the pilot phase with 35 collaborating laboratories and multiple analytical groups, generating a core dataset of 3020 proteins and a publicly-available database*. Proteomics, 2005. **5**(13): p. 3226-45.
 74. Anderson, N.L. and N.G. Anderson, *The human plasma proteome: history, character, and diagnostic prospects*. Mol Cell Proteomics, 2002. **1**(11): p. 845-67.
 75. Farrah, T., et al., *A high-confidence human plasma proteome reference set with estimated concentrations in PeptideAtlas*. Mol Cell Proteomics, 2011. **10**(9): p. M110 006353.
 76. Thadikkaran, L., et al., *Recent advances in blood-related proteomics*. Proteomics, 2005. **5**(12): p. 3019-34.
 77. Ouyang, Z., et al., *Pellet digestion: a simple and efficient sample preparation technique for LC-MS/MS quantification of large therapeutic proteins in plasma*. Bioanalysis, 2012. **4**(1): p. 17-28.
 78. Hirtz, C., et al., *Absolute quantification of 35 plasma biomarkers in human saliva using targeted MS*. Bioanalysis, 2016. **8**(1): p. 43-53.
 79. Mertens, B., et al., *Assessing a multiplex-targeted proteomics approach for the clinical diagnosis of periodontitis using saliva samples*. Bioanalysis, 2018. **10**(1): p. 35-45.
 80. Barthelemy, N.R., et al., *Differential Mass Spectrometry Profiles of Tau Protein in the Cerebrospinal Fluid of Patients with Alzheimer's Disease, Progressive Supranuclear Palsy, and Dementia with Lewy Bodies*. J Alzheimers Dis, 2016. **51**(4): p. 1033-43.
 81. Barthelemy, N.R., et al., *Tau Protein Quantification in Human Cerebrospinal Fluid by Targeted Mass Spectrometry at High Sequence Coverage Provides Insights into Its Primary Structure Heterogeneity*. J Proteome Res, 2016. **15**(2): p. 667-76.
 82. Bros, P., et al., *Antibody-free quantification of seven tau peptides in human CSF using targeted mass spectrometry*. Front Neurosci, 2015. **9**: p. 302.
 83. Becher, F., et al., *A simple and rapid LC-MS/MS method for therapeutic drug monitoring of cetuximab: a GPCO-UNICANCER proof of concept study in head-and-neck cancer patients*. Sci Rep, 2017. **7**(1): p. 2714.
 84. Hirtz, C., et al., *From radioimmunoassay to mass spectrometry: a new method to quantify orexin-A (hypocretin-1) in cerebrospinal fluid*. Sci Rep, 2016. **6**: p. 25162.
 85. Lame, M.E., E.E. Chambers, and M. Blatnik, *Quantitation of amyloid beta peptides*

- Abeta(1-38), Abeta(1-40), and Abeta(1-42) in human cerebrospinal fluid by ultra-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry.* Anal Biochem, 2011. **419**(2): p. 133-9.
86. Pannee, J., et al., *A selected reaction monitoring (SRM)-based method for absolute quantification of Abeta38, Abeta40, and Abeta42 in cerebrospinal fluid of Alzheimer's disease patients and healthy controls.* J Alzheimers Dis, 2013. **33**(4): p. 1021-32.
 87. Portelius, E., et al., *Determination of beta-amyloid peptide signatures in cerebrospinal fluid using immunoprecipitation-mass spectrometry.* J Proteome Res, 2006. **5**(4): p. 1010-6.
 88. Gilar, M., et al., *Orthogonality of separation in two-dimensional liquid chromatography.* Anal Chem, 2005. **77**(19): p. 6426-34.
 89. Keshishian, H., et al., *Quantification of cardiovascular biomarkers in patient plasma by targeted mass spectrometry and stable isotope dilution.* Mol Cell Proteomics, 2009. **8**(10): p. 2339-49.
 90. Keshishian, H., et al., *Quantitative, multiplexed assays for low abundance proteins in plasma by targeted mass spectrometry and stable isotope dilution.* Mol Cell Proteomics, 2007. **6**(12): p. 2212-29.
 91. Shi, T., et al., *Antibody-free, targeted mass-spectrometric approach for quantification of proteins at low picogram per milliliter levels in human plasma/serum.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2012. **109**(38): p. 15395-400.
 92. Roche, S., et al., *Depletion of one, six, twelve or twenty major blood proteins before proteomic analysis: the more the better?* J Proteomics, 2009. **72**(6): p. 945-51.
 93. Bellei, E., et al., *High-abundance proteins depletion for serum proteomic analysis: concomitant removal of non-targeted proteins.* Amino Acids, 2011. **40**(1): p. 145-56.
 94. Patel, B.B., et al., *Assessment of two immunodepletion methods: off-target effects and variations in immunodepletion efficiency may confound plasma proteomics.* J Proteome Res, 2012. **11**(12): p. 5947-58.
 95. Li, S., et al., *Digging More Missing Proteins Using an Enrichment Approach with ProteoMiner.* J Proteome Res, 2017. **16**(12): p. 4330-4339.
 96. Altomare, A., et al., *An in depth proteomic analysis based on ProteoMiner, affinity chromatography and nano-HPLC-MS/MS to explain the potential health benefits of bovine colostrum.* J Pharm Biomed Anal, 2016. **121**: p. 297-306.
 97. Fonslow, B.R., et al., *Improvements in proteomic metrics of low abundance proteins through proteome equalization using ProteoMiner prior to MudPIT.* J Proteome Res, 2011. **10**(8): p. 3690-700.
 98. Hartwig, S., et al., *Combinatorial hexapeptide ligand libraries (ProteoMiner): an innovative fractionation tool for differential quantitative clinical proteomics.* Arch Physiol Biochem, 2009. **115**(3): p. 155-60.
 99. Boschetti, E. and P.G. Righetti, *The ProteoMiner in the proteomic arena: a non-depleting tool for discovering low-abundance species.* J Proteomics, 2008. **71**(3): p. 255-64.
 100. Righetti, P.G. and E. Boschetti, *The ProteoMiner and the FortyNiners: searching for gold nuggets in the proteomic arena.* Mass Spectrom Rev, 2008. **27**(6): p. 596-608.
 101. Travis, J., et al., *Isolation of albumin from whole human plasma and fractionation of albumin-depleted plasma.* Biochem J, 1976. **157**(2): p. 301-6.
 102. Travis, J. and R. Pannell, *Selective removal of albumin from plasma by affinity chromatography.* Clin Chim Acta, 1973. **49**(1): p. 49-52.
 103. Vialaret, J., et al., *Albumin depletion of human serum to improve quantitative clinical proteomics.* Current Topics in Peptide & Protein Research, 2018. **19**: p. 53-62.
 104. Krastins, B., et al., *Rapid development of sensitive, high-throughput, quantitative and*

- highly selective mass spectrometric targeted immunoassays for clinically important proteins in human plasma and serum.* Clin Biochem, 2013. **46**(6): p. 399-410.
105. Dupre, M., et al., *Multiplex quantification of protein toxins in human biofluids and food matrices using immunoextraction and high-resolution targeted mass spectrometry.* Anal Chem, 2015. **87**(16): p. 8473-80.
 106. Gao, J., et al., *Multiplex Immuno-MALDI-TOF MS for Targeted Quantification of Protein Biomarkers and Their Proteoforms Related to Inflammation and Renal Dysfunction.* Anal Chem, 2018. **90**(5): p. 3366-3373.
 107. Anderson, N.L., et al., *Mass spectrometric quantitation of peptides and proteins using Stable Isotope Standards and Capture by Anti-Peptide Antibodies (SISCAPA).* J Proteome Res, 2004. **3**(2): p. 235-44.
 108. Hsiao, Y.C., et al., *Development of a Multiplexed Assay for Oral Cancer Candidate Biomarkers Using Peptide Immunoaffinity Enrichment and Targeted Mass Spectrometry.* Mol Cell Proteomics, 2017. **16**(10): p. 1829-1849.
 109. Ippoliti, P.J., et al., *Automated Microchromatography Enables Multiplexing of Immunoaffinity Enrichment of Peptides to Greater than 150 for Targeted MS-Based Assays.* Anal Chem, 2016. **88**(15): p. 7548-55.
 110. Razavi, M., et al., *High precision quantification of human plasma proteins using the automated SISCAPA Immuno-MS workflow.* N Biotechnol, 2016. **33**(5 Pt A): p. 494-502.
 111. Kuhn, E., et al., *Interlaboratory evaluation of automated, multiplexed peptide immunoaffinity enrichment coupled to multiple reaction monitoring mass spectrometry for quantifying proteins in plasma.* Mol Cell Proteomics, 2012. **11**(6): p. M111 013854.
 112. Yang, X., et al., *Mass Spectrometric Quantitation of Tubulin Acetylation from Pepsin-Digested Rat Brain Tissue Using a Novel Stable-Isotope Standard and Capture by Anti-Peptide Antibody (SISCAPA) Method.* Anal Chem, 2018. **90**(3): p. 2155-2163.
 113. Jiang, J., et al., *Development of an immuno tandem mass spectrometry (iMALDI) assay for EGFR diagnosis.* Proteomics Clin Appl, 2007. **1**(12): p. 1651-9.
 114. Jiang, J., et al., *An immunoaffinity tandem mass spectrometry (iMALDI) assay for detection of Francisella tularensis.* Anal Chim Acta, 2007. **605**(1): p. 70-9.
 115. Anderson, N.L., et al., *Precision of heavy-light peptide ratios measured by maldi-tof mass spectrometry.* J Proteome Res, 2012. **11**(3): p. 1868-78.
 116. Liu, H., et al., *Quantitation of a recombinant monoclonal antibody in monkey serum by liquid chromatography-mass spectrometry.* Anal Biochem, 2011. **414**(1): p. 147-53.
 117. Damen, C.W., et al., *The bioanalysis of the monoclonal antibody trastuzumab by high-performance liquid chromatography with fluorescence detection after immuno-affinity purification from human serum.* J Pharm Biomed Anal, 2009. **50**(5): p. 861-6.
 118. Whiteaker, J.R., et al., *Antibody-based enrichment of peptides on magnetic beads for mass-spectrometry-based quantification of serum biomarkers.* Anal Biochem, 2007. **362**(1): p. 44-54.
 119. Fernandez Ocana, M., et al., *Clinical pharmacokinetic assessment of an anti-MAdCAM monoclonal antibody therapeutic by LC-MS/MS.* Anal Chem, 2012. **84**(14): p. 5959-67.
 120. Onami, I., et al., *A versatile method for protein-based antigen bioanalysis in non-clinical pharmacokinetics studies of a human monoclonal antibody drug by an immunoaffinity liquid chromatography-tandem mass spectrometry.* J Chromatogr A, 2014. **1334**: p. 64-71.
 121. Willrich, M.A., et al., *Quantitation of infliximab using clonotypic peptides and selective reaction monitoring by LC-MS/MS.* Int Immunopharmacol, 2015. **28**(1): p. 513-20.
 122. Liu, G., et al., *A novel and cost effective method of removing excess albumin from plasma/serum samples and its impacts on LC-MS/MS bioanalysis of therapeutic*

- proteins*. Anal Chem, 2014. **86**(16): p. 8336-43.
123. Gong, C., et al., *Post-pellet-digestion precipitation and solid phase extraction: A practical and efficient workflow to extract surrogate peptides for ultra-high performance liquid chromatography--tandem mass spectrometry bioanalysis of a therapeutic antibody in the low ng/mL range*. J Chromatogr A, 2015. **1424**: p. 27-36.
 124. Iwamoto, N., et al., *Fully validated LCMS bioanalysis of Bevacizumab in human plasma using nano-surface and molecular-orientation limited (nSMOL) proteolysis*. Drug Metab Pharmacokinet, 2016. **31**(1): p. 46-50.
 125. Fuente-Garcia, C., et al., *Search for proteomic biomarkers related to bovine pre-slaughter stress using liquid isoelectric focusing (OFFGEL) and mass spectrometry*. J Proteomics, 2018.
 126. Beldarrain, L.R., et al., *Use of liquid isoelectric focusing (OFFGEL) on the discovery of meat tenderness biomarkers*. J Proteomics, 2018. **183**: p. 25-33.
 127. Kraiem, H., et al., *Two-Dimensional Isoelectric Focusing OFFGEL, Micro-Fluidic Lab-on-Chip Electrophoresis and FTIR for Assessment of Long-Term Stability of rhG-CSF Formulation*. IEEE Trans Nanobioscience, 2017. **16**(8): p. 694-702.
 128. Naveena, B.M., et al., *In-gel and OFFGEL-based proteomic approach for authentication of meat species from minced meat and meat products*. J Sci Food Agric, 2018. **98**(3): p. 1188-1196.
 129. Michelland, S., et al., *Low-molecular-weight color pI markers to monitor on-line the peptide focusing process in OFFGEL fractionation*. Electrophoresis, 2017. **38**(16): p. 2034-2041.
 130. Naveena, B.M., et al., *OFFGEL electrophoresis and tandem mass spectrometry approach compared with DNA-based PCR method for authentication of meat species from raw and cooked ground meat mixtures containing cattle meat, water buffalo meat and sheep meat*. Food Chem, 2017. **233**: p. 311-320.
 131. Abd El Aziz, T.M., et al., *Fractionation and proteomic analysis of the Walterinnesia aegyptia snake venom using OFFGEL and MALDI-TOF-MS techniques*. Electrophoresis, 2015. **36**(20): p. 2594-605.
 132. Magdeldin, S., et al., *Complementary protein and peptide OFFGEL fractionation for high-throughput proteomic analysis*. Anal Chem, 2015. **87**(16): p. 8481-8.
 133. Neill, A., et al., *Characterization of Recombinant Monoclonal Antibody Charge Variants Using OFFGEL Fractionation, Weak Anion Exchange Chromatography, and Mass Spectrometry*. Anal Chem, 2015. **87**(12): p. 6204-11.
 134. Moreda-Pineiro, A., N. Garcia-Otero, and P. Bermejo-Barrera, *A review on preparative and semi-preparative offgel electrophoresis for multidimensional protein/peptide assessment*. Anal Chim Acta, 2014. **836**: p. 1-17.
 135. Franchin, C., et al., *OFFGEL fractionation of peptides: where really is your sample?* J Chromatogr A, 2014. **1355**: p. 278-83.
 136. Magdeldin, S., et al., *Deep proteome mapping of mouse kidney based on OFFGel pre-fractionation reveals remarkable protein post-translational modifications*. J Proteome Res, 2014. **13**(3): p. 1636-46.
 137. Zargar, S.M., et al., *Unraveling the iron deficiency responsive proteome in Arabidopsis shoot by iTRAQ-OFFGEL approach*. Plant Signal Behav, 2013. **8**(10): p. doi: 10.4161/psb.26892.
 138. Rideau, A., et al., *Two-step OFFGEL approach for effective peptide separation compatible with iTRAQ labeling*. Proteomics, 2013. **13**(22): p. 3261-6.
 139. Garcia-Otero, N., et al., *Study of extraction procedures for protein analysis in plankton samples by OFFGEL electrophoresis hyphenated with Lab-on-a-chip technology*. Talanta, 2013. **115**: p. 631-41.

140. Garcia-Otero, N., et al., *Two-dimensional isoelectric focusing OFFGEL and microfluidic lab-on-chip electrophoresis for assessing dissolved proteins in seawater*. Anal Chem, 2013. **85**(12): p. 5909-16.
141. Tobolkina, E., et al., *Segmented field OFFGEL(R) electrophoresis*. Electrophoresis, 2012. **33**(22): p. 3331-8.
142. Abdallah, C., et al., *Optimization of iTRAQ labelling coupled to OFFGEL fractionation as a proteomic workflow to the analysis of microsomal proteins of Medicago truncatula roots*. Proteome Sci, 2012. **10**(1): p. 37.
143. Konecna, H., et al., *Exploration of beer proteome using OFFGEL prefractionation in combination with two-dimensional gel electrophoresis with narrow pH range gradients*. J Agric Food Chem, 2012. **60**(10): p. 2418-26.
144. Gannon, J. and K. Ohlendieck, *Subproteomic analysis of basic proteins in aged skeletal muscle following offgel pre-fractionation*. Mol Med Rep, 2012. **5**(4): p. 993-1000.
145. Keidel, E.M., et al., *Evaluation of protein loading techniques and improved separation in OFFGEL isoelectric focusing*. Electrophoresis, 2011. **32**(13): p. 1659-66.
146. Krishnan, S., et al., *OFFgel-based multidimensional LC-MS/MS approach to the cataloguing of the human platelet proteome for an interactomic profile*. Electrophoresis, 2011. **32**(6-7): p. 686-95.
147. Mena, M.L., et al., *OFFGEL isoelectric focusing and polyacrylamide gel electrophoresis separation of platinum-binding proteins*. J Chromatogr A, 2011. **1218**(9): p. 1281-90.
148. Zhang, Y., et al., *Comprehensive analysis of low-abundance proteins in human urinary exosomes using peptide ligand library technology, peptide OFFGEL fractionation and nanoHPLC-chip-MS/MS*. Electrophoresis, 2010. **31**(23-24): p. 3797-807.
149. Balasubramani, M., et al., *Characterization and detection of cellular and proteomic alterations in stable stathmin-overexpressing, taxol-resistant BT549 breast cancer cells using offgel IEF/PAGE difference gel electrophoresis*. Mutat Res, 2011. **722**(2): p. 154-64.
150. Azulay, D.O., H. Neubert, and M.F. Ocana, *Visualisation tool for peptide fractionation data in proteomics: application to OFFGEL isoelectric focussing*. BMC Bioinformatics, 2010. **11**: p. 371.
151. Warren, C.M., et al., *Sub-proteomic fractionation, iTRAQ, and OFFGEL-LC-MS/MS approaches to cardiac proteomics*. J Proteomics, 2010. **73**(8): p. 1551-61.
152. Ernoult, E., et al., *A proteomic approach for plasma biomarker discovery with iTRAQ labelling and OFFGEL fractionation*. J Biomed Biotechnol, 2010. **2010**: p. 927917.
153. Manadas, B., et al., *Comparative analysis of OFFGel, strong cation exchange with pH gradient, and RP at high pH for first-dimensional separation of peptides from a membrane-enriched protein fraction*. Proteomics, 2009. **9**(22): p. 5194-8.
154. Ernoult, E., E. Gamelin, and C. Guette, *Improved proteome coverage by using iTRAQ labelling and peptide OFFGEL fractionation*. Proteome Sci, 2008. **6**: p. 27.
155. Chenau, J., et al., *Peptides OFFGEL electrophoresis: a suitable pre-analytical step for complex eukaryotic samples fractionation compatible with quantitative iTRAQ labeling*. Proteome Sci, 2008. **6**: p. 9.
156. Fraterman, S., et al., *Combination of peptide OFFGEL fractionation and label-free quantitation facilitated proteomics profiling of extraocular muscle*. Proteomics, 2007. **7**(18): p. 3404-16.
157. Lam, H.T., et al., *Modeling the isoelectric focusing of peptides in an OFFGEL multicompartment cell*. J Proteome Res, 2007. **6**(5): p. 1666-76.
158. Horth, P., et al., *Efficient fractionation and improved protein identification by peptide OFFGEL electrophoresis*. Mol Cell Proteomics, 2006. **5**(10): p. 1968-74.

159. Lehmann, S., et al., *Stable Isotope Labeling by Amino acid in Vivo (SILAV): a new method to explore protein metabolism*. Rapid Commun Mass Spectrom, 2015. **29**(20): p. 1917-25.
160. Ong, S.E., et al., *Stable isotope labeling by amino acids in cell culture, SILAC, as a simple and accurate approach to expression proteomics*. Mol Cell Proteomics, 2002. **1**(5): p. 376-86.
161. Zhang, R., et al., *Fractionation of isotopically labeled peptides in quantitative proteomics*. Anal Chem, 2001. **73**(21): p. 5142-9.
162. Beynon, R.J. and J.M. Pratt, *Metabolic labeling of proteins for proteomics*. Mol Cell Proteomics, 2005. **4**(7): p. 857-72.
163. Yao, X., et al., *Proteolytic ¹⁸O labeling for comparative proteomics: model studies with two serotypes of adenovirus*. Anal Chem, 2001. **73**(13): p. 2836-42.
164. Gygi, S.P., et al., *Quantitative analysis of complex protein mixtures using isotope-coded affinity tags*. Nat Biotechnol, 1999. **17**(10): p. 994-9.
165. Thompson, A., et al., *Tandem mass tags: a novel quantification strategy for comparative analysis of complex protein mixtures by MS/MS*. Anal Chem, 2003. **75**(8): p. 1895-904.
166. Ross, P.L., et al., *Multiplexed protein quantitation in Saccharomyces cerevisiae using amine-reactive isobaric tagging reagents*. Mol Cell Proteomics, 2004. **3**(12): p. 1154-69.
167. Gygi, S.P., et al., *Proteome analysis of low-abundance proteins using multidimensional chromatography and isotope-coded affinity tags*. J Proteome Res, 2002. **1**(1): p. 47-54.
168. Yi, E.C., et al., *Increased quantitative proteome coverage with (¹³C)/(¹²C)-based, acid-cleavable isotope-coded affinity tag reagent and modified data acquisition scheme*. Proteomics, 2005. **5**(2): p. 380-7.
169. Ahn, Y.H., et al., *Quantitative analysis of aberrant protein glycosylation in liver cancer plasma by AAL-enrichment and MRM mass spectrometry*. Analyst, 2013. **138**(21): p. 6454-62.
170. Werner, T., et al., *High-resolution enabled TMT 8-plexing*. Anal Chem, 2012. **84**(16): p. 7188-94.
171. McAlister, G.C., et al., *Increasing the multiplexing capacity of TMTs using reporter ion isotopologues with isobaric masses*. Anal Chem, 2012. **84**(17): p. 7469-78.
172. Bondarenko, P.V., D. Chelius, and T.A. Shaler, *Identification and relative quantitation of protein mixtures by enzymatic digestion followed by capillary reversed-phase liquid chromatography-tandem mass spectrometry*. Anal Chem, 2002. **74**(18): p. 4741-9.
173. Purvine, S., et al., *Shotgun collision-induced dissociation of peptides using a time of flight mass analyzer*. Proteomics, 2003. **3**(6): p. 847-50.
174. Gillet, L.C., et al., *Targeted data extraction of the MS/MS spectra generated by data-independent acquisition: a new concept for consistent and accurate proteome analysis*. Mol Cell Proteomics, 2012. **11**(6): p. O111 016717.
175. Ludwig, C., et al., *Data-independent acquisition-based SWATH-MS for quantitative proteomics: a tutorial*. Mol Syst Biol, 2018. **14**(8): p. e8126.
176. Florian Meier, A.-D.B., Max Frank, Annie Ha, Eugenia Voytik, Stephanie Kaspar-Schoenefeld, Markus Lubeck, Oliver Raether, Ruedi Aebersold, Ben C. Collins, Hannes L. Röst, Matthias Mann, *Parallel accumulation – serial fragmentation combined with data-independent acquisition (diaPASEF): Bottom-up proteomics with near optimal ion usage*. BioRxiv, 2019.
177. Brun, V., et al., *Isotope dilution strategies for absolute quantitative proteomics*. J Proteomics, 2009. **72**(5): p. 740-9.
178. Brun, V., et al., *Isotope-labeled protein standards: toward absolute quantitative proteomics*. Mol Cell Proteomics, 2007. **6**(12): p. 2139-49.

179. Zeiler, M., et al., *A Protein Epitope Signature Tag (PrEST) library allows SILAC-based absolute quantification and multiplexed determination of protein copy numbers in cell lines*. Mol Cell Proteomics, 2012. **11**(3): p. O111 009613.
180. Kaiser, S.E., et al., *Protein standard absolute quantification (PSAQ) method for the measurement of cellular ubiquitin pools*. Nat Methods, 2011. **8**(8): p. 691-6.
181. Lai, S., et al., *A combined tryptic peptide and winged peptide internal standard approach for the determination of alpha-lactalbumin in dairy products by ultra high performance liquid chromatography with tandem mass spectrometry*. J Sep Sci, 2015. **38**(10): p. 1800-6.
182. Faria, M., et al., *Comparison of a stable isotope labeled (SIL) peptide and an extended SIL peptide as internal standards to track digestion variability of an unstable signature peptide during quantification of a cancer biomarker, human osteopontin, from plasma using capillary microflow LC-MS/MS*. J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci, 2015. **1001**: p. 156-68.
183. Shuford, C.M., et al., *Absolute Protein Quantification by Mass Spectrometry: Not as Simple as Advertised*. Anal Chem, 2017. **89**(14): p. 7406-7415.
184. Bronsema, K.J., R. Bischoff, and N.C. van de Merbel, *High-sensitivity LC-MS/MS quantification of peptides and proteins in complex biological samples: the impact of enzymatic digestion and internal standard selection on method performance*. Anal Chem, 2013. **85**(20): p. 9528-35.
185. Bronsema, K.J., R. Bischoff, and N.C. van de Merbel, *Internal standards in the quantitative determination of protein biopharmaceuticals using liquid chromatography coupled to mass spectrometry*. J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci, 2012. **893-894**: p. 1-14.
186. Shi, J., et al., *Response to the comments on "Determining Allele-Specific Protein Expression (ASPE) Using a Novel QconCAT-Based Proteomics Method"*. J Proteome Res, 2019.
187. Stelder, S.K., et al., *Correction to "Stoichiometry, Absolute Abundance, and Localization of Proteins in the Bacillus cereus Spore Coat Insoluble Fraction Determined Using a QconCAT Approach"*. J Proteome Res, 2018. **17**(7): p. 2562.
188. Stelder, S.K., et al., *Stoichiometry, Absolute Abundance, and Localization of Proteins in the Bacillus cereus Spore Coat Insoluble Fraction Determined Using a QconCAT Approach*. J Proteome Res, 2018. **17**(2): p. 903-917.
189. Smith, D.G., et al., *Design and expression of a QconCAT protein to validate Hi3 protein quantification of influenza vaccine antigens*. J Proteomics, 2016. **146**: p. 133-40.
190. Pertl-Obermeyer, H., et al., *Quantitation of Vacuolar Sugar Transporter Abundance Changes Using QconCAT Synthetic Peptides*. Front Plant Sci, 2016. **7**: p. 411.
191. Scott, K.B., I.V. Turko, and K.W. Phinney, *QconCAT: Internal Standard for Protein Quantification*. Methods Enzymol, 2016. **566**: p. 289-303.
192. Holman, S.W., L. McLean, and C.E. Eyers, *RePLiCal: A QconCAT Protein for Retention Time Standardization in Proteomics Studies*. J Proteome Res, 2016. **15**(3): p. 1090-102.
193. Harwood, M.D., et al., *Application of an LC-MS/MS method for the simultaneous quantification of human intestinal transporter proteins absolute abundance using a QconCAT technique*. J Pharm Biomed Anal, 2015. **110**: p. 27-33.
194. Voges, R., et al., *Absolute quantification of Corynebacterium glutamicum glycolytic and anaplerotic enzymes by QconCAT*. J Proteomics, 2015. **113**: p. 366-77.
195. Wei, J., et al., *High-throughput absolute quantification of proteins using an improved two-dimensional reversed-phase separation and quantification concatemer (QconCAT) approach*. Anal Bioanal Chem, 2014. **406**(17): p. 4183-93.

196. Al-Majdoub, Z.M., et al., *Quantification of the proteins of the bacterial ribosome using QconCAT technology*. J Proteome Res, 2014. **13**(3): p. 1211-22.
197. Russell, M.R., et al., *Alternative fusion protein strategies to express recalcitrant QconCAT proteins for quantitative proteomics of human drug metabolizing enzymes and transporters*. J Proteome Res, 2013. **12**(12): p. 5934-42.
198. Zimmerman, T.A., et al., *Quantification of transferrin in human serum using both QconCAT and synthetic internal standards*. Anal Chem, 2013. **85**(21): p. 10362-8.
199. Chawner, R., et al., *QconCAT standard for calibration of ion mobility-mass spectrometry systems*. J Proteome Res, 2012. **11**(11): p. 5564-72.
200. Brownridge, P.J., et al., *Absolute multiplexed protein quantification using QconCAT technology*. Methods Mol Biol, 2012. **893**: p. 267-93.
201. Austin, R.J., et al., *IQcat: multiplexed protein quantification by isoelectric QconCAT*. Proteomics, 2012. **12**(13): p. 2078-83.
202. Bislev, S.L., et al., *Quantotypic properties of QconCAT peptides targeting bovine host response to Streptococcus uberis*. J Proteome Res, 2012. **11**(3): p. 1832-43.
203. Carroll, K.M., F. Lanucara, and C.E. Eyers, *Quantification of proteins and their modifications using QconCAT technology*. Methods Enzymol, 2011. **500**: p. 113-31.
204. Carroll, K.M., et al., *Absolute quantification of the glycolytic pathway in yeast: deployment of a complete QconCAT approach*. Mol Cell Proteomics, 2011. **10**(12): p. M111 007633.
205. Brownridge, P., et al., *Global absolute quantification of a proteome: Challenges in the deployment of a QconCAT strategy*. Proteomics, 2011. **11**(15): p. 2957-70.
206. Castro-Borges, W., et al., *Abundance of tegument surface proteins in the human blood fluke Schistosoma mansoni determined by QconCAT proteomics*. J Proteomics, 2011. **74**(9): p. 1519-33.
207. Swainston, N., D. Jameson, and K. Carroll, *A QconCAT informatics pipeline for the analysis, visualization and sharing of absolute quantitative proteomics data*. Proteomics, 2011. **11**(2): p. 329-33.
208. Rivers, J., et al., *Absolute multiplexed quantitative analysis of protein expression during muscle development using QconCAT*. Mol Cell Proteomics, 2007. **6**(8): p. 1416-27.
209. Pratt, J.M., et al., *Multiplexed absolute quantification for proteomics using concatenated signature peptides encoded by QconCAT genes*. Nat Protoc, 2006. **1**(2): p. 1029-43.
210. Liebler, D.C. and L.J. Zimmerman, *Targeted quantitation of proteins by mass spectrometry*. Biochemistry, 2013. **52**(22): p. 3797-806.
211. Picotti, P., R. Aebersold, and B. Domon, *The implications of proteolytic background for shotgun proteomics*. Mol Cell Proteomics, 2007. **6**(9): p. 1589-98.
212. Hoofnagle, A.N., et al., *Recommendations for the Generation, Quantification, Storage, and Handling of Peptides Used for Mass Spectrometry-Based Assays*. Clin Chem, 2016. **62**(1): p. 48-69.
213. Compton, P.D., N.L. Kelleher, and J. Gunawardena, *Estimating the Distribution of Protein Post-Translational Modification States by Mass Spectrometry*. J Proteome Res, 2018. **17**(8): p. 2727-2734.
214. Domanski, D., L.C. Murphy, and C.H. Borchers, *Assay development for the determination of phosphorylation stoichiometry using multiple reaction monitoring methods with and without phosphatase treatment: application to breast cancer signaling pathways*. Anal Chem, 2010. **82**(13): p. 5610-20.
215. Wolf-Yadlin, A., et al., *Multiple reaction monitoring for robust quantitative proteomic analysis of cellular signaling networks*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2007. **104**(14): p. 5860-5.

216. Sheng, Z., et al., *Ser1292 autophosphorylation is an indicator of LRRK2 kinase activity and contributes to the cellular effects of PD mutations*. *Sci Transl Med*, 2012. **4**(164): p. 164ra161.
217. Navarrete-Perea, J., et al., *Streamlined Tandem Mass Tag (SL-TMT) Protocol: An Efficient Strategy for Quantitative (Phospho)proteome Profiling Using Tandem Mass Tag-Synchronous Precursor Selection-MS3*. *J Proteome Res*, 2018. **17**(6): p. 2226-2236.
218. Xu, L., et al., *An MRM-based workflow for absolute quantitation of lysine-acetylated metabolic enzymes in mouse liver*. *Analyst*, 2015. **140**(23): p. 7868-75.
219. Mirzaei, H., et al., *Characterizing the connectivity of poly-ubiquitin chains by selected reaction monitoring mass spectrometry*. *Mol Biosyst*, 2010. **6**(10): p. 2004-14.
220. Held, J.M., et al., *Targeted quantitation of site-specific cysteine oxidation in endogenous proteins using a differential alkylation and multiple reaction monitoring mass spectrometry approach*. *Mol Cell Proteomics*, 2010. **9**(7): p. 1400-10.
221. Yoneyama, T., et al., *Quantitative targeted absolute proteomics-based large-scale quantification of proline-hydroxylated alpha-fibrinogen in plasma for pancreatic cancer diagnosis*. *J Proteome Res*, 2013. **12**(2): p. 753-62.
222. Danielson, S.R., et al., *Preferentially increased nitration of alpha-synuclein at tyrosine-39 in a cellular oxidative model of Parkinson's disease*. *Anal Chem*, 2009. **81**(18): p. 7823-8.
223. Ahn, Y.H., et al., *A lectin-coupled, targeted proteomic mass spectrometry (MRM MS) platform for identification of multiple liver cancer biomarkers in human plasma*. *J Proteomics*, 2012. **75**(17): p. 5507-15.
224. Sung, H.J., et al., *Large-scale isotype-specific quantification of Serum amyloid A 1/2 by multiple reaction monitoring in crude sera*. *J Proteomics*, 2012. **75**(7): p. 2170-80.
225. Oeckl, P., et al., *Alpha-, Beta-, and Gamma-synuclein Quantification in Cerebrospinal Fluid by Multiple Reaction Monitoring Reveals Increased Concentrations in Alzheimer's and Creutzfeldt-Jakob Disease but No Alteration in Synucleinopathies*. *Mol Cell Proteomics*, 2016. **15**(10): p. 3126-3138.
226. Steen, H., et al., *Phosphorylation analysis by mass spectrometry: myths, facts, and the consequences for qualitative and quantitative measurements*. *Mol Cell Proteomics*, 2006. **5**(1): p. 172-81.
227. Wu, Z., et al., *Impact of Phosphorylation on the Mass Spectrometry Quantification of Intact Phosphoproteins*. *Anal Chem*, 2018. **90**(8): p. 4935-4939.
228. Schmid, A.W., et al., *Alpha-synuclein post-translational modifications as potential biomarkers for Parkinson disease and other synucleinopathies*. *Mol Cell Proteomics*, 2013. **12**(12): p. 3543-58.
229. Seckler, H.D.S., et al., *A Targeted, Differential Top-Down Proteomic Methodology for Comparison of ApoA-I Proteoforms in Individuals with High and Low HDL Efflux Capacity*. *J Proteome Res*, 2018. **17**(6): p. 2156-2164.
230. Addona, T.A., et al., *Multi-site assessment of the precision and reproducibility of multiple reaction monitoring-based measurements of proteins in plasma*. *Nat Biotechnol*, 2009. **27**(7): p. 633-41.
231. Abbatiello, S.E., et al., *Large-Scale Interlaboratory Study to Develop, Analytically Validate and Apply Highly Multiplexed, Quantitative Peptide Assays to Measure Cancer-Relevant Proteins in Plasma*. *Mol Cell Proteomics*, 2015. **14**(9): p. 2357-74.
232. Oeckl, P., P. Steinacker, and M. Otto, *Comparison of Internal Standard Approaches for SRM Analysis of Alpha-Synuclein in Cerebrospinal Fluid*. *J Proteome Res*, 2018. **17**(1): p. 516-523.
233. Arnold, S.L., F. Stevison, and N. Isoherranen, *Impact of Sample Matrix on Accuracy of Peptide Quantification: Assessment of Calibrator and Internal Standard Selection and*

- Method Validation*. Anal Chem, 2016. **88**(1): p. 746-53.
234. Nouri-Nigjeh, E., et al., *Effects of calibration approaches on the accuracy for LC-MS targeted quantification of therapeutic protein*. Anal Chem, 2014. **86**(7): p. 3575-84.
235. Scott, K.B., I.V. Turko, and K.W. Phinney, *Quantitative performance of internal standard platforms for absolute protein quantification using multiple reaction monitoring-mass spectrometry*. Anal Chem, 2015. **87**(8): p. 4429-35.
236. Shuford, C.M., et al., *Peptide production and decay rates affect the quantitative accuracy of protein cleavage isotope dilution mass spectrometry (PC-IDMS)*. Mol Cell Proteomics, 2012. **11**(9): p. 814-23.
237. Barnidge, D.R., et al., *Evaluation of a cleavable stable isotope labeled synthetic peptide for absolute protein quantification using LC-MS/MS*. J Proteome Res, 2004. **3**(3): p. 658-61.
238. Cao, J., et al., *A rapid, reproducible, on-the-fly orthogonal array optimization method for targeted protein quantification by LC/MS and its application for accurate and sensitive quantification of carbonyl reductases in human liver*. Anal Chem, 2010. **82**(7): p. 2680-9.
239. Lebert, D., et al., *DIGESTIF: a universal quality standard for the control of bottom-up proteomics experiments*. J Proteome Res, 2015. **14**(2): p. 787-803.
240. Duan, X., et al., *High-throughput method development for sensitive, accurate, and reproducible quantification of therapeutic monoclonal antibodies in tissues using orthogonal array optimization and nano liquid chromatography/selected reaction monitoring mass spectrometry*. Anal Chem, 2012. **84**(10): p. 4373-82.
241. Brownridge, P. and R.J. Beynon, *The importance of the digest: proteolysis and absolute quantification in proteomics*. Methods, 2011. **54**(4): p. 351-60.
242. Pritchard, C., et al., *Quantification of human growth hormone in serum with a labeled protein as an internal standard: essential considerations*. Anal Chem, 2014. **86**(13): p. 6525-32.
243. Clamp, J.R. and L. Hough, *The Periodate Oxidation of Amino Acids with Reference to Studies on Glycoproteins*. Biochem J, 1965. **94**: p. 17-24.
244. Meister, A., et al., *Transamination and associated deamidation of asparagine and glutamine*. J Biol Chem, 1952. **197**(1): p. 319-30.
245. Kraut, A., et al., *Peptide storage: are you getting the best return on your investment? Defining optimal storage conditions for proteomics samples*. J Proteome Res, 2009. **8**(7): p. 3778-85.
246. Dolman, S., et al., *Investigation of carryover of peptides in nano-liquid chromatography/mass spectrometry using packed and monolithic capillary columns*. J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci, 2013. **912**: p. 56-63.
247. John, H., et al., *Analytical procedures for quantification of peptides in pharmaceutical research by liquid chromatography-mass spectrometry*. Anal Bioanal Chem, 2004. **378**(4): p. 883-97.
248. Bark, S.J. and V. Hook, *Differential recovery of peptides from sample tubes and the reproducibility of quantitative proteomic data*. J Proteome Res, 2007. **6**(11): p. 4511-6.
249. van den Broek, I., et al., *Quantitative bioanalysis of peptides by liquid chromatography coupled to (tandem) mass spectrometry*. J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci, 2008. **872**(1-2): p. 1-22.
250. Mahley, R.W. and S.C. Rall, Jr., *Apolipoprotein E: far more than a lipid transport protein*. Annu Rev Genomics Hum Genet, 2000. **1**: p. 507-37.
251. Huang, Y. and R.W. Mahley, *Apolipoprotein E: structure and function in lipid metabolism, neurobiology, and Alzheimer's diseases*. Neurobiol Dis, 2014. **72 Pt A**: p. 3-12.

252. Dominiczak, M.H. and M.J. Caslake, *Apolipoproteins: metabolic role and clinical biochemistry applications*. Ann Clin Biochem, 2011. **48**(Pt 6): p. 498-515.
253. Mahley, R.W., *Apolipoprotein E: cholesterol transport protein with expanding role in cell biology*. Science, 1988. **240**(4852): p. 622-30.
254. Verghese, P.B., J.M. Castellano, and D.M. Holtzman, *Apolipoprotein E in Alzheimer's disease and other neurological disorders*. Lancet Neurol, 2011. **10**(3): p. 241-52.
255. Roda, A.R., L. Montoliu-Gaya, and S. Villegas, *The Role of Apolipoprotein E Isoforms in Alzheimer's Disease*. J Alzheimers Dis, 2019. **68**(2): p. 459-471.
256. Koopal, C., A.D. Marais, and F.L. Visseren, *Familial dysbetalipoproteinemia: an underdiagnosed lipid disorder*. Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes, 2017. **24**(2): p. 133-139.
257. Soderlund, S., et al., *Increased apolipoprotein E level and reduced high-density lipoprotein mean particle size associate with low high-density lipoprotein cholesterol and features of metabolic syndrome*. Metabolism, 2010. **59**(10): p. 1502-9.
258. Corder, E.H., et al., *Protective effect of apolipoprotein E type 2 allele for late onset Alzheimer disease*. Nat Genet, 1994. **7**(2): p. 180-4.
259. Saunders, A.M., et al., *Association of apolipoprotein E allele epsilon 4 with late-onset familial and sporadic Alzheimer's disease*. Neurology, 1993. **43**(8): p. 1467-72.
260. Bickeboller, H., et al., *Apolipoprotein E and Alzheimer disease: genotype-specific risks by age and sex*. Am J Hum Genet, 1997. **60**(2): p. 439-46.
261. Genin, E., et al., *APOE and Alzheimer disease: a major gene with semi-dominant inheritance*. Mol Psychiatry, 2011. **16**(9): p. 903-7.
262. Brouwer, D.A., J.J. van Doormaal, and F.A. Muskiet, *Clinical chemistry of common apolipoprotein E isoforms*. J Chromatogr B Biomed Appl, 1996. **678**(1): p. 23-41.
263. Rochat, B., et al., *Validation of hepcidin quantification in plasma using LC-HRMS and discovery of a new hepcidin isoform*. Bioanalysis, 2013. **5**(20): p. 2509-20.
264. Kemna, E.H., et al., *Mass spectrometry-based hepcidin measurements in serum and urine: analytical aspects and clinical implications*. Clin Chem, 2007. **53**(4): p. 620-8.
265. Kulaksiz, H., et al., *The iron-regulatory peptide hormone hepcidin: expression and cellular localization in the mammalian kidney*. J Endocrinol, 2005. **184**(2): p. 361-70.
266. Park, C.H., et al., *Hepcidin, a urinary antimicrobial peptide synthesized in the liver*. J Biol Chem, 2001. **276**(11): p. 7806-10.
267. Itkonen, O., et al., *Binding of hepcidin to plasma proteins*. Clin Chem, 2012. **58**(7): p. 1158-60.
268. Ramos, E., et al., *Minihhepcidins prevent iron overload in a hepcidin-deficient mouse model of severe hemochromatosis*. Blood, 2012. **120**(18): p. 3829-36.
269. Kroot, J.J., et al., *Hepcidin in human iron disorders: diagnostic implications*. Clin Chem, 2011. **57**(12): p. 1650-69.
270. Delaby C, V.J., Bros P, Gabelle A, Lefebvre T, Puy H, Hirtz C, Lehmann S, *Clinical measurement of Hepcidin-25 in human serum: Is quantitative mass spectrometry up to the job?* EuPA Open Proteomics, 2014. **3**: p. 60-67.
271. Kobold, U., et al., *Quantification of hepcidin-25 in human serum by isotope dilution micro-HPLC-tandem mass spectrometry*. Clin Chem, 2008. **54**(9): p. 1584-6.
272. Bansal, S.S., et al., *Quantitation of hepcidin in human urine by liquid chromatography-mass spectrometry*. Anal Biochem, 2009. **384**(2): p. 245-53.
273. Wolff, F., et al., *Hepcidin-25: Measurement by LC-MS/MS in serum and urine, reference ranges and urinary fractional excretion*. Clin Chim Acta, 2013. **423**: p. 99-104.
274. Bansal, S.S., et al., *Quantification of hepcidin using matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry*. Rapid Commun Mass Spectrom, 2009. **23**(11): p. 1531-42.

275. Bros, P., et al., *Impurity determination for hepcidin by liquid chromatography-high resolution and ion mobility mass spectrometry for the value assignment of candidate primary calibrators*. Anal Bioanal Chem, 2017. **409**(10): p. 2559-2567.
276. Dauvilliers, Y., et al., *Association between serum hepcidin level and restless legs syndrome*. Mov Disord, 2018. **33**(4): p. 618-627.
277. Delaby, C., et al., *Quantification of hepcidin-25 in human cerebrospinal fluid using LC-MS/MS*. Bioanalysis, 2017. **9**(4): p. 337-347.
278. Itkonen, O., et al., *Preanalytical factors and reference intervals for serum hepcidin LC-MS/MS method*. Clin Chim Acta, 2012. **413**(7-8): p. 696-701.
279. Kroot, J.J., et al., *(Pre)analytical imprecision, between-subject variability, and daily variations in serum and urine hepcidin: implications for clinical studies*. Anal Biochem, 2009. **389**(2): p. 124-9.
280. Kroot, J.J., et al., *Results of the first international round robin for the quantification of urinary and plasma hepcidin assays: need for standardization*. Haematologica, 2009. **94**(12): p. 1748-52.
281. Swensen, A.C., et al., *Whole blood and urine bioactive Hepcidin-25 determination using liquid chromatography mass spectrometry*. Anal Biochem, 2017. **517**: p. 23-30.
282. Houbart, V., et al., *Hepcidin determination in dried blood by microfluidic LC-MS/MS: comparison of DBS and volumetric absorptive microsampling for matrix effect and recovery*. Bioanalysis, 2015. **7**(21): p. 2789-99.
283. Ganz, T., et al., *Immunoassay for human serum hepcidin*. Blood, 2008. **112**(10): p. 4292-7.
284. Lasocki, S., et al., *Impact of iron deficiency diagnosis using hepcidin mass spectrometry dosage methods on hospital stay and costs after a prolonged ICU stay: Study protocol for a multicentre, randomised, single-blinded medico-economic trial*. Anaesth Crit Care Pain Med, 2017. **36**(6): p. 391-396.
285. Ecker, D.M., S.D. Jones, and H.L. Levine, *The therapeutic monoclonal antibody market*. MAbs, 2015. **7**(1): p. 9-14.
286. Oude Munnink, T.H., et al., *Therapeutic drug monitoring of monoclonal antibodies in inflammatory and malignant disease: Translating TNF-alpha experience to oncology*. Clin Pharmacol Ther, 2016. **99**(4): p. 419-31.
287. Mulleman, D., et al., *Infliximab concentration monitoring improves the control of disease activity in rheumatoid arthritis*. Arthritis Res Ther, 2009. **11**(6): p. R178.
288. Gao, B., et al., *Evidence for therapeutic drug monitoring of targeted anticancer therapies*. J Clin Oncol, 2012. **30**(32): p. 4017-25.
289. Minasian, L., et al., *Optimizing dosing of oncology drugs*. Clin Pharmacol Ther, 2014. **96**(5): p. 572-9.
290. Ferrara, N., H.P. Gerber, and J. LeCouter, *The biology of VEGF and its receptors*. Nat Med, 2003. **9**(6): p. 669-76.
291. Ferrara, N., et al., *Discovery and development of bevacizumab, an anti-VEGF antibody for treating cancer*. Nat Rev Drug Discov, 2004. **3**(5): p. 391-400.
292. Folkman, J., *Tumor angiogenesis: therapeutic implications*. N Engl J Med, 1971. **285**(21): p. 1182-6.
293. Hurwitz, H., et al., *Bevacizumab plus irinotecan, fluorouracil, and leucovorin for metastatic colorectal cancer*. N Engl J Med, 2004. **350**(23): p. 2335-42.
294. Lu, J.F., et al., *Clinical pharmacokinetics of bevacizumab in patients with solid tumors*. Cancer Chemother Pharmacol, 2008. **62**(5): p. 779-86.
295. Genentech, <http://www.gene.com/gene/products/information/pdf/avastin-prescribing.pdf>. 2012.
296. Caulet, M., et al., *Bevacizumab Pharmacokinetics Influence Overall and Progression-*

- Free Survival in Metastatic Colorectal Cancer Patients*. Clin Pharmacokinet, 2016. **55**(11): p. 1381-1394.
297. Neubert, H., et al., *2018 White Paper on Recent Issues in Bioanalysis: focus on immunogenicity assays by hybrid LBA/LCMS and regulatory feedback (Part 2 - PK, PD & ADA assays by hybrid LBA/LCMS & regulatory agencies' inputs on bioanalysis, biomarkers and immunogenicity)*. Bioanalysis, 2018.
 298. DeSilva, B., et al., *Recommendations for the bioanalytical method validation of ligand-binding assays to support pharmacokinetic assessments of macromolecules*. Pharm Res, 2003. **20**(11): p. 1885-900.
 299. Damen, C.W., et al., *Development and validation of an enzyme-linked immunosorbent assay for the quantification of trastuzumab in human serum and plasma*. Anal Biochem, 2009. **391**(2): p. 114-20.
 300. Hoofnagle, A.N. and M.H. Wener, *The fundamental flaws of immunoassays and potential solutions using tandem mass spectrometry*. J Immunol Methods, 2009. **347**(1-2): p. 3-11.
 301. Ezan, E. and F. Bitsch, *Critical comparison of MS and immunoassays for the bioanalysis of therapeutic antibodies*. Bioanalysis, 2009. **1**(8): p. 1375-88.
 302. El Amrani, M., et al., *Quantification of active infliximab in human serum with liquid chromatography-tandem mass spectrometry using a tumor necrosis factor alpha -based pre-analytical sample purification and a stable isotopic labeled infliximab bio-similar as internal standard: A target-based, sensitive and cost-effective method*. J Chromatogr A, 2016. **1454**: p. 42-8.
 303. Chiu, H.H., et al., *Development of a general method for quantifying IgG-based therapeutic monoclonal antibodies in human plasma using protein G purification coupled with a two internal standard calibration strategy using LC-MS/MS*. Anal Chim Acta, 2018. **1019**: p. 93-102.
 304. Chiu, H.H., et al., *Development of an LC-MS/MS method with protein G purification strategy for quantifying bevacizumab in human plasma*. Anal Bioanal Chem, 2017. **409**(28): p. 6583-6593.
 305. Nogue, G., et al., *Monitoring monoclonal antibody delivery in oncology: the example of bevacizumab*. PLoS One, 2013. **8**(8): p. e72021.
 306. Nakamura, A., et al., *High performance plasma amyloid-beta biomarkers for Alzheimer's disease*. Nature, 2018. **554**(7691): p. 249-254.
 307. Schindler, S.E., et al., *High-precision plasma beta-amyloid 42/40 predicts current and future brain amyloidosis*. Neurology, 2019.
 308. Wang, M., J. Chen, and I.V. Turko, *¹⁵N-labeled full-length apolipoprotein E4 as an internal standard for mass spectrometry quantification of apolipoprotein E isoforms*. Anal Chem, 2012. **84**(19): p. 8340-4.
 309. Proc, J.L., et al., *A quantitative study of the effects of chaotropic agents, surfactants, and solvents on the digestion efficiency of human plasma proteins by trypsin*. J Proteome Res, 2010. **9**(10): p. 5422-37.
 310. Simon, R., et al., *Total ApoE and ApoE4 isoform assays in an Alzheimer's disease case-control study by targeted mass spectrometry (n=669): a pilot assay for methionine-containing proteotypic peptides*. Mol Cell Proteomics, 2012. **11**(11): p. 1389-403.
 311. Martinez-Morillo, E., et al., *Assessment of peptide chemical modifications on the development of an accurate and precise multiplex selected reaction monitoring assay for apolipoprotein e isoforms*. J Proteome Res, 2014. **13**(2): p. 1077-87.
 312. Krokhin, O.V., W. Ens, and K.G. Standing, *Characterizing degradation products of peptides containing N-terminal Cys residues by (off-line high-performance liquid chromatography)/matrix-assisted laser desorption/ionization quadrupole time-of-flight*

- measurements*. Rapid Commun Mass Spectrom, 2003. **17**(22): p. 2528-34.
313. Martinez-Morillo, E., et al., *Total apolipoprotein E levels and specific isoform composition in cerebrospinal fluid and plasma from Alzheimer's disease patients and controls*. Acta Neuropathol, 2014. **127**(5): p. 633-43.
 314. Olkowicz, M., et al., *Development and analytical comparison of microflow and nanoflow liquid chromatography/mass spectrometry procedures for quantification of cardiac troponin T in mouse hearts*. Talanta, 2015. **131**: p. 510-20.
 315. Peslova, G., et al., *Hepcidin, the hormone of iron metabolism, is bound specifically to alpha-2-macroglobulin in blood*. Blood, 2009. **113**(24): p. 6225-36.
 316. Girelli, D., E. Nemeth, and D.W. Swinkels, *Hepcidin in the diagnosis of iron disorders*. Blood, 2016. **127**(23): p. 2809-13.
 317. Jordan, J.B., et al., *Hepcidin revisited, disulfide connectivity, dynamics, and structure*. J Biol Chem, 2009. **284**(36): p. 24155-67.
 318. Swinkels, D.W., et al., *Advances in quantitative hepcidin measurements by time-of-flight mass spectrometry*. PLoS One, 2008. **3**(7): p. e2706.
 319. Hunter, H.N., et al., *The solution structure of human hepcidin, a peptide hormone with antimicrobial activity that is involved in iron uptake and hereditary hemochromatosis*. J Biol Chem, 2002. **277**(40): p. 37597-603.
 320. Laarakkers, C.M., et al., *Improved mass spectrometry assay for plasma hepcidin: detection and characterization of a novel hepcidin isoform*. PLoS One, 2013. **8**(10): p. e75518.
 321. Macdougall, I.C., et al., *Current status of the measurement of blood hepcidin levels in chronic kidney disease*. Clin J Am Soc Nephrol, 2010. **5**(9): p. 1681-9.
 322. van der Vorm, L.N., et al., *Toward Worldwide Hepcidin Assay Harmonization: Identification of a Commutable Secondary Reference Material*. Clin Chem, 2016. **62**(7): p. 993-1001.
 323. Rogstad, S., et al., *A Retrospective Evaluation of the Use of Mass Spectrometry in FDA Biologics License Applications*. J Am Soc Mass Spectrom, 2017. **28**(5): p. 786-794.
 324. Zhang, Q., et al., *Generic automated method for liquid chromatography-multiple reaction monitoring mass spectrometry based monoclonal antibody quantitation for preclinical pharmacokinetic studies*. Anal Chem, 2014. **86**(17): p. 8776-84.
 325. Jourdil, J.F., et al., *Infliximab quantitation in human plasma by liquid chromatography-tandem mass spectrometry: towards a standardization of the methods?* Anal Bioanal Chem, 2017. **409**(5): p. 1195-1205.
 326. Administration, F.a.D., *Bioanalytical method validation guidance for industry*. 2018.
 327. Agency, E.M., *Bioanalytical method validation*. 2011(EMEA/CHMP/EWP/192217/2009 Rev. 1).
 328. Chace, D.H., *Mass Spectrometry in the Clinical Laboratory: General Principles and Guidance, 1st Edition*. CLSI, 2007.