



HAL
open science

**Mise au point d'un système chromatographique
permettant de détecter en ligne la présence d'inhibiteurs
de l'acétylcholinestérase et de comparer qualitativement
leurs activités inhibitrices**

Ye Yuan

► **To cite this version:**

Ye Yuan. Mise au point d'un système chromatographique permettant de détecter en ligne la présence d'inhibiteurs de l'acétylcholinestérase et de comparer qualitativement leurs activités inhibitrices. Chimie analytique. Université de Strasbourg, 2019. Français. NNT : 2019STRAF016 . tel-02965518

HAL Id: tel-02965518

<https://theses.hal.science/tel-02965518>

Submitted on 13 Oct 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.

Titre de thèse :

Mise au point d'un système chromatographique permettant de détecter en ligne la présence d'inhibiteurs de l'acétylcholinestérase et de comparer qualitativement leurs activités inhibitrices

Remerciements

Remerciements

Ce travail de recherche a été effectué au sein de l'Equipe de Chimie Analytique des Molécules BioActives et Pharmacognosie (CAMBAP), Equipe de recherche du Département des Sciences Analytiques (DSA) de l'IPHC (Institut Pluridisciplinaire Hubert Curien, UMR 7178), sous la direction et la supervision de Monsieur le Professeur MARCHIONI Eric.

4

Je tiens vivement à remercier mon directeur de thèse pour m'avoir accueilli au sein de son laboratoire et de m'avoir donné l'opportunité de faire cette thèse, mais aussi pour son encadrement, ses conseils, son amitié et son soutien tout au long de mon travail.

Je tiens à remercier aussi Madame ZHAO Minjie pour m'avoir beaucoup aidé lors de mes travaux de recherche et lors de la rédaction de mon article.

Je tiens à remercier tous les permanents de l'Equipe : Mesdames BERGAENTZLE Martine, BOURJOT Mélanie, CHARLES Han, GONDET Laurence, JULIEN-DAVID Diane, KOUMIMI Souade, LORDEL-MADELEINE Sonia, URBAIN Aurélie, VALOIS Ludivine et Messieurs ENNAHAR Saïd, MARCIC Christophe, MULLER Christian, pour leurs conseils et enseignements.

Je tiens à remercier tous les doctorants ou anciens doctorants de notre Equipe de recherche Mesdames AMENSAG Kamar, BELAOUIRA Randa, CHEMAM Yasmine, CZUBA Elodie, THIAM Khadidiatou, TRIAUX Zélie, et Messieurs BALDE Mamadou, CAVALCANTE Genildo, GIGLIUTO Antonio et WANE Thierno Mouhamed. Je tiens à remercier également aux permanents de TWISTAROMA, Mesdames LEITAO Céline, BRIGNIER Nathalie et Monsieur STEYER Damien pour leurs enseignements.

Un grand merci à mes parents et mon petit frère pour leur soutien de tous les instants.

Et enfin, un immense merci à ma femme Weiwei pour son soutien, sa patience et son amour.

Et enfin, je tiens à remercier le « Chinese Scholarship Council » (CSC) pour m'avoir fait bénéficier d'une bourse de thèse qui m'a permis de vivre confortablement en France.

Production scientifique

Publications acceptées

Y. Yuan, L. Valois, S. Lordel, E. Marchioni, L.M. Zhao, Apport de l'analyse chimique à la découverte de nutriments chimiopréventifs des maladies neurodégénératives, *Revue Neurologique*, 174 (2018) S26.

Wu L., Zhang Q., Zhang X., Lv C., Li J., **Yuan Y.**, Yin F. (2012). Pharmacokinetics and blood-brain barrier penetration of (+)-catechin and (-)-epicatechin in rats by microdialysis sampling coupled to high performance liquid chromatography with chemiluminescence detection. *J. Agric. Food Chem.*, 60, 9377–9383

Zhang Y., Wu L., Zhang Q., Li J., Yin F., **Yuan Y.** (2011). Pharmacokinetics of phenolic compounds of Danshen extract in rat blood and brain by microdialysis sampling. *J. Ethnopharmacol.* 136(1), 129-136.

Publication soumises

Ye Yuan, Minjie Zhao, Ludivine Valois, Saïd Ennahar, Martine Bergaentzlé, Eric Marchioni. *Online acetylcholinesterase inhibition evaluation by high-performance liquid chromatography–mass spectrometry hyphenated with an immobilized enzyme reactor. (Manuscript Number: JCA-19-873).*

Présentation

Communications orales :

1) **Le titre du Congrès** : Thermo Scientific Analytical Day, le 7 Juillet 2017, Faculté de Pharmacie de l'Université de Strasbourg, Illkirch-Graffenstaden

Titre de la présentation : Mise au point d'un système chromatographique permettant de détecter *on line* la présence d'inhibiteurs de l'acétylcholinestérase et de quantifier leurs activités inhibitrices

Liste des auteurs : **Ye Yuan**, Ludivine Valois, Minjié Zhao et Eric Marchioni

2) **Le titre du Congrès** : Potentiel de la chromatographie liquide pour des applications diverses et variées, du 13 au 15 Mai 2019 au Domaine Le Hameau de

l'Étoile, Montpellier

Titre de la présentation : Apport de l'analyse chimique à la découverte de nutriments chimio préventifs des maladies neurodégénératives

Liste des auteurs : Ye Yuan, Ludivine Valois, Minjié Zhao et Eric Marchioni

Obtention du prix de la "meilleure présentation"

Communications par affiches :

- 1) **Le titre du Congrès :** Journées de neurologie en langue française (JNLF), du 10 au 13 Avril 2018 à Bordeaux

Titre de la présentation : Apport de l'analyse chimique à la découverte de nutriments chimio préventifs des maladies neurodégénératives

Liste des auteurs : Ye Yuan, Ludivine Valois, Sonia Lordel, Minjié Zhao et Eric Marchioni

- 2) **Le titre du congrès :** Phytoday 2019, le 17 Mai 2019, Faculté de pharmacie de l'Université Libre de Bruxelles

Titre de la présentation : A qualitative inhibition potency comparison method for AChE inhibitors with an *on-line* HPLC-IMER-MS device and its application for screening the potential AChE inhibitors in the plant extract

Liste des auteurs : Ye Yuan, Ludivine Valois, Minjié Zhao et Eric Marchioni

Curriculum vitæ

YUAN, YE

19 Allée François Mitterrand, 67400 Illkirch-Graffenstaden, France

Chinois, marié, né le 03 Novembre 1987

Tel. : 06 72 68 09 47

E-mail : link19871103@gmail.com

Formation

- 09/2015 – actuel Ecole doctorale des Sciences Chimiques
Docteurant en chimie analytique dans laboratoire de Chimie Analytique des Molécules BioActives et Pharmacognosie (CAMBAP) – sujet de thèse : Mise au point d'un système chromatographique permettant de détecter en ligne la présence d'inhibiteurs de l'acétylcholinestérase et de comparer qualitativement leurs activités inhibitrices
- 09/2013 - 07/2015 Faculté de Pharmacie, Université de Strasbourg (UdS)
Master Science du Médicament - Analyse des Médicaments (M2)
- 09/2007 - 06/2012 Faculté de Pharmacie, Université Médicale de l'AnHui (Chine)
Licence Pharmacie (Pharmacologie), Mention assez bien
- 09/2003 - 06/2006 Lycée No.1 de Huai Nan (Chine) (mention : très bien)

Expériences professionnelles

- 01/2015 - 07/2015 Stage de M2S4 (6 mois) - Laboratoire de pharmacognosie et substances naturelles bioactive - UMR 7200 LIT (directrice :Professeur Annelise Lobstein)
Tutrice pédagogique : Dr. Véronika ČAKOVA
Sujet : Purification des dérivés phenanthréniques à partir d'orchidées par chromatographie de partage centrifuge
- 06/2014 - 07/2014 Stage volontaire - Equipe de Chimie Analytique des Molécules Bioactives, Faculté de Pharmacie (UdS)
Projet : Développement d'une méthode de quantification des

vitamines hydrosolubles par le couplage UPLC-QToF

2009 – 2012 Stage volontaire - Laboratoires de Chimie Analytique, Faculté de Pharmacie, Université Médicale d’AnHui (Chine)

Projet : Développement et Validation d’une méthode de quantification par HPLC des composés phénoliques dans des plantes médicinales chinoises.

Implication Associative

- 09/2016 – 09/2017 Président de l’Union des chercheurs et des étudiants Chinois en France à Strasbourg
- 10/2015 – 10/2017 Secrétaire de l’association des doctorants et des docteurs d’Alsace (Addal)
- 02/2013 - 03/2013 Bénévole au Bureau de la Vie Étudiante (Université de Reims Champagne-Ardenne)
- 11/2010 Obtention du 3^{ème} niveau du concours « Compétition de Création des Etudiants des Sciences à AnHui » sur 5755 travaux exposés. Projet : Enquête sur la prise des médicaments par la population locale d’AnHui
- 09/2009 - 06/2010 Vice-président de la Station de Radiodiffusion et Président de l’Association de Fervent des Sciences et Technologies, Université Médicale d’AnHui

Langues

Informatique

Chinois : Langue maternelle	Pack Office,
Français : Lu, Ecrit, Parlé courant	Empower (Waters)
Anglais : courant	micrOTOF (Bruker)

Centre d’intérêt

Bénévolat (obtention la récompense de Google), basket, voyages

Table des matières

Table des matières

Remerciements.....	3
Curriculum vitæ	9
Table des matières.....	12
Liste des figures	17
Liste des tableaux	21
Liste des abréviations.....	23
1 . Introduction	26
1.1. L'acétylcholinestérase	28
1.2. Les inhibiteurs de l'ACHÉ	31
1.2.1. Les inhibiteurs irréversibles	32
1.2.2. Les inhibiteurs réversibles	33
1.2.3. Évaluation de l'efficacité des inhibiteurs réversibles	35
1.3. IMER	37
1.3.1. Méthode d'immobilisation	37
1.3.2. Évaluation de l'activité de l'enzyme immobilisée	41
1.3.3. Utilisation d'un IMER couplé avec une chromatographie liquide à haute performance (CLHP).....	43
1.3.3.1. Utilisation de l'IMER en position pré-colonne.....	43
1.3.3.2. Utilisation de l'IMER en position post-colonne	45
1.4. Criblage des inhibiteurs de l'ACHÉ dans des extraits des plantes.....	46
2. Partie expérimentale 1	48
<i>Matériels et Méthodes</i>	<i>48</i>
2.1. Matériels.....	50
2.2. Les méthodes	53
2.2.1. Établissement de la courbe de Michaelis-Menten :.....	53
2.2.2. Fabrication de l'IMER en colonne selon la méthode dite « in batch »	53
2.2.3. Fabrication d'un IMER CIM-disk réalisé selon la méthode dite « in batch ».	55
2.2.4. Fabrication de l'IMER en colonne conçu selon la méthode dite « in situ »	57
2.2.5. Préparation de l'extrait alcaloïdique	58
3. Partie expérimentale 2	59
<i>Mise au point du dispositif</i>	<i>59</i>

3.1. Séparation des étalons d'inhibiteurs.....	62
3.1.1. Mode opératoire	62
3.1.2. Résultats et discussion	62
3.2. Influence des débits de CLHP et de pompe à substrat sur le pH	66
3.2.1. Mode opératoire	66
3.2.2. Résultats et discussion	67
3.3. Fabrication de l'IMER.....	68
3.3.1. IMER en colonne réalisé selon la méthode dite « in batch ».....	68
3.3.1.1. Mode opératoire	68
3.3.1.1.1. Détermination de l'activité catalytique de l'IMER	68
3.3.1.1.2. Utilisation de l'IMER en colonne conçu selon la méthode dite « in batch » dans le dispositif bioanalytique CLHP-IMER-SM.	69
3.3.1.1.3. L'influence de la quantité d'enzyme immobilisé et de la concentration de l'ACh sur la sensibilité du dispositif bioanalytique CLHP-IMER-SM.....	70
3.3.1.2 Résultats et discussion	70
3.3.2. IMER CIM-disk.....	74
3.3.2.1. Mode Opérateur.....	75
3.3.2.1.1. Détermination de l'activité de l'IMER CIM-disk AChE	75
3.3.2.1.2. Utilisation du IMER CIM-disk AChE dans le dispositif bioanalytique CLHP-IMER-SM.....	75
3.3.2.2. Résultats et discussion	75
3.3.3. IMER en colonne conçu selon la méthode dite « in situ ».....	77
3.3.3.1. Mode opératoire	77
3.3.3.1.1. Détermination de l'activité de l'IMER en colonne conçu selon la méthode dite « in situ »	77
3.3.3.1.2. Utilisation de l'IMER en colonne conçu selon la méthode dite « in situ » dans le dispositif bioanalytique CLHP-IMER-SM	78
3.3.3.2. Résultats et discussion	78
3.4. Concentration du Substrat (ACh)	80
3.4.1. Mode opératoire	80
3.4.2. Résultats et discussion	80
3.5. Influence de la teneur en MeOH dans la phase mobile sur le fonctionnement de l'IMER.....	83
3.5.1. Mode opératoire	83
3.5.2. Résultats et discussion	84
3.6. Stabilité de l'IMER	85

3.6.1. Mode opératoire	85
3.6.2. Résultats et discussion	85
3.7. Conclusion	87
4. Partie expérimentale 3	88
<i>Utilisation du dispositif</i>	88
4.1. Performances du dispositif bioanalytique CLHP-IMER-SM avec des étalons d'inhibiteurs de l'AcHE.	89
4.1.1. Spécificité	89
4.1.1.1. Mode opératoire	89
4.1.1.1.1. Remplacement de l'IMER par la colonne témoin	89
4.1.1.1.2. Injection de témoin négatif des inhibiteurs d'AcHE	89
4.1.1.2. Résultats et discussion	89
4.1.2. Sensibilité et relation dose-effet	91
4.1.2.1. Mode opératoire	91
4.1.2.2. Résultats et discussion	91
4.1.3. Répétabilité	92
4.1.3.1. Mode opératoire	92
4.1.3.2. Résultats et discussion	92
4.2. Performance de ce dispositif bioanalytique CLHP-IMER-SM lors de l'analyse d'un extrait de <i>Lycoris Radiata</i>	93
4.2.1. Mode opératoire	93
4.2.1.1. Analyse de l'extrait par CLHP-SM ²	93
4.2.1.2. Injection de l'extrait de <i>Lycoris Radiata</i> dans le dispositif bioanalytique CLHP-IMER-SM	94
4.2.1.3. Influence du changement de phase mobile sur la sensibilité du dispositif bioanalytique CLHP-IMER-SM	94
4.2.2. Résultats et discussion	94
4.3. Ajout d'une pompe de contre-gradient.....	99
4.3.1. Mode opératoire	99
4.3.2. Résultats et discussion	100
4.4. Criblage des inhibiteurs naturels dans les plantes médicinales de la médecine traditionnelle chinoise (MTC).....	102
4.4.1. Mode opératoire	103
4.4.1.1. Extraction alcaloïdique des plantes médicinales	103
4.4.1.2. Analyse des extraits par CLHP-SM	103
4.4.1.3. Criblage des inhibiteurs naturels.	104
4.4.2. Résultats et discussion	104

5. Conclusion	112
6. Bibliographie.....	116

Liste des figures

Figure 1	Réaction d'hydrolyse de l'acétylcholine par l'ACHé.....	29
Figure 2	Mécanisme d'action de l'ACHé lors de la neurotransmission.	29
Figure 3	Schéma du site actif de l'ACHé.	30
Figure 4	Schéma du site actif de l'ACHé en 3D.	31
Figure 5	Interaction de l'acétylcholinestérase avec des organophosphates.....	33
Figure 6	Structures chimiques des galanthamine, tacrine, rivastigmine, donépézil et huperzine A.....	35
Figure 7	Courbe permettant d'établir la valeur de l'IC ₅₀ d'un inhibiteur d'une réaction enzymatique.	36
Figure 8	Schéma des trois techniques d'immobilisation d'enzyme : (A) adsorption physique, (B) piégeage et (C) attachement covalent	38
Figure 9	Réaction des supports amine pour l'immobilisation covalente des enzymes avec les agents d'activation suivants (a) glutaraldéhyde, (b) carbonate de N, N-disuccinimidyle (DSC), (c) N, N-dissuccinimidylsuberate (DSS).....	40
Figure 10	Description de méthodes d'immobilisation covalente des enzymes. (a) formation de β-hydroxylamine, (b) formation de sel de diazonium, (c) formation de bases de Schiff et (d) formation d'amines par substitution nucléophile du groupe tresyle.	41
Figure 11	Courbe de <i>Michaelis-Menten</i> pour de l'ACHé immobilisée.	43
Figure 12	IMER en position pré-colonne: une seconde pompe connectée à une vanne de commutation permet de modifier la phase mobile après la réaction enzymatique. ..	44
Figure 13	Schéma d'utilisation de l'IMER en position post-colonne pour la détection de l'oxalate. M = phase mobile ; P = pompe ; S = injecteur ; SC = colonne de séparation ; ED = détecteur électrochimique ; Cp = ordinateur.	46
Figure 14	Schéma du système analytique. 1: injecteur; 2: colonne de séparation; 3 et 5: pompes à enzyme et substrat; 4 et 6: boucles de réaction; 7: spectromètre de masse à Electrospray.	47
Figure 15	Couplage CLHP-IMER-MS. Equation 1: l'ACHé immobilisée (●-E) catalyse l'hydrolyse de l'ACH (●→) en Cho (●); Equation 2: L'inhibiteur de l'ACHé (▲) inhibe la réaction d'hydrolyse.	49
Figure 16	Chromatogrammes de masse théoriques d'ions extraits (CIE) :	61
Figure 17	Présentation du dispositif de séparation chromatographique des étalons d'inhibiteurs de l'ACHé.	62
Figure 18	Chromatogrammes des ions extraits (CIE) des 3 inhibiteurs analysés en utilisant des phases mobiles isocratiques constituées de 15%, 25% and 30% MeOH (0,01% acide formique) respectivement.	64
Figure 19	Dispositif utilisé pour collecter la fraction contenant les trois premières minutes de l'éluat chromatographique.....	69
Figure 20	Couplage chromatographique CLHP-SM destiné à l'analyse des fractions collectées.	69
Figure 21	Courbe de Michaelis – Menten de l'IMER en colonne réalisé selon la.....	71
Figure 22	Chromatogrammes d'Ions Extraits (CIE) après avoir injecté 0,8 nmol des 3 inhibiteurs dans le dispositif bioanalytique CLHP-IMER-SM IMER AChE en colonne réalisé selon la méthode dite « in batch ».	72
Figure 23	Assemblage du dispositif IMER CIM-disk.....	74

Figure 24	Courbe de Michaelis – Menten obtenue avec l'IMER CIM-disk.	76
Figure 25	Chromatogramme d'Ions Extraits (CIE) après avoir injecté 0,8 nmol des 3 inhibiteurs dans le dispositif bioanalytique CLHP-IMER-SM quand l'IMER de type CIM-disk a été utilisé.....	77
Figure 26	La courbe de Michaelis – Menten obtenue avec l'IMER en colonne conçu selon la méthode dite « in situ ».....	79
Figure 27	Chromatogrammes Ion Extraits (CIE) après avoir injecté 0,8 nmol des 3 inhibiteurs dans le dispositif bioanalytique CLHP-IMER-SM quand l'IMER en colonne conçu selon la méthode dite « in situ » est utilisé.....	79
Figure 28	Relation entre la concentration du substrat (P), la capacité d'hydrolyse de l'IMER (H) et le pouvoir inhibiteur du composé élué.....	83
Figure 29	Influence du MeOH sur l'activité de l'IMER.....	85
Figure 30	Activité enzymatique résiduelle de l'IMER en fonction du temps pendant 91 jours.....	86
Figure 31	Chromatogramme d'Ions Extraits (CIE) après avoir injecté 0,8 nmol des inhibiteurs dans le dispositif bioanalytique CLHP-IMER-SM équipé de la colonne témoin.	90
Figure 32	Chromatogramme d'Ions Extraits (CIE) après avoir injecté 2 nmol de lycorine dans ce dispositif bioanalytique CLHP-IMER-SM équipé de l'IMER en colonne conçu selon la méthode dite « in situ ».	91
Figure 33	Courbe relation dose-effet.....	92
Figure 34	Chromatogrammes d'ion Total (CIT) et d'Ions Extraits (CIE) de la fraction alcaloïdique de <i>Lycoris Radiata</i>	96
Figure 35	Spectres « MS/MS » des 2H-latifaliumin C, lycoramine, GL et lycorine retrouvés dans les extraits de <i>Lycoris Radiata</i>	96
Figure 36	Les Chromatogrammes d'ion Extraits (CIE) après avoir injecté l'extrait de <i>Lycoris Radiata</i> dans CLHP-IMER-SM dispositif bioanalytique.....	97
Figure 37	Ajout d'une pompe de contre-gradient dans le dispositif bioanalytique CLHP-IMER-SM.....	99
Figure 38	Profil des gradient et contre-gradient.	100
Figure 39	Chromatogramme d'Ions Extraits (CIE) de la fraction alcaloïdique de l'extrait de <i>lycoris Radiata</i> après l'ajout de la pompe de contre-gradient	102
Figure 40	Chromatogramme d'ion Total (CIT) et Chromatogrammes d'Ions Extraits (CIE) de la fraction alcaloïdique de la plante DNL, 2 mg/mL.	105
Figure 41	Chromatogramme d'ion Total (CIT) et Chromatogramme d'Ions Extraits (CIE) de la fraction alcaloïdique de la plante ATS, 2,5 mg/mL.....	106
Figure 42	Chromatogramme d'ion Total (CIT) et Chromatogrammes d'Ions Extraits (CIE) de la fraction alcaloïdique de la plante AQD, 2,0 mg/mL.....	106
Figure 43	Chromatogramme d'ion Total (CIT) et Chromatogrammes d'Ions Extraits (CIE) de la fraction alcaloïdique de la plante RGM, 2,0 mg/mL.....	107
Figure 44	Chromatogramme d'ion Total (CIT) et Chromatogrammes d'Ions Extraits (CIE) de la fraction alcaloïdique de la plante CAF, 4,5 mg/mL.....	107
Figure 45	Chromatogramme d'ion Total (CIT) et Chromatogrammes d'Ions Extraits (CIE) de la fraction alcaloïdique de la plante LCH, 1,0 mg/mL.....	108

Figure 46	Chromatogramme d'ion Total (CIT) et Chromatogrammes d'Ions Extraits (CIE) de la fraction alcaloïdique de la plante RGL, 5,0 mg/mL.....	108
Figure 47	Chromatogramme d'ion Total (CIT) et Chromatogrammes d'Ions Extraits (CIE) de la fraction alcaloïdique de la plante PCS, 2,0 mg/mL.....	109
Figure 48	Chromatogramme d'ion Total (CIT) et Chromatogrammes d'Ions Extraits (CIE) de la fraction alcaloïdique de la plante AFM, 1,6 mg/mL.	109
Figure 49	Chromatogrammes d'Ions Extraits (CIE) de la fraction alcaloïdique de la plante AFM injectée dans le dispositif bioanalytique CLHP-IMER-SM.	111
Figure 50	Chromatogrammes d'Ions Extraits (CIE) de l'eau MilliQ injectée dans le dispositif bioanalytique CLHP-IMER-SM comme le témoin négatif.	111

Liste des tableaux

Tableau 1. Temps de rétention, largeur des pics et résolution en utilisant une phase mobile contenant respectivement 15%, 25% et de 30% de MeOH (0,01% acide formique).....	65
Tableau 2. Evaluation du pH de la phase mobile finale par mélanger de différents volumes de solution aqueuse d'acide formique et de solution de NH_4HCO_3 (15 mM, pH=7,9).	66
Tableau 3 Influence de la concentration de l'enzyme (AChE) et du substrat (ACh) sur la sensibilité du dispositif bioanalytique CLHP-IMER-MS.	73
Tableau 4 Influence de la concentration de l'ACh sur la sensibilité du dispositif bioanalytique CLHP-IMER-SM.....	82
Tableau 5 Les poids et les taux des extraits alcaloïdiques des plantes étudiées.....	104

Liste des abréviations

AA	Alcaloïde d' <i>Amaryllidaceae</i>
ACh	Acétylcholine
AChE	Acétylcholinestérase
ACN	Acétonitrile
AFM	<i>Asarum forbesii Maxim</i>
AQD	<i>Akebia quinata Decne</i>
AR	Activité résiduelle
ASG	Gorge du site actif
ATC	Acétylthiocholine
ATS	<i>Acorus tatarinowii Schott</i>
BChE	Butyrylcholinestérase
CAF	<i>Clematis armandii Franch</i>
Cho	Choline
CIE	Chromatogramme d'Ion Extrait
CIT	Chromatogramme d'Ion Total
<i>CIM-disk</i>	Une phase stationnaire monolithique (<i>Convective Intraction Media</i>)
CLHP	Chromatographie en phase liquide à haute performance
CoA	Coenzyme A
DFP	Diisopropylfluorophosphate
DNL	<i>Dendrobium nobile Lindl</i>
DSC	N, N-dissucinimidyle
DSS	N, N-disuccinimidylsuberate
EC	Commission des enzymes
EDA	Éthylènediamine
ESI	Ionisation par électronébuliseur (<i>Electrospray ionization</i>)
FDA	Agence fédérale américaine des produits alimentaires et médicamenteux
GL	Galanthamine
Glu	Acide glutamique
His	Histidine

HRS	Criblage en haute résolution (<i>High resolution screening</i>)
HuA	Huperzine A
IC ₅₀	Concentration inhibitrice médiane
IMER	Réacteur d'enzyme immobilisée
K ⁺	Cation de potassium
K _i	Constante de dissociation enzyme-inhibiteur
K _m	Constante de Michaelis
LCH	<i>Ligusticum chuanxiong hort</i>
LoD	Limite de détection
MeOH	Méthanol
MTC	Médecine traditionnelle chinoise
SM	Spectrométrie de masse
OP	Organophosphate
PAS	Site d'anion périphérique
PCS	<i>Paecilomyces cicadae Samson</i>
PE	Phase greffée avec des enzymes immobilisées
PT	Phase témoin
PGA	Pénicilline-G-acylase
RGL	<i>Rehmannia glutinosa Libosch</i>
RGM	<i>Radix Gentianae Macrophyllae</i>
Ser	Sérine
S/N	Rapport signal sur bruit (<i>Signal-to-noise ratio</i>)
SM	Spectrométrie de masse
TA	Tacrine
t _R	Temps de rétention
Q-tof-MS	Spectrométrie de masse en tandem quadripôle-temps de vol
V _{max}	Vitesse maximale d'une réaction enzymatique

1 . Introduction

L'acétylcholinestérase (AChE) peut catalyser spécifiquement la réaction d'hydrolyse de l'acétylcholine (ACh) en choline et en acide acétique. L'ACh est un des neurotransmetteurs les plus importants de notre système cholinergique central. La diminution de la concentration en ACh peut être tenue pour responsable de certains désordres neurologiques. C'est pourquoi les inhibiteurs de l'AChE peuvent être des candidats médicaments intéressants pour le traitement de certaines maladies neurodégénératives telles qu'Alzheimer. Le criblage de molécules bioactives d'origine naturelle peut permettre de découvrir des nouveaux candidats inhibiteurs de l'AChE [1].

La méthode usuellement utilisée pour faire un tel criblage consiste en 5 étapes :

1. Recherche sur l'extrait global afin de déterminer s'il a l'activité biologique désirée y est présente;
2. Réalisation de l'extraction avec différents solvants;
3. Fractionnement et isolation des composés actifs;
4. Caractérisation de la structure chimique des molécules actives;
5. Réalisation de tests pharmacologiques et toxicologiques pour les molécules actives identifiées.

Parmi ces étapes, le fractionnement et l'isolement des molécules actives sont très chronophages et chers. De plus, l'activité des molécules peut être éventuellement perdue pendant les manipulations à cause des étapes de dilution ou de la possible décomposition des métabolites [2].

Pour améliorer l'efficacité et l'exactitude du criblage, *de Jong et al.* ont proposé une méthode en ligne qui met en œuvre un couplage chromatographique (CLHP) couplé avec la spectrométrie de masse (Q-ToF-MS) [3]. Ces auteurs ont utilisé une colonne analytique destinée à séparer les molécules présentes dans l'extrait de plante. Les molécules éluées ont été mélangées *on-line* avec les solutions d'AChE et d'acétylcholine (ACh) injectées dans le circuit grâce à deux autres pompes chromatographiques. La choline (Cho) formée, issue de la réaction d'hydrolyse, a été enregistrée par le détecteur Q-ToF-MS fonctionnant en mode positif. Les résultats ont montré que cette méthode est rapide et fidèle. Cependant elle nécessite de

consommer la solution d'AChE de façon permanente, solution qui de plus, doit être maintenue dans de la glace. Tout cela augmente considérablement le coût et la complexité de l'analyse.

Récemment, V. Andrisano et al [4] ont proposé d'immobiliser l'enzyme au sein d'un réacteur (Immobilized Enzyme Reactor, IMER) afin d'accroître fortement tant la stabilité que l'activité de l'enzyme hydrolytique. Cet auteur a couplé l'IMER avec une pompe chromatographique. L'inhibiteur d'AChE a été injecté simultanément avec l'acétylthiocholine (ATCh) et la détection a été réalisée par spectrophotométrie d'absorption moléculaire en présence du réactif d'Ellman. En utilisant cette méthode, l'AChE n'a pas été consommée et l'activité inhibitrice des étalons d'AChE a pu être comparée par calcul des IC_{50} s. Par contre, cette méthode ne permettait ni de séparer en ligne les différents inhibiteurs ni de cribler des inhibiteurs naturels comme le permettait la méthode de *de Jong et al.*

Notre projet porte sur la mise au point d'un système chromatographique couplant la CLHP, un IMER et une détection par SM destiné à détecter les inhibiteurs d'AChE et comparer leurs activités inhibitrices respectives. En utilisant ce couplage, les inhibiteurs d'AChE peuvent être séparés en ligne et leurs activités inhibitrices comparées directement par la simple mesure par SM des pics chromatographiques de l'ACh résiduelle dont l'hydrolyse a été inhibée par les composés recherchés. Pour valider ce concept, 3 étalons connus d'inhibiteurs d'AChE (la galanthamine-GL, l'huperzine A-HuA et la tacrine-TA) ont été sélectionnés pour mettre au point les conditions analytiques de ce couplage. Des extraits de plantes ont été injectés dans ce dispositif afin de proposer de nouveaux candidats médicament inhibiteurs de l'AChE.

1.1. L'acétylcholinestérase

L'acétylcholinestérase (AChE; EC 3.1.1.7), qui se trouve dans le système nerveux central et périphérique, est responsable de la transmission du potentiel électrique à travers les synapses nerveuses et neuromusculaires [5]. Le rôle physiologique de cette enzyme est d'hydrolyser le neurotransmetteur acétylcholine (ACh) (**Figure 1**)

L'hydrolyse catalytique de l'ACh se produit dans le site actif de l'AChE par la triade catalytique Ser203-Glu334-His447 (**Figure 3**). Cette triade catalytique Ser203-Glu334-His447 est accompagnée par des chaînes polypeptidiques qui présentent un rôle important dans l'activité catalytique de l'enzyme. Ces chaînes polypeptidiques peuvent être divisées en deux régions: la région de "Acylation site" et la région de "choline binding site", qui aident à lier l'acétylcholine à la triade catalytique. L'acétylcholine pénètre dans le site actif de l'enzyme en passant par le "Peripheral Anionic Site" (PAS) et le "Active Site Gorge" (ASG) (**Figure 4**).

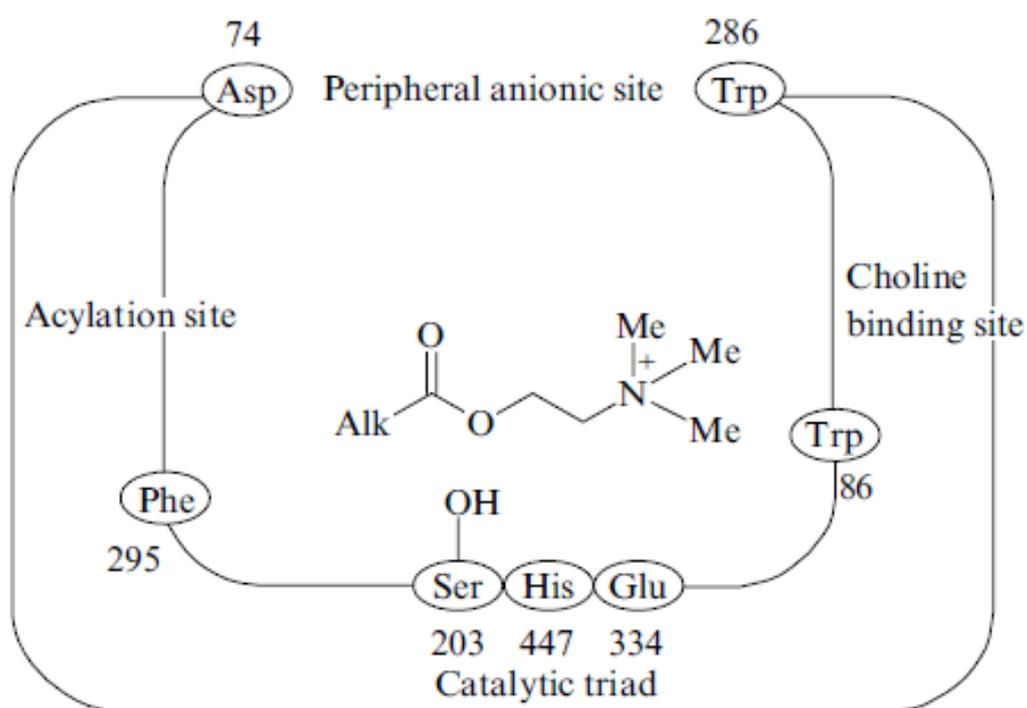


Figure 3 Schéma du site actif de l'AChE.

(Source : Antokhin, A. M. et al *Russian Chemical Reviews*, 79 (2010) 713-727).

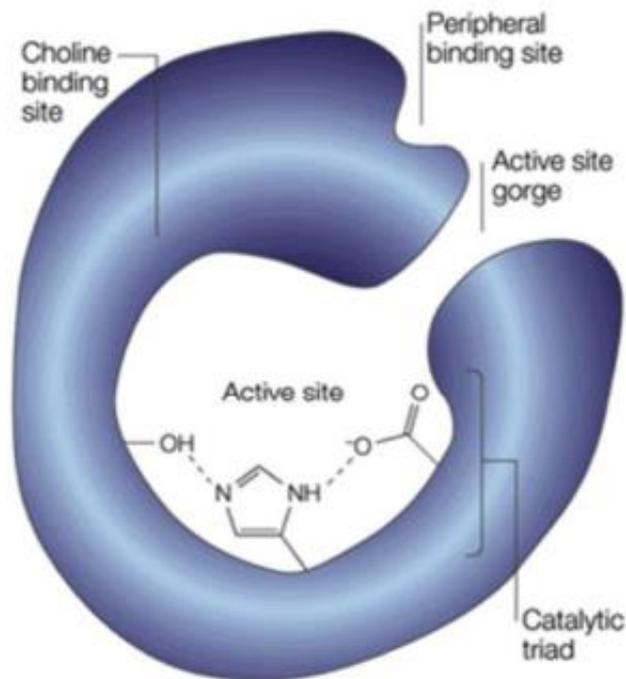


Figure 4 Schéma du site actif de l'AChE en 3D.
 (Source : Ramsay, R. R. et al, *Molecules*, 22 (2017)).

Comme l'AChE joue un rôle très important dans le système nerveux, elle représente une cible attrayante pour la conception, la recherche et la découverte rationnelle d'inhibiteurs basés sur des mécanismes réactionnels enzymatiques [6]. Diverses publications soutiennent que les inhibiteurs réversibles de l'AChE pouvant pénétrer dans le système nerveux central pourraient être utiles pour soulager les symptômes de la maladie d'Alzheimer [9-11]. Une caractéristique d'Alzheimer est un déficit cholinergique qui se développe tout au long de l'évolution de cette maladie [12]. Par conséquent, une élégante stratégie de traitement de la maladie d'Alzheimer pourrait consister à augmenter les niveaux d'ACh dans le cerveau simplement en inhibant l'activité de l'AChE [13-15].

1.2. Les inhibiteurs de l'AChE

Les inhibiteurs de l'AChE freinent la vitesse d'hydrolyse catalysée par l'enzyme et réduisent de fait la décomposition de l'ACh, augmentant ainsi la concentration et la durée de l'action des neurotransmetteurs. Selon le mode d'action, les inhibiteurs de l'AChE peuvent être divisés en deux groupes: les inhibiteurs irréversibles et les

inhibiteurs réversibles [16]. Les inhibiteurs réversibles de l'AChE ont souvent des applications thérapeutiques, tandis que des effets toxiques sont souvent associés aux inhibiteurs irréversibles [5, 17, 18].

1.2.1. Les inhibiteurs irréversibles

Les inhibiteurs irréversibles de l'AChE sont principalement des composés organophosphorés (OPs) [16]. Les OPs sont des esters ou des thiols dérivés d'acide phosphorique, phosphonique, phosphinique ou phosphoramidique comme le malathion, le diazinon, le diisopropylfluorophosphate (DFP) et les gaz neurotoxiques (sarin, tabun, VX), etc. Les OPs exercent leurs effets toxiques par une phosphorylation irréversible des acétylcholinestérases dans le système nerveux central [19, 20]. En effet, les OPs sont des analogues de l'ACh, substrat principal de l'AChE. La désactivation de l'AChE par OP se produit en deux étapes distinctes. Dans la première étape, OPs entrent dans le site actif et se lient de manière covalente au groupe sérine-OH en formant le complexe d'AChE-OP. Pendant la réaction covalente, l'OP est décomposé et l'enzyme est phosphorylée (**Figure 5**). La réaction de déphosphorylation de l'enzyme est très lente et l'AChE phosphorylée ne peut plus jouer son rôle d'hydrolyse des neurotransmetteurs [21]. Dans la deuxième étape, le complexe d'AChE-OP est transformé en un complexe irréversible. Cette étape est aussi appelé « ageing ». L'inhibition irréversible de l'enzyme entraîne une accumulation d'ACh dans la fente synaptique, ce qui entraîne une stimulation excessive des récepteurs ACh nicotiques et muscariniques ainsi qu'une neurotransmission entravée. Les symptômes typiques d'une telle action toxique aiguë sont l'agitation, la faiblesse musculaire, les fasciculations (brèves contractions involontaires et aléatoires) musculaires, le myosis (contraction de la pupille), l'hypersalivation, la transpiration excessive [22, 23]. L'activité de l'enzyme phosphorylée peut être régénérée par l'oxime qui peut se substituer à la serine phosphorylée avant le « ageing ».

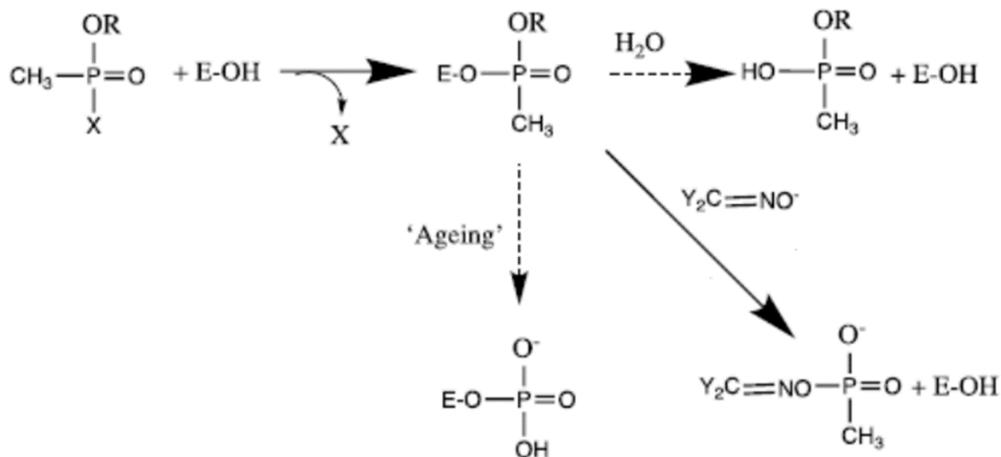


Figure 5 Interaction de l'acétylcholinestérase avec des organophosphates.
(Source : Ramsay, R. R. et al, *Molecules*, 22 (2017)).

1.2.2. Les inhibiteurs réversibles

Les inhibiteurs réversibles de l'AChE jouent un rôle important dans la régulation pharmacologique de l'activité enzymatique. Ces inhibiteurs comprennent des composés avec différents groupes fonctionnels (carbamate, groupe ammonium quaternaire ou tertiaire), et ont été utilisés dans le traitement de diverses maladies telles que la maladie d'Alzheimer [12]. Voici (**Figure 6**) quelques inhibiteurs réversibles de l'AChE pour le traitement de la maladie d'Alzheimer :

Galanthamine

La galantamine (*RazadyneTM*; *NivalinTM*) est un alcaloïde qui a été originalement isolé de la plante *Galanthus woronowii*, qui peut être utilisé pour le traitement de la maladie d'Alzheimer qualifiée de légère à modérée. C'est un inhibiteur compétitif réversible de l'AChE qui interagit avec le PAS (Peripheral Anionic Site), ainsi qu'avec l'ASG (Active Site Gorge) [24-26]. La galantamine présente deux autres caractéristiques: sa grande sélectivité pour l'AChE qui est de 10 à 50 fois supérieure à celle de la butyrylcholinestérase (BChE) [27, 28] et sa capacité de modulation allostérique des sites récepteurs nicotiques, ce qui permet d'augmenter la sensibilité des sites, et donc de renforcer la transmission cholinergique [29].

Tacrine

La tacrine (*CognexTM*) est un inhibiteur réversible non compétitif de l'AChE. Elle se lie près du site actif catalytique de l'AChE pour inhiber l'activité enzymatique et prolonger l'activité de l'ACh sur son récepteur [30]. La tacrine a été le premier des inhibiteurs de l'AChE approuvé en 1993 pour le traitement de la maladie d'Alzheimer, mais son utilisation a été abandonnée en raison des effets secondaires, notamment son hépatotoxicité [31].

Rivastigmine

La rivastigmine (*ExelonTM*) est un inhibiteur pseudo-irréversible qui bloque l'activité de la cholinestérase en se liant à la triade catalytique du site actif [32]. Bien qu'elle inhibe l'AChE et la BChE, elle est relativement sélective pour l'AChE dans le Système Nerveux Central (SNC). La rivastigmine a été approuvée tant par la FDA qu'en Europe (procédure centralisée) en avril 2000 [18].

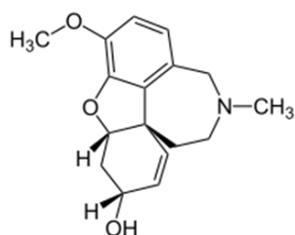
Donépézil

Le donépézil (*AriceptTM*) est un dérivé de la pipéridine, qui a également été approuvé pour le traitement de la maladie d'Alzheimer. C'est un inhibiteur réversible de l'AChE qui se lie au site anionique périphérique (PAS) et n'affecte pas le BChE [33]. Il a des effets symptomatiques et permet de traiter la maladie d'Alzheimer. Il permet également de retarder le dépôt de la plaque amyloïde [34] ou d'améliorer l'élimination de ladite plaque [35]. Sa demi-vie *in vivo* est relativement longue (environ 70 h), ce qui évite de recourir à des administrations trop fréquentes [5].

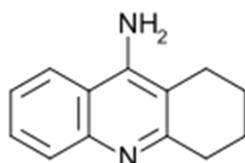
Huperzine A

L'huperzine A est un alcaloïde qui a été isolé pour la première fois de la plante *Huperzia serrata*. Il se lie au PAS, mais peut également pénétrer dans le « active site gorge » [36]. Il a une meilleure sélectivité pour l'AChE que la BChE [37]. Il est possible que l'huperzine A ait plusieurs cibles métaboliques supplémentaires telles que la protection de la fonction mitochondriale. Il peut également se comporter comme un

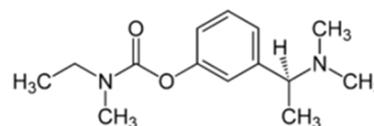
antioxydant [38]. Bien que l'huperzine A soit autorisée en tant que médicament pour le traitement de la maladie d'Alzheimer et de la démence vasculaire en Chine, elle n'est disponible que comme nutraceutique dans les pays de l'Europe et les Etats-Unis [39, 40].



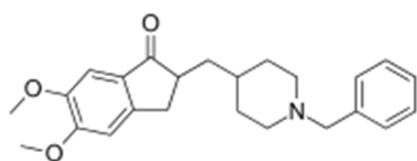
Galanthamine



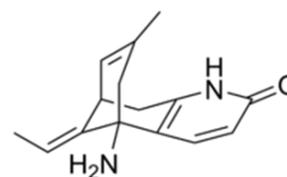
Tacrine



Rivastigmine



Donépézil



Huperzine A

Figure 6 Structures chimiques des galanthamine, tacrine, rivastigmine, donépézil et huperzine A.

1.2.3. Évaluation de l'efficacité des inhibiteurs réversibles

Le concept de concentration inhibitrice médiane (IC₅₀) est largement utilisé dans le monde pharmaceutique pour mesurer l'efficacité des inhibiteurs des réactions biologiques ou biochimiques. La valeur de l'IC₅₀ indique la concentration d'inhibiteur nécessaire pour inhiber à moitié un processus biologique donné (ex: réaction enzymatique). Autrement dit, en manipulant sous les mêmes conditions, plus l'IC₅₀ est élevée, moins l'inhibiteur est efficace [41].

Les valeurs d'IC₅₀ peuvent être calculées à partir de la courbe présentant en ordonnée la vitesse de formation du produit de la réaction en fonction de la concentration de l'inhibiteur. En principe, six à huit concentrations d'inhibiteur sont suffisantes pour établir la valeur de l'IC₅₀ d'un inhibiteur (**Figure 7**) [42]. Si l'expérience est effectuée en *triplicat*, il faut réaliser au moins 18 à 24 tests individuels.

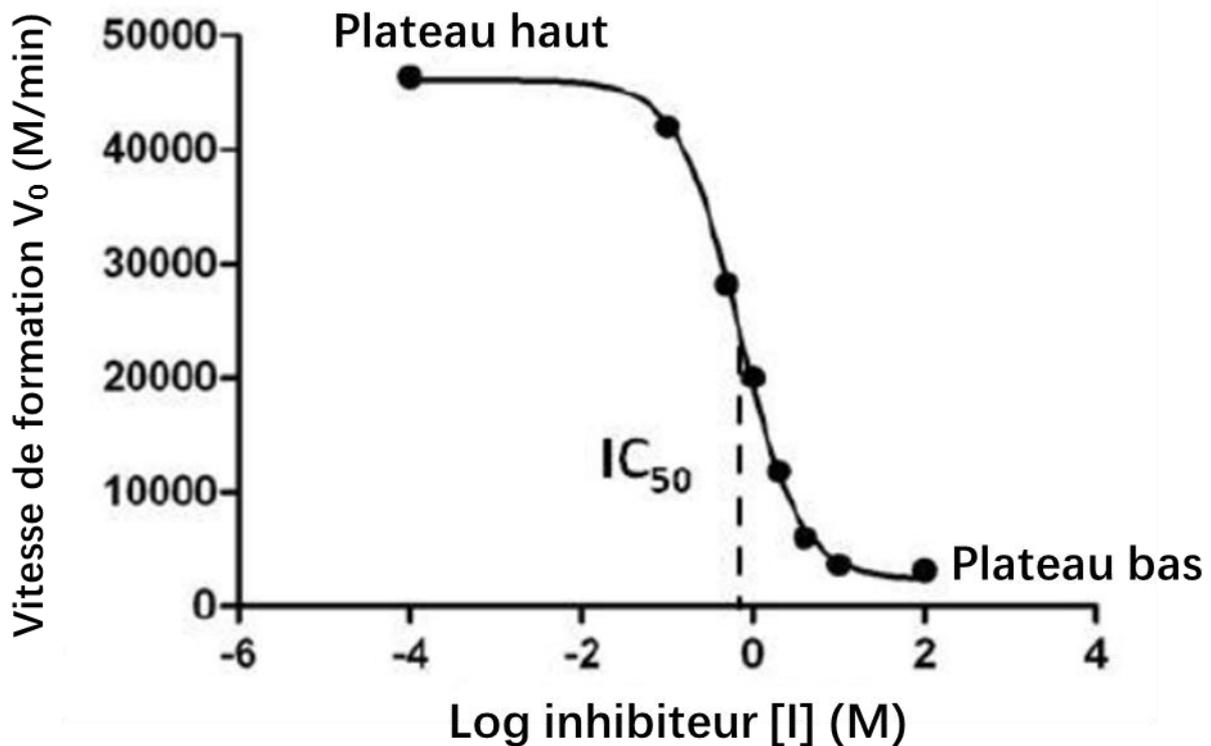


Figure 7 Courbe permettant d'établir la valeur de l' IC_{50} d'un inhibiteur d'une réaction enzymatique. (Source : Caldwell, Gary W et al, Current topics in medicinal chemistry, 12 (2012) 1282-1290).

Bien que l' IC_{50} soit largement utilisée pour évaluer l'efficacité de différents inhibiteurs, elle présente un inconvénient. En effet, la valeur de l' IC_{50} dépend fortement des conditions opératoires et il est donc très difficile de comparer les valeurs présentées dans des références scientifiques différentes [43].

Il est également envisageable, pour évaluer l'efficacité des inhibiteurs, d'utiliser la constante de dissociation enzyme-inhibiteur (K_i) en lieu et place de l' IC_{50} [43-45]. Typiquement, pour obtenir la valeur d' IC_{50} , au moins six concentrations différentes d'inhibiteurs réagissant avec juste une concentration de substrat sont nécessaires, autrement dit 18 mesures de la vitesse de formation du produit de la réaction sont nécessaires si l'expérience est faite en *triplicat*. Cependant pour obtenir les valeurs de K_i , six concentrations différentes de substrat réagissant avec une concentration unique de l'inhibiteur et sans inhibiteur respectivement sont nécessaires. Cela signifie qu'il faille réaliser 36 mesures de la vitesse de formation du produit de la réaction si l'expérience est fait en *triplicat*. La mesure des K_i requiert donc deux fois

plus de travail que la mesure des IC_{50} . Le K_i est donc beaucoup moins utilisé que l' IC_{50} .

1.3. IMER

Les enzymes immobilisées sont largement utilisées dans la biocatalyse, le biotraitement et la détection bio-spécifique des protéines et des métabolites dans les tissus biologiques [46]. Ils sont souvent immobilisés sur une phase stationnaire et placés dans des colonnes. Ils sont alors utilisés dans des systèmes chromatographiques en tant que bioréacteurs (IMER) [4, 47]. Il est souvent difficile de séparer les produits issus de l'hydrolyse, le substrat et les enzymes après que les enzymes solubles aient interagit avec leurs substrats. De plus, l'activité enzymatique dépend fortement du lot d'enzyme utilisé [48]. L'utilisation des IMERs peut permettre de résoudre une grande partie de ces problèmes. De plus, elle ne nécessite ni l'utilisation d'enzymes hautement purifiées ni une grande quantité de protéines [49]. l'immobilisation des enzymes permet principalement augmenter leur stabilité enzymatique vis-à-vis de la chaleur, des solvants organiques et du pH [50]. Enfin, les IMERs peuvent être utilisés de manière répétée aussi longtemps qu'ils restent actifs, minimisant ainsi les coûts et le temps d'analyse [47].

1.3.1. Méthode d'immobilisation

Plusieurs méthodes d'immobilisations ont été proposées dans la littérature pour l'immobilisation d'enzymes sur divers supports naturels et synthétiques. Elle peut être obtenue par soit la méthode "in situ" ou soit la méthode "in batch" [49]. Lors de l'utilisation du procédé "in batch", l'enzyme est d'abord immobilisée sur le support, en phase hétérogène, dans un bécher. Ce support est alors placé dans la colonne en utilisant une technique nommée "slurry packing" dans laquelle, la phase en suspension est versée dans la colonne, placée en position verticale, à travers un entonnoir. Dans le procédé dit "in situ", l'enzyme est directement immobilisée dans la colonne où le support a été préalablement pré-rempli selon la méthode de « slurry packing ».

Les techniques habituellement utilisées pour immobiliser des enzymes sur des supports solides sont principalement basées sur des mécanismes soit chimiques soit physiques. Les méthodes physiques incluent:

- (i) l'adsorption des enzymes sur un support poreux ou sur une matrice contenant des résidus échangeurs d'ions ou
- (ii) le piégeage des enzymes dans une matrice de gel insoluble [51] (**Figure 8**).

Ces méthodes physiques fournissent une perturbation très faible de la structure native de l'enzyme mais peuvent favoriser la fuite de la protéine adsorbée du support pendant son utilisation. La fuite d'enzyme peut se produire notamment en cas de légère modification de la température, du pH, de la force ionique ou simplement en raison de la présence d'un substrat au sein de l'effluent chromatographique [52, 53].

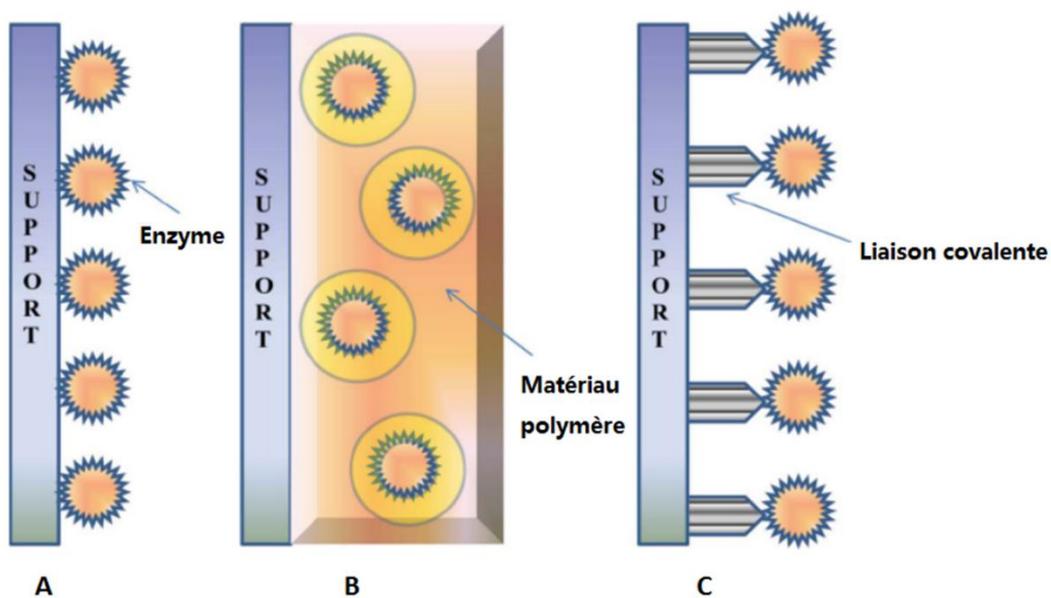


Figure 8 Schéma des trois techniques d'immobilisation d'enzyme : (A) adsorption physique, (B) piégeage et (C) attachement covalent

(Source : Mohamad, N. R. et al. , *Biotechnology, biotechnological equipment*, 29 (2015) 205-220)

Les méthodes d'immobilisation chimique, qui sont les plus largement utilisées, comprennent principalement la fixation de l'enzyme à la matrice par des liaisons covalentes. Elles permettent de prévenir le phénomène de désorption en présence de substrats et de solutions de force ionique élevée. Elles peuvent aussi réduire les taux de désactivation spontanée des enzymes [46, 48, 49]. Ces avantages, qui

impliquent une durée de vie plus longue des IMER, contrebalancent l'altération possible de la structure tertiaire native de l'enzyme qui entraîne une diminution de son activité catalytique. De plus, l'utilisation d'un mode de liaison covalent entraîne une stabilité thermique enzymatique plus élevée car l'interaction forte entre l'enzyme et le support provoque une rigidité de la structure de la protéine et limite par conséquent le mouvement thermique de celle-ci lorsqu'elle est exposée à de hautes températures [50]. En conséquence, l'enzyme immobilisée se déplie difficilement, son inactivation n'est pas aussi facile à se produire. La catalyse est plus efficace et génère une vitesse d'hydrolyse plus élevée [49].

Les groupes fonctionnels qui participent habituellement à cette liaison sont des groupes amine, époxy, carboxyle, diol et phénol qui, selon le mode de liaison, conduisent à une grande variété de réactions telles que les diazotation, la formation de liaisons amides, l'arylation, la formation de base de Schiff et l'amination [46].

La méthode la plus largement utilisée repose sur l'activation des supports contenant des groupes amines par l'utilisation du glutaraldéhyde et cela indépendamment de leur nature : poreuse, siliceuse, polymérique ou monolithique [54-57]. Une base de Schiff covalente se forme alors entre le groupe aldéhyde et le groupe amine du résidu de lysine d'enzyme (**Figure 9**). Certains chercheurs ont tenté d'améliorer la résistance à l'hydrolyse des liaisons covalentes en réduisant les liaisons imine et les groupes aldéhyde résiduels et cela, à l'aide d'un agent réducteur doux tel que le borohydrure de sodium [58, 59]. Un gain d'activité catalytique était constaté après la réduction.

D'autres auteurs [60] ont tenté d'éliminer la présence de groupes imine (**Figure 9**) pendant les réactions d'immobilisation en utilisant un agent d'activation tel que le carbonate de N, N-dissucinimidyle (DSC). Un autre agent, le N, N-disuccinimidylsuberate (DSS) a permis d'augmenter le caractère hydrophobe du support en introduisant une chaîne carbonée plus longue entre le support de l'enzyme. Ce faisant, les auteurs ont obtenu une séparation presque complète du produit d'hydrolyse et du substrat et cela sans utiliser de colonne chromatographique analytique.

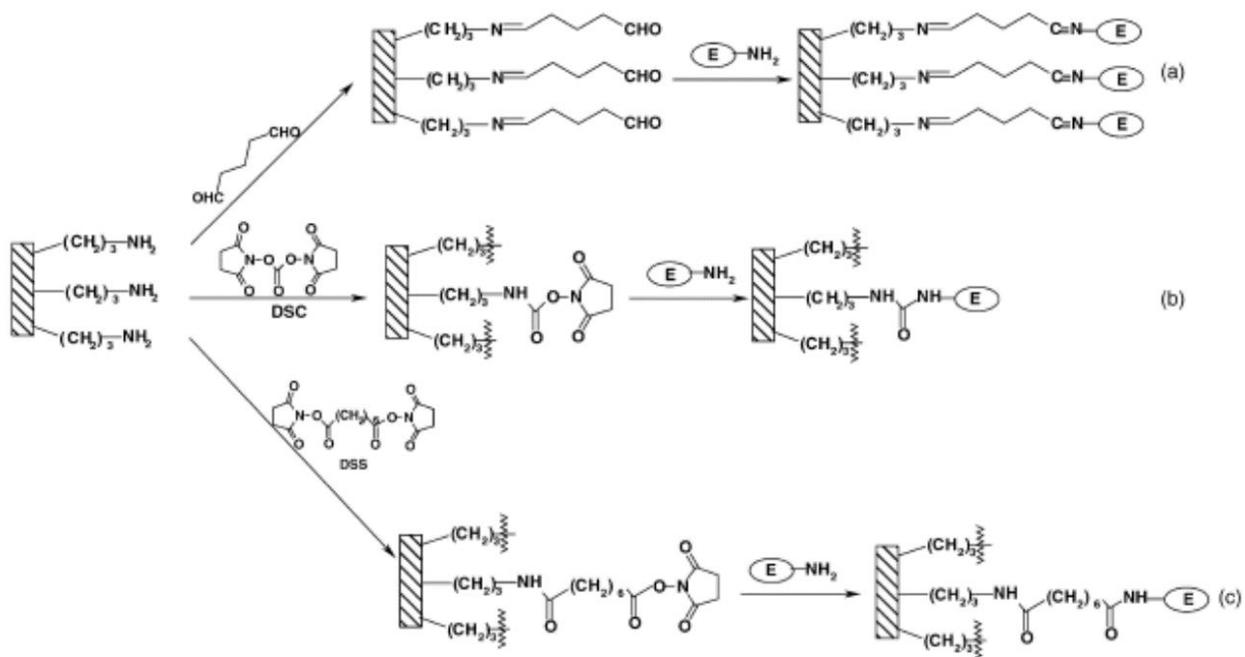


Figure 9 Réaction des supports amine pour l'immobilisation covalente des enzymes avec les agents d'activation suivants (a) glutaraldéhyde, (b) carbonate de N, N-disuccinimidyle (DSC), (c) N, N-dissuccinimidylsuberate (DSS).

(Source : Girelli, A. M. et al., Journal of chromatography. B, 819 (2005) 3-16).

D'autres méthodes pour l'immobilisation covalente d'enzymes sur des supports peuvent être obtenues via des groupes réactifs époxy, diol, diazo et tresyle [49] selon les schémas décrits dans la Figure 10.

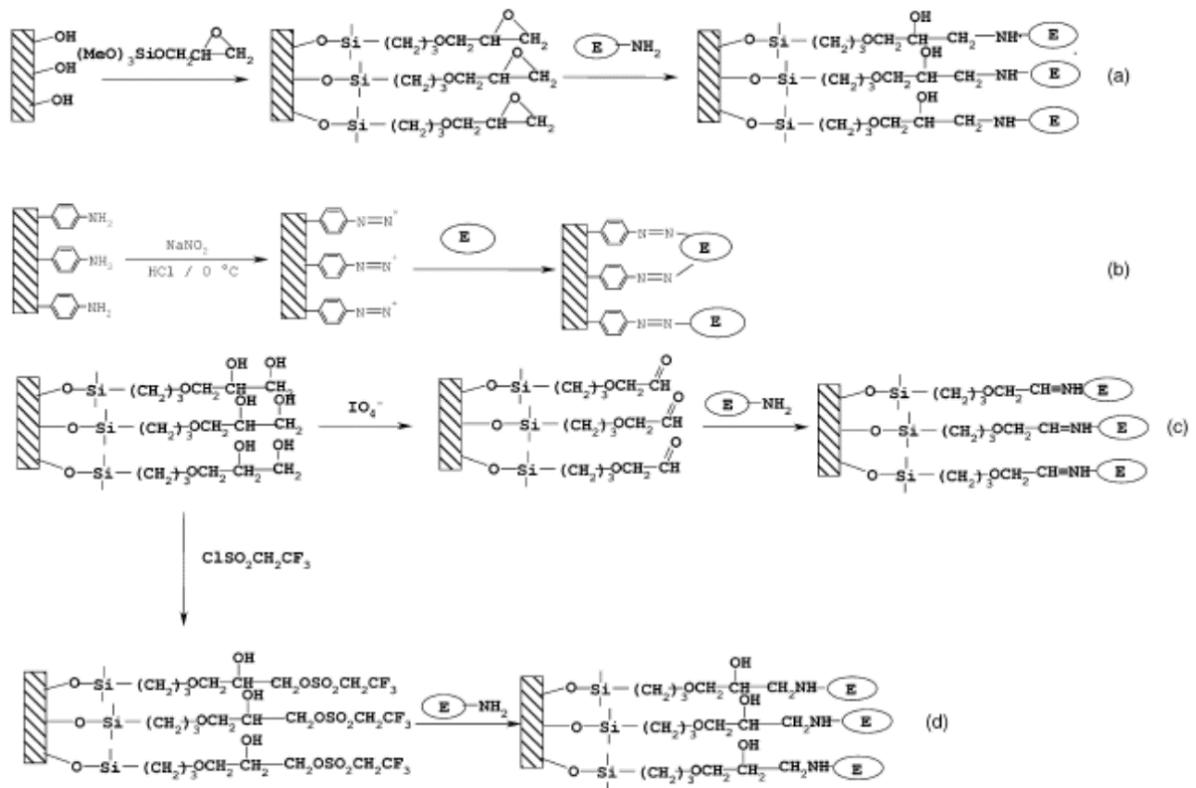


Figure 10 Description de méthodes d'immobilisation covalente des enzymes. (a) formation de β -hydroxylamine, (b) formation de sel de diazonium, (c) formation de bases de Schiff et (d) formation d'amines par substitution nucléophile du groupe tresyle.

(Source : Girelli, A. M. et al. , *Journal of chromatography. B*, 819 (2005) 3-16).

1.3.2. Évaluation de l'activité de l'enzyme immobilisée

En général, il existe trois méthodes pour évaluer l'activité de l'enzyme immobilisée:

1) Détermination de la quantité de protéines immobilisées

La quantité d'enzyme, en tant que protéines, immobilisée sur le support, peut être calculée à partir de la différence entre la quantité de protéines présente initialement dans la solution d'enzyme utilisée pour l'immobilisation et celle qui reste (finale) dans cette solution après la procédure d'immobilisation. Donc le taux des protéines immobilisées peut être déterminé par deux mesures spectrophotométriques à 215 nm et 280 nm en utilisant la formule mathématique suivante:

$$Y(\%) = \frac{P_i - P_f}{P_i} \times 100 \quad (\text{Formule 1})$$

P_i et P_f sont les valeurs d'absorbance UV initiale (avant le début de du procédé

d'immobilisation) et finale (après la fin du procédé d'immobilisation) de la solution d'enzyme à immobiliser, respectivement. Y(%) est le taux des protéines immobilisées [61].

2) Ratio d'activité éliminée

Le ratio d'activité éliminée représente l'activité perdue au sein de la solution d'enzyme après que les procédures d'immobilisation aient été réalisées. Ce ratio reflète indirectement l'activité de l'enzyme immobilisée [61, 62]. Le ratio d'activité éliminée est calculé par la formule suivante:

$$R(\%) = \frac{U_i - U_f}{U_i} \times 100 \quad \text{(Formule 2)}$$

U_i et U_f sont les activités enzymatiques présentes dans la solution avant et après que le processus d'immobilisation ait été réalisé. R(%) est le ratio d'activité éliminée.

3) Détermination de l'activité de l'enzyme immobilisée par injection d'un substrat dans l'IMER

L'IMER est placé entre la pompe CLHP et le détecteur, puis équilibré avec la solution de tampon. Après avoir injecté une série de solutions de substrat, la constante de *Michaelis* (K_m) et la vitesse initiale maximale (V_{max}) peuvent être calculées avec l'aide du logiciel mathématique *GraphPad Prism* (San Diego, Etats-Unis) par l'établissement de la courbe de *Michaelis-Menten* (**Figure 11**) en utilisant la formule suivante [4, 47, 63, 64]:

$$V_i = \frac{V_{max} \times [S]_0}{K_m + [S]_0} \quad \text{(Formule 3)}$$

$[S]_0$ est concentration initiale en substrat, V_i est vitesse initiale de la réaction enzymatique pour $[S]_0$.

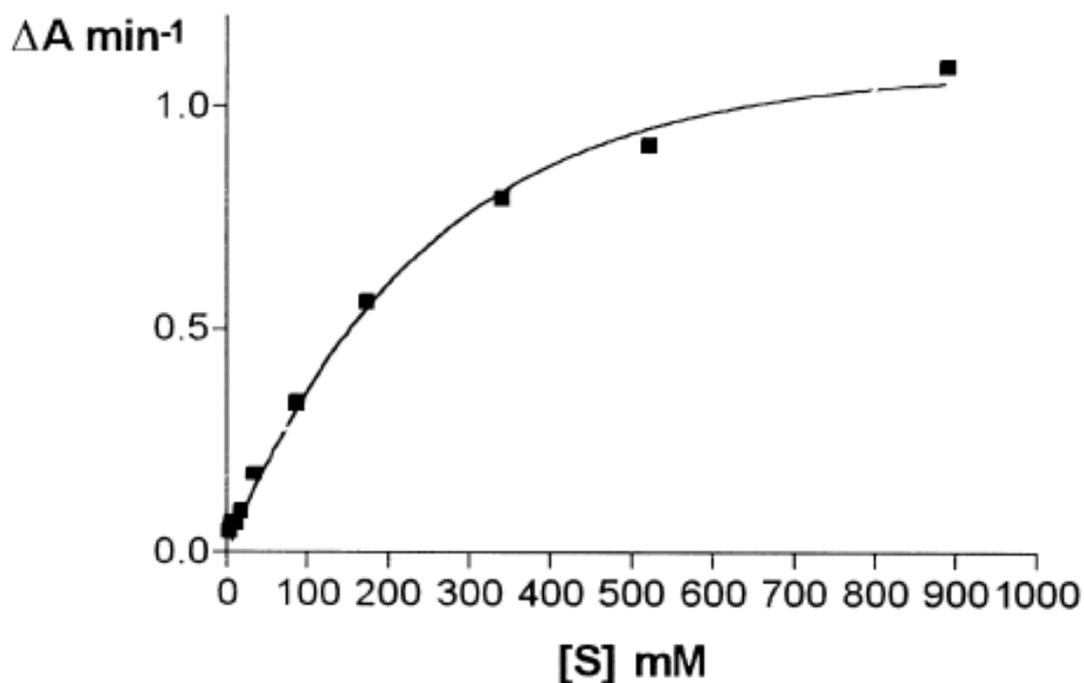


Figure 11 Courbe de *Michaelis-Menten* pour de l'AChE immobilisée.
 (Source : Andrisano, V et al. , *Journal of chromatography.B*, 753 (2001) 375-383).

1.3.3. Utilisation d'un IMER couplé avec une chromatographie liquide à haute performance (CLHP)

L'IMER peut être placé avant ou après la colonne analytique de CLHP. Dans le dernier cas (après la colonne ou en position post-colonne), l'IMER peut être considéré comme étant un détecteur spécifique. Il s'agit du cas le plus fréquemment retrouvé dans la bibliographie scientifique. Le premier cas (avant la colonne ou position pré-colonne) peut être utilisé pour la purification, le prétraitement enzymatique des analytes, ou le criblage à haut débit des inhibiteurs d'enzymes [54, 65-68].

1.3.3.1. Utilisation de l'IMER en position pré-colonne

L'IMER peut être placé avant la colonne de séparation chromatographique (**Figure 12**). Une vanne de commutation, située entre l'IMER et la colonne de séparation chromatographique, permet de transformer la phase liquide circulant dans l'IMER et responsable de la bonne réalisation de l'étape d'hydrolyse enzymatique, en une bonne phase mobile de séparation à l'échelle moléculaire. Cette pompe, dite de commutation, est le plus souvent chargée d'apporter la phase organique et les

tampons nécessaires à l'obtention d'une bonne résolution chromatographique.

De cette manière, il est possible d'éviter une éventuelle dénaturation de l'enzyme provoquée par l'utilisation d'un solvant organique ou d'un pH non neutre, nécessaire à la séparation sur le système chromatographique [54, 65].

Dans ce montage pré-colonne, l'IMER est utilisé pour prétraiter les analytes, présents dans des matrices complexes, telles que l'urine [65] et les tissus biologiques [66, 69], permettant ainsi une analyse plus simple sans interférence issue des matrices complexes.

Une importante application de l'IMER en position pré-colonne consiste à nettoyer l'échantillon de toute espèce d'interférentes présentes dans la matrice. Par exemple, pour déterminer l'acétylcholine dans un tissu biologique microdialysé, un IMER possédant de la choline oxydase immobilisée peut permettre d'éliminer la choline endogène interférente présente dans l'échantillon [66].

Une autre application utilisée est la purification en ligne des molécules chirales, par exemple en faisant passer les analytes contenant des racémiques d'esters méthyliques de l'acide 2-aryloxyalcanoïque dans un IMER contenant de la Pénicilline-G-acylase (PGA, énantiosélective) immobilisée, avant d'être détectées. Il est alors suffisant de connecter l'IMER à une colonne analytique achirale pour faire ce genre de criblage [70-72].

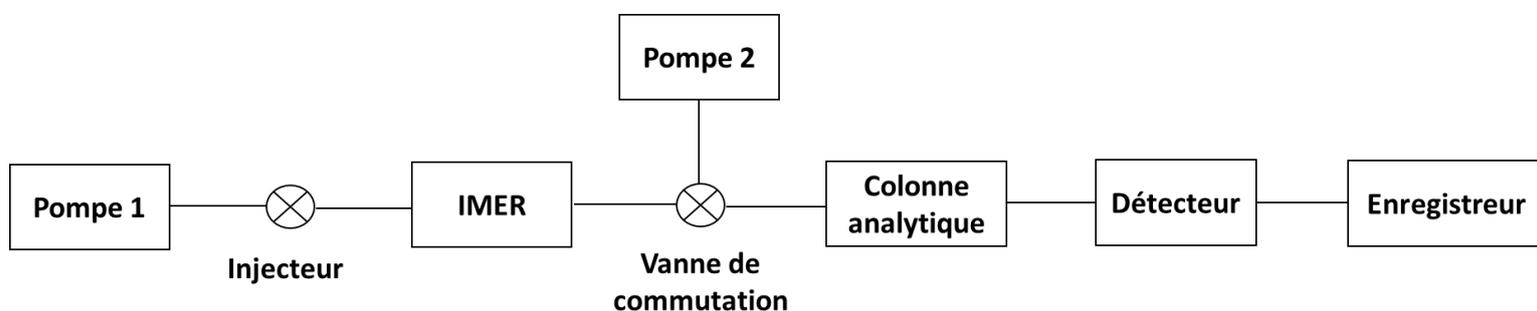


Figure 12 IMER en position pré-colonne: une seconde pompe connectée à une vanne de commutation permet de modifier la phase mobile après la réaction enzymatique.

(Source : Girelli, A. M. et al. , *Journal of Chromatography. B*, 819 (2005) 3-16).

1.3.3.2. Utilisation de l'IMER en position post-colonne

Lorsque l'IMER est en position post-colonne, les analytes sont d'abord séparés par une colonne de chromatographie, puis ils sont soumis à une hydrolyse enzymatique au sein de l'IMER et sont enfin détectés par un détecteur approprié (UV, fluorescence, MS, etc.). Les avantages de cette position reposent sur :

- d'une part la possibilité d'éviter les interférences avec les éventuels artefacts habituellement observés lors d'une réaction de dérivation post colonne sur des analytes isolées par chromatographie
- d'autre part sur une reproductibilité élevée qui peut être obtenue même dans le cas d'une conversion enzymatique incomplète ou d'une instabilité du produit de réaction. En effet, le passage direct des effluents chromatographiques entre la colonne de séparation et l'IMER, permet d'éviter toute intervention manuelle qui serait source d'erreurs ou de manque de reproductibilité des analyses les unes par rapport aux autres [67] .

Un exemple typique est la détermination de l'oxalate dans les tissus. L'oxalate est recherchée dans des matrices complexes telles que le plasma et l'urine [68, 73] en utilisant l'oxalate oxydase en tant qu'enzyme immobilisée après la séparation des métabolites (**Figure 13**). L'oxalate séparé par la colonne de séparation est hydrolysé en dioxyde de carbone et peroxyde d'hydrogène par oxalate oxydase immobilisée dans IMER et ensuite détectée par un détecteur électrochimique. La détection électrochimique du peroxyde d'hydrogène rend cette méthode analytique moins chère que d'autres méthodes couramment utilisées, puisqu'un grand nombre d'échantillons peuvent être analysés à l'aide de ce procédé permettant d'économiser bien du temps et des efforts.

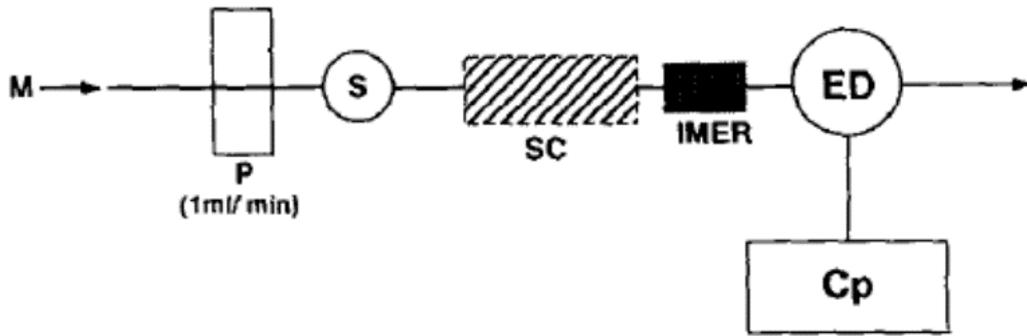


Figure 13 Schéma d'utilisation de l'IMER en position post-colonne pour la détection de l'oxalate. M = phase mobile ; P = pompe ; S = injecteur ; SC = colonne de séparation ; ED = détecteur électrochimique ; Cp = ordinateur.

(source : S. Yamato et al., *Journal of chromatography. B, Biomedical applications*, 656 (1994) 29-35).

1.4. Criblage des inhibiteurs de l'AChE dans des extraits des plantes

Le criblage de molécules bioactives d'origines naturelles peut permettre de découvrir des nouveaux candidats inhibiteurs de l'AChE. Les procédures standards usuellement utilisées pour faire un tel criblage consistent en 5 étapes :

1. Recherche sur l'extrait global afin de déterminer s'il a l'activité biologique désirée y est présente;
2. Réalisation de l'extraction avec différents solvants;
3. Fractionnement et isolation des composés actifs;
4. Caractérisation de la structure chimique développée des molécules actives;
5. Réalisation de tests pharmacologiques et toxicologiques avec les molécules actives identifiées [74, 75].

Parmi ces étapes, le fractionnement et l'isolement des molécules actives sont très chronophages et chers. L'activité des molécules peut être éventuellement perdue pendant les manipulations à cause des étapes de dilution ou de la possible décomposition des métabolites. De plus, les molécules bioactives isolées pourraient s'avérer être déjà connues et décrites, voire valorisées.

Pour compenser les inconvénients des procédures standards, une technique "high resolution screening" (HRS) a été utilisée [3, 76, 77]. Le mélange complexe est séparé

par la chromatographie liquide en phase inverse. Un test biochimique post-colonne détermine l'activité des composés actifs présents dans le mélange complexe, alors que la spectrométrie de masse (SM) caractérise chimiquement le ou les composés actifs. Une méthode typique HRS destinée au criblage des inhibiteurs de l'ACHé dans des extraits de plante a été proposé par *de Jong et al.* [3]. Ces auteurs ont utilisé une colonne analytique destinée à séparer les molécules présentes dans l'extrait de plante. Les molécules éluées ont été mélangées *on-line* avec les solutions d'ACHé et d'acétylcholine (ACh) injectées dans le circuit fluide grâce à deux autres pompes chromatographiques (**Figure 14**). La choline (Cho) formée, issue de la réaction d'hydrolyse de l'ACh avec l'ACHé, a été enregistrée par le détecteur Q-ToF-MS fonctionnant en mode positif. Les résultats ont montré que cette méthode est rapide et fidèle. Cependant elle nécessite de consommer la solution d'ACHé de façon permanente, solution qui de plus, doit être maintenue dans de la glace. Tout cela augmente considérablement le coût et la complexité de l'analyse.

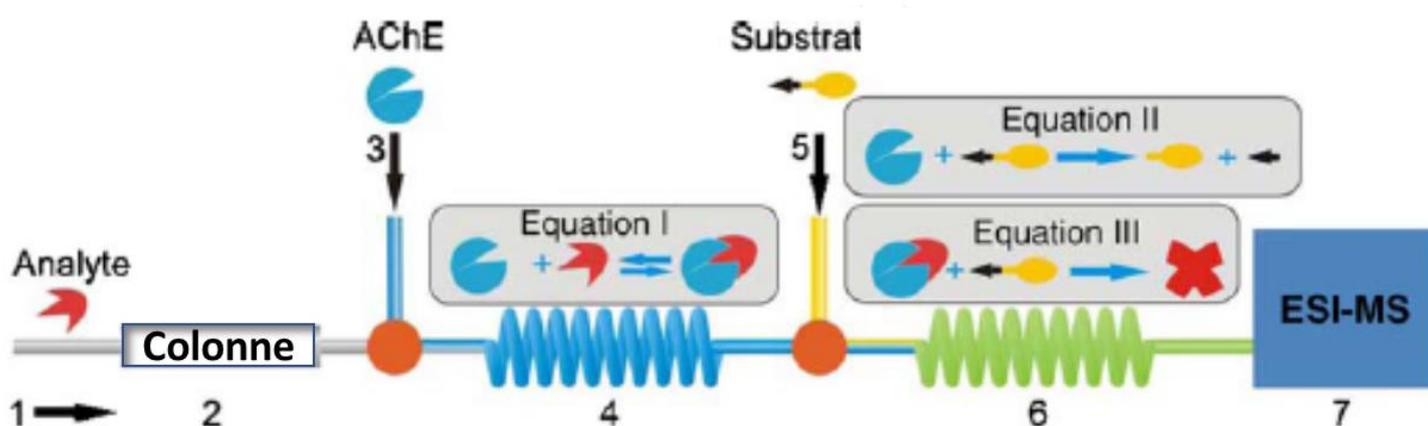


Figure 14 Schéma du système analytique. 1: injecteur; 2: colonne de séparation; 3 et 5: pompes à enzyme et substrat; 4 et 6: boucles de réaction; 7: spectromètre de masse à Electropray.

(Source : *De Jong, C. F. et al., Journal of Chromatography A, 1112 (2006) 303-310.*)

Pour compenser les inconvénients de la méthode HRS proposée par *de Jong et al.*, l'intégration d'un IMER dans ce couplage pourrait être une solution élégante et c'est le but des travaux de recherche présentés dans le cadre de cette thèse.

2. Partie expérimentale 1

Matériels et Méthodes

L'objectif général de notre travail de recherche est d'intégrer un IMER dans un couplage chromatographique destiné à réaliser un tri à haute résolution (High Resolution Screening, HRS). Il s'agissait de mettre au point un système chromatographique couplant la CLHP, un IMER et un détecteur par SM destiné à détecter en ligne les inhibiteurs de l'AChE et de comparer leurs activités inhibitrices respectives (Figure 15).

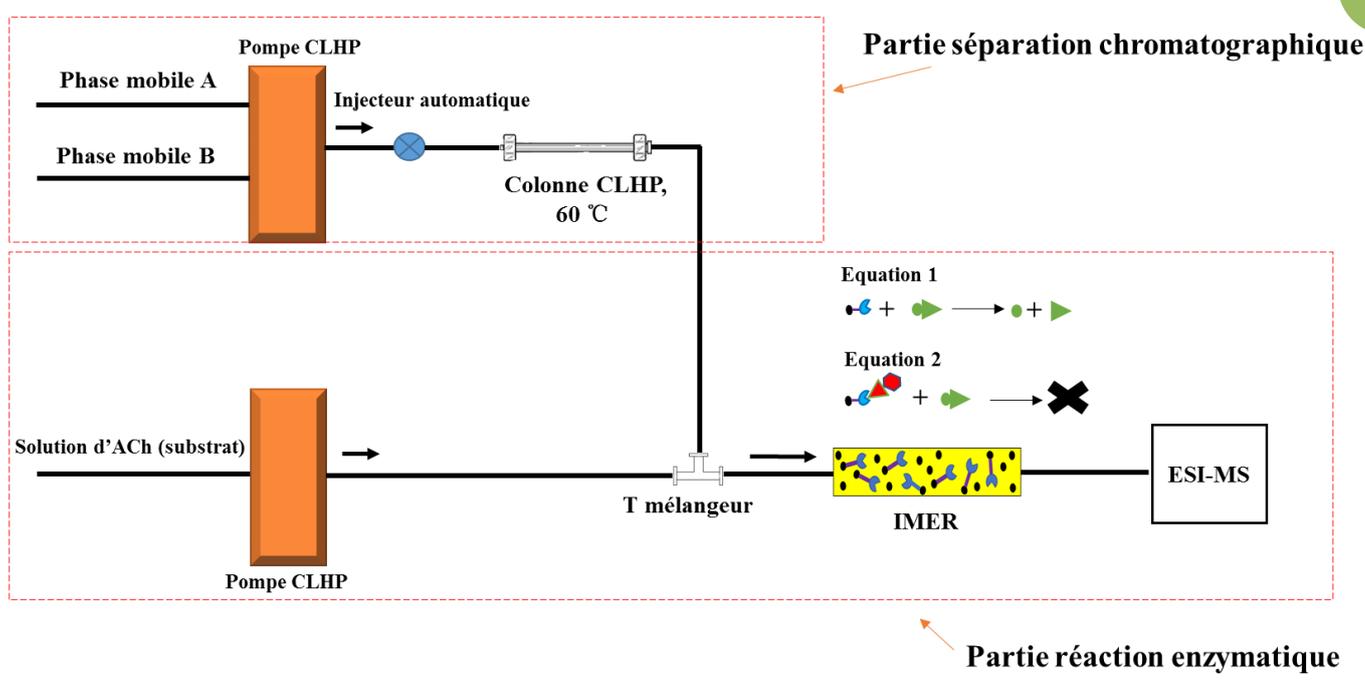


Figure 15 Couplage CLHP-IMER-MS. Equation 1: l'AChE immobilisée (●) catalyse l'hydrolyse de l'ACh (●) en Cho (●); Equation 2: L'inhibiteur de l'AChE (●) inhibe la réaction d'hydrolyse.

2.1. Matériels

- Réactif et molécules étudiées

- L'acétylcholinestérase de l'*Electrophorus electricus* (EC 3.1.1.7) (Sigma-Aldrich, St. Quentin Fallavier, France)
- L'ammoniaque (30 – 33% NH₃ dans l'eau) (Sigma-Aldrich, St. Quentin Fallavier, France)
- L'azoture de sodium (Sigma-Aldrich, St. Quentin Fallavier, France)
- Le chlorure d'acétylcholine (Sigma-Aldrich, St. Quentin Fallavier, France)
- Le chlorure de choline (Sigma-Aldrich, St. Quentin Fallavier, France)
- Le cyanoborohydrure de sodium (Sigma-Aldrich, St. Quentin Fallavier, France)
- Le dichlorométhane pour CLHP (Fisher Scientific, Illkirch-Graffenstaden, France)
- L'éthanol absolu pour CLHP (Fisher Scientific, Illkirch-Graffenstaden, France)
- L'éthanolamine (Sigma-Aldrich, St. Quentin Fallavier, France)
- La galanthamine (Euromedex, Souffelweyersheim, France)
- Le glutaraldéhyde (Sigma-Aldrich, St. Quentin Fallavier, France)
- L'huperzine A (Sigma-Aldrich, St. Quentin Fallavier, France)
- L'hydrogénophosphate de potassium (Sigma-Aldrich, St. Quentin Fallavier, France)
- L'isopropanol pour CLHP (Fisher Scientific, Illkirch-Graffenstaden, France)
- La lycoramine hydrobromide (Ambinter, Orléans, France)
- La lycorine hydrochloride (Ambinter, Orléans, France)
- Le phosphate de monopotassium (Sigma-Aldrich, St. Quentin Fallavier, France)
- Le sulfate de sodium anhydre (Sigma-Aldrich, St. Quentin Fallavier, France)
- La tacrine (Bio-Techne, Lille, France)

- Les composants de la phase mobile sont:

- Le méthanol pour CLHP (Fisher Scientific, Illkirch-Graffenstaden, France)
- Le bicarbonate d'ammonium (Fisher Scientific, Illkirch-Graffenstaden, France)
- L'eau ultrapure était générée par le Systèmes de purification d'eau Milli-Q (Millipore, MA, USA)

-
- L'acide formique (Sigma-Aldrich, St. Quentin Fallavier, France)
 - L'acétate d'ammonium (Sigma-Aldrich, St. Quentin Fallavier, France)
 - Microfiltre (0,2 µm) Xtra pet (CHROMAFIL®, Düren, Allemagne)
- **Les phases stationnaires pour immobilisation des enzymes sont :**
- Hypersil GOLD NH₂ chromatographic Silica (5 µm) qui a été gracieusement offert par Thermo Scientific (Illkirch-Graffenstaden, France)
 - EDA-CIM-Disk (BIA Separations, Ajdovščina, Slovenia)
- **Les plantes utilisées sont :**
- Les bulbes de *Lycoris Radiata* (Lotta Plants, Haarlem, Holland)
 - Les plantes médicinales de MTCs qui étaient achetées en Chine par la plate-forme officielle de commerce en ligne des MTCs (<https://www.zycst.com/>, certifié par le ministère du commerce de Chine)
- **Matériel de laboratoire :**
- Cryobroyeur (Spex Certiprep™ Cryogenic Freezer/Mill™, Illkirch-Graffenstaden, France)
- Agitateur à vortex (Vortex-Genie 2, Thermo, Illkirch-Graffenstaden, France)
- Agitateur orbital (Fisher Scientific, Illkirch-Graffenstaden, France)
- RM Multi-1 agitateur rotatif (STARLAB, Orsay, France)
- Colonne vide en acier (2,1 mm i.d x 20 mm, IDEX Health & Science, Middleborough, USA)
- Sonicateur (FB15101, Fisher Scientific, Illkirch-Graffenstaden, France)
- Micropipette (Eppendorf, Montesson, France)
- **Matériels Chromatographiques :**
- Les colonnes de chromatographie étaient :**
- Acquity UPLC BEH C18 (2,1x100 mm, 1,7 µm, 130 Å, Waters, Massachusetts, États-Unis) ;

-
- Acquity UPLC BEH shield RP₁₈ (2,1x100 mm, 1,7 μm, 130 Å, Waters, Massachusetts, États-Unis)
 - Acquity UPLC BEH phenyl (2,1x100 mm, 1,7 μm, 130 Å, Waters, Massachusetts, États-Unis).
 - Acclaim-Trinity-P1 (3,0 x 50 mm, 3 μm, Thermo, Illkirch-Graffenstaden, France)

Le four à colonne était du type CROCO-CIL™ (Cluzeau Info Labo, Sainte-Foy-La-Grande, France)

Une pompe CLHP Varian et de type Prostar 210 (LES ULIS, France) a été utilisée pour tasser la phase au sein de l'IMER.

Pour le dispositif bioanalytique CLHP-IMER-SM (Figure 15), la partie séparation chromatographique était constituée d'une chaîne de chromatographie de marque Thermo Fisher Scientific (Villebon Courtabœuf, France). Elle était constituée d'une pompe UltiMate 3000 SD et d'un injecteur automatique de type UltiMate 3000.

Pour la partie de réaction enzymatique, le tampon contenant le substrat était élué grâce à la pompe Prostar 210 (Varian, LES ULIS, France).

Une deuxième pompe CLHP Dionex Ultimate 3000 CLHP a été utilisée comme une pompe de contre-gradient.

Le spectromètre de masse était de marque Agilent, de type 1100 series LC/MSD Ion Trap Mass (Agilent, Californie, États-Unis) et équipé d'une source d'*Electrospray ionization* (ESI). L'acquisition des données a été réalisée à l'aide du logiciel Agilent LC/MSD Trap 5.3.

Pour le criblage des inhibiteurs d'AChE en utilisant le dispositif bioanalytique CLHP-IMER-SM et pour l'analyse des extraits des plantes, l'ESI fonctionnait en mode positif et la spectrométrie fonctionnait en mode « full scan » dans un intervalle de 50 à 600 (m/z). Les conditions d'Electrospray étaient les suivantes : pression et débit de gaz de séchage et de nébulisation (azote, pureté 99,999%) était de 276 kPa (40 psi) et de 10 L/h respectivement, sa température était de 350°C. La tension capillaire était de 4 000 V.

Pour l'établissement de la courbe de Michaelis-Menten, l'ESI fonctionnait en mode

positif et la spectrométrie fonctionnait en mode « full scan » dans un intervalle de 50 à 300 (m/z). Les conditions d'Electrospray étaient les suivantes : pression et débit de gaz de séchage et de nébulisation (azote, pureté 99,999%) était de 276 kPa (40 psi) et de 12 L/h respectivement, sa température était de 350°C. La tension capillaire était de 4 000 V.

2.2. Les méthodes

2.2.1. Etablissement de la courbe de Michaelis-Menten :

La courbe de Michaelis – Menten a été obtenue en représentant la vitesse de catalyse en fonction de la concentration de substrat injectée normalisée en utilisant les équations suivantes :

$$[\text{ACh}]_{\text{normalized}} = \frac{C_{\text{inj}} \cdot V_{\text{inj}}}{BV} \quad (\text{Equation 3})$$

$$v = \frac{V_{\text{max}}[S]}{K_m + [S]} \quad (\text{Equation 4})$$

Pour ce qui en est de l'équation 3, $[\text{ACh}]_{\text{normalized}}$ est la concentration de substrat injectée normalisée, C_{inj} est la concentration d'acétylcholine (ACh) injectée V_{inj} est le volume d'acétylcholine injecté et BV est le volume mort de l'IMER

Pour ce qui en est de l'équation 4, $[S]$ est la concentration initiale en substrat, v est la vitesse initiale, K_m est la Constante de Michaelis de l'enzyme et V_{max} est la vitesse initiale maximale.

Les valeurs de V_{max} et de K_m étaient déterminées à partir des données expérimentales et calculées à l'aide du logiciel Graph Pad®.

2.2.2. Fabrication de l'IMER en colonne selon la méthode dite « in batch »

1) Lavage avec un tampon au phosphate de potassium (50 mM, pH 7,0). 60 mg de phase sèche *Hypersil GOLD NH₂ chromatographic Silica* (5 μm) étaient placés dans un tube Eppendorf (1,5 mL). Après avoir ajouté 1 ml de tampon phosphate de potassium (50 mM, pH 7,0), la suspension était agitée à l'aide d'un vortex pendant 5 secondes et centrifugée pendant 30 s à 7500 g. Après avoir retiré le surnageant cette opération de lavage était répétée 3 fois.

- 2) Activation de phase stationnaire avec glutaraldéhyde. Après avoir ajouté 1mL de solution tampon au phosphate (50 mM, pH 6,0) contenant 10% (v/v) de glutaraldéhyde, la suspension était agitée à l'aide d'un vortex pendant 5 s et placée sous agitation (RM Multi-1 agitateur rotatif STARLAB, Orsay, France) pendant 12 h à 100 rpm. Le mélange était alors centrifugé et le surnageant était éliminé.
- 3) Lavage avec tampon phosphate de potassium (50 mM, pH 6,0). 1 mL de tampon au phosphate de potassium (50 mM, pH 6,0) était ajouté au culot. L'ensemble était agité à l'aide d'un vortex pendant 5 s et centrifugé pendant 30 s à 7500 g. Le surnageant était éliminé. Cette opération de lavage était répétée 3 fois.
- 4) Immobilisation de l'enzyme. Après avoir ajouté 800 μ L de tampon au phosphate de potassium (50 mM, pH = 6,0) contenant 24 U d'AChE, la suspension était agitée pendant 24 h en utilisant un RM Multi-1 agitateur rotatif (STARLAB, Orsay, France) à 100 rpm. Le mélange était ensuite centrifugé pendant 30 s à 7500 g et le surnageant est éliminé.
- 5) Lavage avec tampon phosphate de potassium (50 mM, pH 6,0). Cette opération était réalisée comme pendant l'étape 3.
- 6) Réduction de Base de Schiff. Après avoir ajouté 1 mL de tampon au phosphate de potassium (50 mM, pH = 6,0) contenant 100 mM de cyanoborohydrure de sodium, le mélange était agité à l'aide d'un vortex puis placée sous agitation (RM Multi-1 agitateur rotatif STARLAB, Orsay, France) pendant 2 h à 100 rpm. Le mélange était ensuite centrifugé et le surnageant était jeté.
- 7) Lavage avec tampon phosphate de potassium (50 mM, pH 6,0). Cette opération était réalisée comme pendant étape 3.
- 8) Réduction des groupes aldéhyde résiduels. Après avoir ajouté 1 mL de tampon au phosphate de potassium (50 mM, pH = 6,0) contenant 200 mM de monoéthanolamine, la suspension était agitée à l'aide d'un vortex puis placée sous agitation (RM Multi-1 agitateur rotatif STARLAB, Orsay, France) à 100 rpm pendant 3 h. Le mélange était ensuite centrifugé et le surnageant éliminé.
- 9) Lavage avec tampon phosphate de potassium (50 mM, pH 7,4). Après avoir

ajouté 1 mL de tampon au phosphate de potassium (50 mM, pH 7,4), la suspension était agitée à l'aide d'un vortex pendant 5 secondes et centrifugée pendant 30 secondes à 7500 g. Après avoir éliminé le surnageant, cette opération était répétée 3 fois.

- 10) Fabrication d'un IMER sans enzyme (le témoin). Cette phase a été réalisée en utilisant 60 mg de support chromatographique *Hypersil GOLD NH₂ chromatographic Silica* (5 µm) en suivant scrupuleusement les étapes d'immobilisation décrites précédemment, mais sans ajouter l'enzyme lors de l'étape 4.
- 11) Remplissage de la phase greffée : la phase préparée a été placée à l'intérieur d'une colonne vide en acier (2,1 mm d.i. x 20 mm, IDEX Health & Science, Middleborough, USA) selon la technique dite de *slurry packing* qui consiste à préparer une suspension de la phase greffée dans un tampon au phosphate de potassium (50 mM, pH 7,4) contenant 0,1% (p/v) de l'azide de sodium et de la verser à l'aide d'un Micropipette dans la colonne vide. Graduellement la phase déposée dans la colonne est tassée en faisant circuler le tampon au phosphate de potassium à l'aide d'une pompe de CLHP.
- 12) Conservation. L'IMER obtenu était conservé à 4°C dans un tampon au phosphate de potassium (50 mM, pH 7,4) contenant 0,1% (p/v) de l'azide de sodium.

2.2.3. Fabrication d'un IMER CIM-disk réalisé selon la méthode dite « in batch ».

Les étapes nécessaires à la conception IMER CIM-disk réalisé selon la méthode dite « in batch » sont les suivantes :

- 1) Lavage avec une solution ACN/eau (1:3, v/v). Après avoir placé le CIM-disk dans le disk-housing, la solution ACN/eau (1:3, v/v) a été circulée à travers le dispositif CIM-disk avec un débit de 1 mL/min pendant 30 min.
- 2) Activation de phase stationnaire avec le glutaraldéhyde. Le CIM-disk a été activé par circulation, d'une solution de glutaraldéhyde (25%)/ACN/eau (1:1:3, v/v/v), à un débit de 1 mL/min dans l'obscurité, pendant 20 min. Le *disk-housing* contenant le *CIM-disk* a alors été fermé à l'aide des deux bouchons et a été laissé ainsi

pendant 18 h à 30°C.

- 3) Lavage avec un tampon au phosphate de potassium (50 mM, pH 6,0). Le CIM-disk activé a été rincé par circulation à température ambiante avec un tampon au phosphate de potassium (50 mM, pH 6,0), à un débit de 1 mL/min pendant 30 min.
- 4) Immobilisation de l'enzyme. Le CIM-disk a été retiré du disk-housing et puis placé dans une petite ampoule en plastique de 2 mL dans laquelle ont été ajoutés 800 µL de tampon phosphate de potassium (50 mM, pH = 6,0) contenant 12 U d'AChE. L'ampoule a ensuite été mise sous agitation à température ambiante à l'aide d'un agitateur orbital (Fisher Scientific, Illkirch-graffenstaden, France) pendant 24 h.
- 5) Réduction des bases de schiff. Après immobilisation des enzymes, le *CIM-disk* a été replacé dans son *disk-housing* et a été rincé d'abord par circulation du tampon au phosphate de potassium (50 mM, pH 6,0) avec un débit de 0,3 mL/min pendant 30 min puis rincé au même débit et avec la même solution de tampon, mais contenant 100 mM de cyanoborohydrure de sodium pendant 120 min.
- 6) Réduction des groupes d'aldéhyde résiduels. Le *CIM-disk* a été rincé par circulation du tampon au phosphate de potassium (50 mM, pH 6,0) avec un débit de 0,3 mL/min pendant 30 min puis rincé au même débit et avec la même solution de tampon, mais contenant 200 mM de mono-éthanamine pendant 180 min.
- 7) Conservation l'IMER *CIM-disk* AChE. Après avoir rincé le *CIM-disk* par circulation du tampon au phosphate de potassium (50 mM, pH 7,4) avec un débit de 0,3 mL/min pendant 30 min, le CIM-disk a été retiré du *disk-housing* et a été placé pour stockage dans la solution de tampon au phosphate de potassium (50 mM, pH 7,4) contenant 0,1% (p/v) d'azide de sodium.

2.2.4. Fabrication de l'IMER en colonne conçu selon la méthode dite « in situ »

Les étapes à fabriquer un IMER en colonne selon la méthode dite « in situ » sont les suivantes :

- 1) Lavage avec tampon phosphate de potassium (50 mM, pH 7,0). La colonne vide en acier était d'abord remplie par la phase *Hypersil GOLD NH₂ chromatographic Silica* (5 µm) selon la méthode dite « slurry packing », puis rincée par le tampon phosphate de potassium (50 mM, pH 7,0) avec un débit de 0,5 mL/min, pendant 30 min.
- 2) Activation de phase stationnaire avec glutaraldéhyde. La colonne a été soumise à une circulation dans l'obscurité, de la solution au tampon phosphate de potassium (50 mM, pH = 6,0) contenant 10% (v/v) de glutaraldéhyde à 0,5 mL/min, pendant 12 h.
- 3) Lavage avec tampon phosphate de potassium (50 mM, pH 6,0). Après l'étape d'activation, la colonne a été rincée par le tampon au phosphate de potassium (50 mM, pH 6,0) à 0,5 mL/min pendant 30 min.
- 4) Immobilisation d'enzyme. 80 mL de la solution de tampon au phosphate de potassium (50 mM, pH 6,0) contenant 137 unités d'AChE ont été mis en circulation à travers l'IMER, en circuit fermé, avec un débit de 0,5 mL/min, pendant 24 h.
- 5) Réduction des bases de Schiff. Après immobilisation des enzymes, l'IMER a été rincé par le tampon au phosphate de potassium (50 mM, pH 6,0) avec un débit de 0,5 mL/min pendant 30 min. Après cette étape de rinçage, la solution tampon au phosphate de potassium (50 mM, pH = 6,0) contenant 100 mM de cyanoborohydrure de sodium a été circulée dans l'IMER avec un débit de 0,5 mL/min pendant 120 min.
- 6) Réduction des groupes résiduels d'aldéhyde. L'IMER pendant 30 min à travers l'IMER qui a été ensuite conservé à 4°C avant utilisation.

2.2.5. Préparation de l'extrait alcaloïdique

Les bulbes de *Lycoris Radiata* ont été coupés en petits morceaux et congelés pendant une nuit à -21 °C. Les morceaux de bulbes congelés et les plantes sèches ont été broyés par cryobroyage. 5 g du broyat ont été macérés avec 100 mL d'éthanol pendant une nuit et ensuite soumis aux ultrasons de 280 W pendant 30 min à température ambiante. Le filtrat a été récupéré. Après 3 répétitions des 30 min d'extraction, les filtrats ont été combinés. L'éthanol présent dans le solvant hydroalcoolique des filtrats combinés a été évaporé à l'aide d'un évaporateur rotatif à 40°C. Après évaporation du solvant, le résidu a été dispersé dans 50 mL d'HCl à 5% et dégraissé trois fois par 50 mL d'éther diéthylique à l'aide d'une ampoule à décanter. Le pH de la phase aqueuse restante a ensuite été ajusté à 10 en ajoutant la solution d'hydroxyde d'ammonium (30-33% NH₃ dans l'eau) et soumis à une extraction supplémentaire 3 fois avec 50 ml de dichlorométhane à l'aide d'une ampoule à décanter. Les phases organiques ont été combinées, séchées avec du Na₂SO₄ anhydre et évaporées à sec avec un évaporateur rotatif à 40°C. Le résidu comme l'extrait final a été dissous dans 4 mL de MeOH à 75% et conservé à 4 °C jusqu'à l'utilisation ultérieure. Avant l'analyse, l'extrait a été dilué au cinquième avec 75% de MeOH et filtré avec un microfiltre (0,2 µm) de CHROMAFIL® Xtra pet (Düren, Allemagne).

3. Partie expérimentale 2

Mise au point du dispositif

Le dispositif bioanalytique CLHP-IMER-SM était composé d'une partie de séparation chromatographique et d'une partie destinée à contrôler la réaction d'hydrolyse enzymatique (**Figure 15**). Un T mélangeur a été utilisé pour combiner l'éluat chromatographique avec la solution tampon contenant le substrat (ACh). Un système complexe de pompes chromatographiques permet de pousser l'ensemble de ces fluides et leur mélange au sein de l'IMER où l'AChE immobilisée catalyse la réaction d'hydrolyse de l'ACh en Cho et en acide acétique (Equation 1, Figure 15).

En absence d'inhibiteur dans l'éluat chromatographique et donc au sein de l'IMER et avec une concentration de substrat (ACh) déterminée injectée par la pompe de substrat, les signaux de masse produits tant par le produit de la réaction d'hydrolyse (Cho) que par le substrat (ACh) non hydrolysé (en excès) vont être constants (**Figure 16A**). Par contre, lorsqu'un inhibiteur de l'AChE est élué hors de la colonne de chromatographie (celui-ci peut être présent dans un extrait de plante par exemple), il sera entraîné par le système fluidique (chromatographie + flux de la pompe de substrat) jusqu'à l'IMER où il limitera la réaction d'hydrolyse. Par conséquent, La concentration du produit d'hydrolyse (Cho) sera réduite et celle du substrat non hydrolysé sera augmentée et cela exactement au temps de rétention de l'inhibiteur élué. Cela génèrera, au sein des signaux de masse produits par le détecteur en fonction du temps, des pics négatifs et positifs lors de l'enregistrement des traces correspondant au produit de la réaction d'hydrolyse (m/z 104 ; Cho) et au substrat (m/z 146 ; ACh) respectivement (**Figure 16B**).

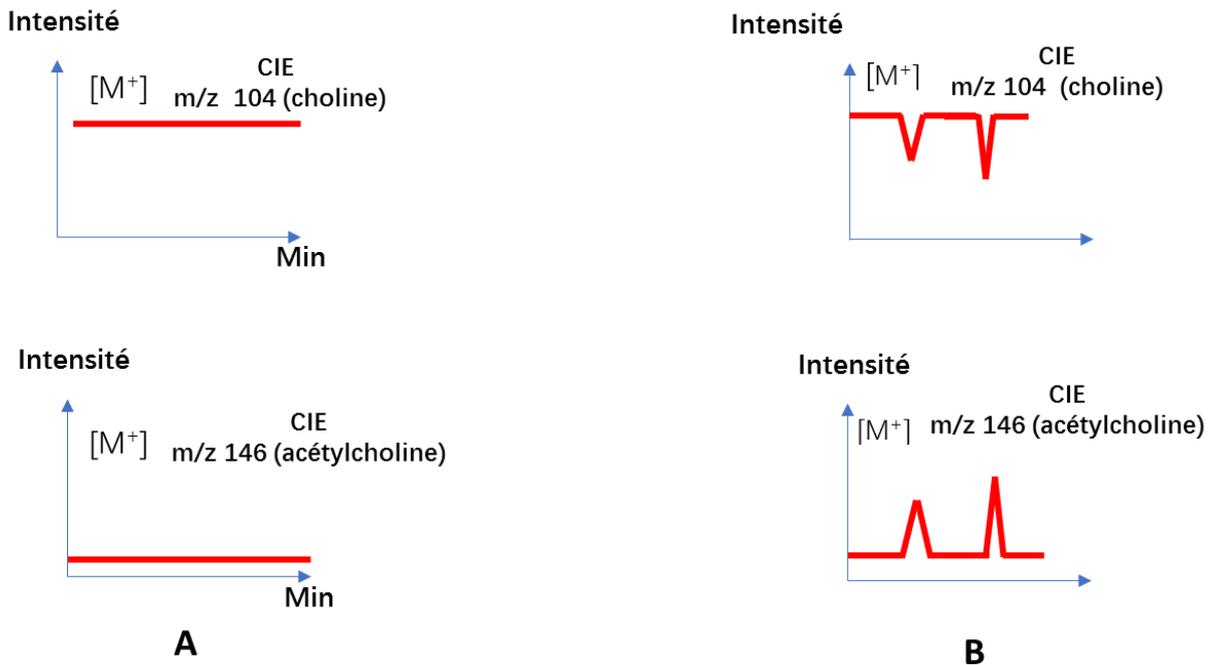


Figure 16 Chromatogrammes de masse théoriques d’ions extraits (CIE) :
A) quand il n’y pas d’inhibiteur de l’AChE présent dans l’éluat chromatographique ;
B) quand il y a des inhibiteurs présents dans l’éluat chromatographique.

Le point-clé de ce système repose sur le fait que l’IMER doit satisfaire à la fois aux conditions imposées par la séparation chromatographique (pH, force ionique, teneur en phase organique, température, ...), par la spectrométrie de masse (volatilité des phases mobiles, génération d’espèces chargées, ...) et par la réaction enzymatique (pH, force ionique, température, débit, phase organique,...). La réaction enzymatique devrait être réalisée dans un milieu de tampon sans phase organique et avec un pH approprié. Pour améliorer la forme des pics chromatographiques, on utilise souvent un pourcentage de phase organique important, très souvent acidifié. En outre, le tampon utilisé pour la réaction enzymatique devrait être volatil pour être compatible avec la détection par SM. La méthode d’immobilisation et le type de phase mise en œuvre lors de la fabrication de l’IMER peuvent aussi influencer les performances de ce couplage. Donc la mise au point des conditions d’utilisation d’un tel dispositif bioanalytique est très importante et doit faire l’objet d’une attention toute particulière.

3.1. Séparation des étalons d'inhibiteurs

3.1.1. Mode opératoire

Une série de trois inhibiteurs naturels bien connus dans la littérature scientifique ont été utilisés pour développer le concept du dispositif bioanalytique IMER. Il s'agissait de la galanthamine (GL), de l'huperzine A (HuA) et de la tacrine (TA). Les deux parties du dispositif (chromatographie et bioréacteur) doivent être optimisés. Il a été décidé de commencer par trouver une méthode de séparation chromatographique des trois inhibiteurs.

10 μl du mélange des inhibiteurs (GL, HuA et TA, 50 μM) ont été injectés dans la chaîne de chromatographie (CLHP-MS, **Figure 17**). Trois phases mobiles ont été étudiées et étaient constituées de trois concentrations (15%, 25% et 30% MeOH) de méthanol dans de l'eau, acidifiée par 0,01% acide formique et portée à une température de 60°C. Avec ces conditions, 3 différentes colonnes analytiques ont été testées :

1. Acquity UPLC BEH C18 (2,1x100 mm, 1,7 μm , 130 Å, Waters);
2. Acquity UPLC BEH shield RP₁₈ (2,1x100 mm, 1,7 μm , 130 Å, Waters)
3. Acquity UPLC BEH phenyl (2,1x100 mm, 1,7 μm , 130 Å, Waters).

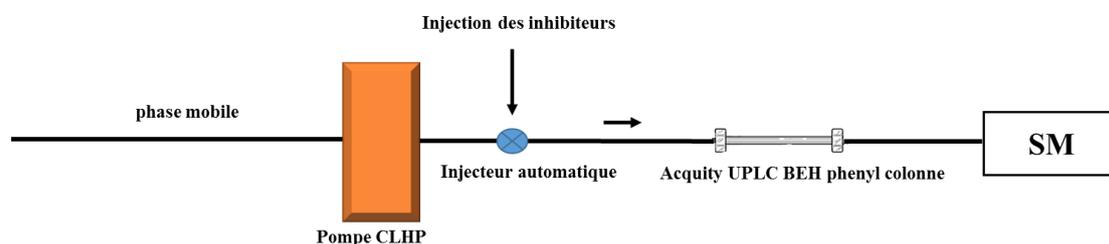


Figure 17 Présentation du dispositif de séparation chromatographique des étalons d'inhibiteurs de l'AcHE.

3.1.2. Résultats et discussion

Le but de cette optimisation de séparation des inhibiteurs est de trouver une méthode pouvant donner un temps d'analyse court, une bonne résolution ($R \geq 1,5$) et des pics fins pour être compatible avec la cinétique d'hydrolyse rapide réalisée dans l'IMER. Les résultats ont montré que la colonne Acquity UPLC BEH C18 (2,1x100

mm, 1,7 μm , 130 \AA , Waters) produisait un pic d'HuA qui traînait fortement et que la colonne Acquity UPLC BEH shield RP₁₈ (2,1x100 mm, 1,7 μm , 130 \AA , Waters) produisait un temps de rétention très bref qui faisait coéluer la GL avec le pic de solvant (temps mort). Par contre, l'utilisation de la colonne Acquity UPLC BEH phenyl (2,1x100 mm, 1,7 μm , 130 \AA , Waters) a permis d'obtenir des pics fins et bien résolus. D'après la **Figure 18** et le **Tableau 1**, quand cette colonne a été utilisée, c'est la phase mobile composée d'un mélange de MeOH/eau/Acide formique (25/75/0,01 ; v/v/v) qui a permis d'obtenir à la fois un temps d'analyse court et une résolution chromatographique satisfaisante ($R_s > 1,5$).

C'est donc le mélange de MeOH/eau/Acide formique (25/75/0,01 ; v/v/v) utilisé de façon isocratique avec la colonne Acquity UPLC BEH phenyl qui sera utilisé dans la suite des travaux car c'est cet arrangement qui a permis d'obtenir la meilleure séparation des 3 inhibiteurs.

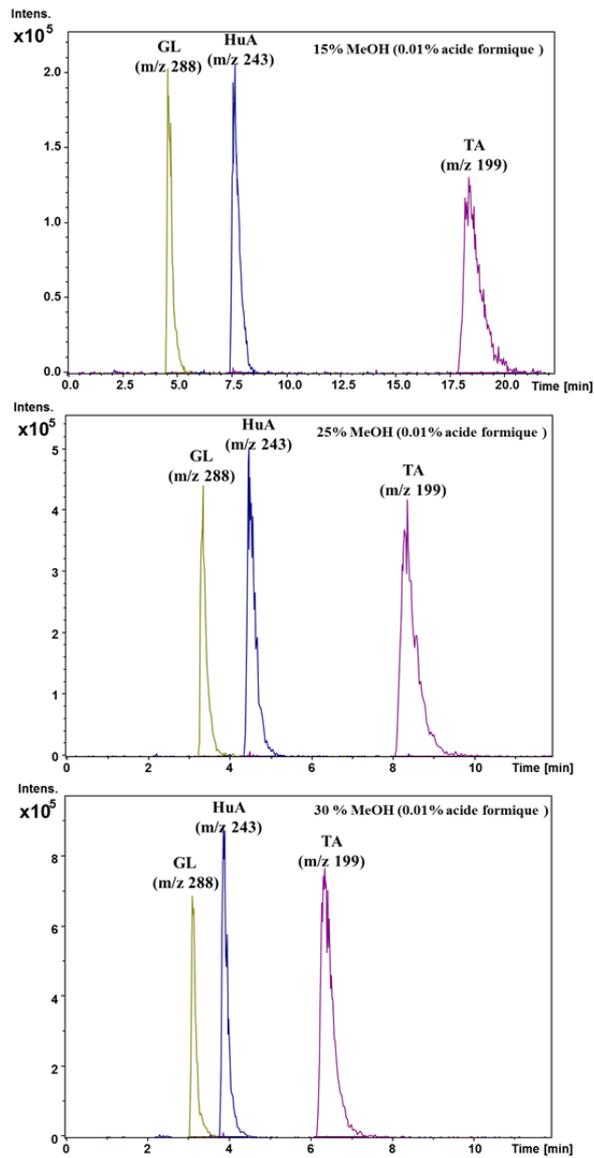


Figure 18 Chromatogrammes des ions extraits (CIE) des 3 inhibiteurs analysés en utilisant des phases mobiles isocratiques constituées de 15%, 25% and 30% MeOH (0,01% acide formique) respectivement.

	Temps de retention (min)	Largeur de pic (min)	Resolution
15% MeOH	$t_{R(GL)} = 4,5$ $t_{R(HuA)} = 7,6$ $t_{R(TA)} = 18,7$	$\omega_{GL} = 1,2$ $\omega_{HuA} = 1,3$ $\omega_{TA} = 3,2$	$R_{GL-HuA} = 2,5$ $R_{HuA-TA} = 4,8$
25% MeOH	$t_{R(GL)} = 3,3$ $t_{R(HuA)} = 4,5$ $t_{R(TA)} = 8,3$	$\omega_{GL} = 0,7$ $\omega_{HuA} = 0,9$ $\omega_{TA} = 1,7$	$R_{GL-HuA} = 1,5$ $R_{HuA-TA} = 2,9$
30% MeOH	$t_{R(GL)} = 3,0$ $t_{R(HuA)} = 3,8$ $t_{R(TA)} = 6,3$	$\omega_{GL} = 0,8$ $\omega_{HuA} = 0,8$ $\omega_{TA} = 1,3$	$R_{GL-HuA} < 1,5$ $R_{HuA-TA} = 2,3$

Tableau 1. Temps de rétention, largeur des pics et résolution en utilisant une phase mobile contenant respectivement 15%, 25% et de 30% de MeOH (0,01% acide formique).

La méthode isocratique est très simple à utiliser et comme la séparation a été satisfaisante tant d'un point de vue rapidité de l'analyse que du point de vue de la résolution, il n'a pas été jugé nécessaire de mettre au point une méthode de séparation utilisant un gradient car ce type de séparation nécessite de faire varier la concentration de la phase organique, ce qui pourrait être dommageable pour la réaction d'hydrolyse qui ne se réaliserait plus de façon constante du début à la fin du chromatogramme.

3.2. Influence des débits de CLHP et de pompe à substrat sur le pH

3.2.1. Mode opératoire

Le pH joue un rôle important dans toutes les réactions enzymatiques. D'après la littérature scientifique afférente, il semblerait que le pH le plus favorable pour faire fonctionner un IMER AChE serait d'environ 7,4 [4, 47]. Dans le dispositif bioanalytique CLHP-IMER-SM développé, la phase mobile qui circule au sein de l'IMER est une combinaison de l'éluat chromatographique et de la solution de tampon contenant le substrat (ACh). En faisant varier les débits de chacune de ces deux parties, il est envisageable d'obtenir différentes valeurs de pH au sein de l'IMER ce qui peut considérablement influencer la qualité (complétion, cinétique, sélectivité, etc.) de la réaction d'hydrolyse. Afin d'évaluer l'influence de chacun des débits tant chromatographique que d'apport du substrat sur le pH de la phase présente dans l'IMER, la mesure du pH de mélanges de différentes solutions a été faite. Concrètement, l'évaluation repose sur la fabrication hors ligne (en bécher), de mélanges de différents volumes de solution aqueuse d'acide formique et de solution de NH_4HCO_3 (15 mM, pH=7,9, tampon d'apport du substrat) (**Tableau 2**). Cette expérience a été répétée 3 fois afin de calculer l'incertitude associée.

Volume 0,01% AF	Volume NH_4HCO_3 (15 mM, pH 7,9)	Final pH
10 mL	10 mL	7,12 ± 0,005
10 mL	20 mL	7,52 ± 0,005
10 mL	30 mL	7,70 ± 0,005
10 mL	40 mL	7,77 ± 0,005

Tableau 2. Evaluation du pH de la phase mobile finale par mélanger de différents volumes de solution aqueuse d'acide formique et de solution de NH_4HCO_3 (15 mM, pH=7,9).

3.2.2. Résultats et discussion

D'après le **tableau 2**, lorsque 10 ml de solution aqueuse à 0,01% d'acide formique ont été mélangés avec 20 ml de NH_4HCO_3 (15 mM, pH = 7,9), le pH du mélange était de 7,5. Dès lors, si l'on considère que la présence de MeOH n'intervient pas dans la valeur du pH, il devient logique de penser que le mélange d'un débit de phase mobile de 0,1 mL/min avec un débit de 0,2 mL/min de tampon de substrat produira une phase finale qui circulera au sein de l'IMER avec un pH de l'ordre de 7,5.

Cette valeur a été considérée comme suffisamment proche de 7,4 [4] pour être acceptée comme conditions correctes d'analyse. Les auteurs [4] ont par ailleurs précisé qu'une variation du pH entre 7,4 et 7,5 n'avait aucune influence sur l'efficacité de hydrolyse de l'ACHÉ.

3.3. Fabrication de l'IMER

La littérature scientifique propose deux méthodes « in batch » ou « in situ », pour réaliser un IMER à partir d'une phase solide et d'un tube vide. Récemment, il a été proposé d'utiliser une phase solide en forme disque fin (*CIM-disk*[®]) afin de réduire la durée de contact de l'enzyme avec le substrat et ainsi de gagner tant sur le côté pratique de la réalisation de l'IMER que sur la sensibilité et la résolution du dispositif final [47]. Afin d'étudier l'influence des méthodes d'immobilisation sur les performances du dispositif bioanalytique CLHP-IMER-MS, il a été décidé de tester les trois solutions possibles, à savoir les deux formes en colonne (« in batch » et le « in situ ») avec une phase stationnaire placée dans un tube de chromatographie vide et le *CIM-disk*[®] réalisé selon la méthode « in batch ».

3.3.1. IMER en colonne réalisé selon la méthode dite « in batch »

3.3.1.1. Mode opératoire

3.3.1.1.1. Détermination de l'activité catalytique de l'IMER

La détermination de l'activité catalytique de l'IMER en colonne conçu selon la méthode dite « in batch », était réalisée selon deux étapes principales :

1. Injection d'une série de solutions d'ACh dans IMER et collection des fractions (0-3 min) chromatographiques contenant l'ACh et la Cho
2. Analyse de ces fractions par SM.

La première étape s'était faite grâce à l'injecteur automatique UltiMate 3000 HPLC (**Figure 19**) capable de collecter les éluats en sortie de colonne. L'IMER a été couplé entre la pompe et le collecteur. Une solution tampon de bicarbonate d'ammonium (10 mM, pH=7,4), utilisée comme phase mobile, a été circulée en continu à 0,3 mL/min à travers l'IMER. 10 µl d'une série de différentes concentrations de solutions aqueuses d'ACh (5 – 60 mM) ont été injectés dans l'IMER maintenu à 37 °C en utilisant le four CROCO-CILTM. L'injecteur a collecté les trois premières minutes de l'éluat de chaque injection.

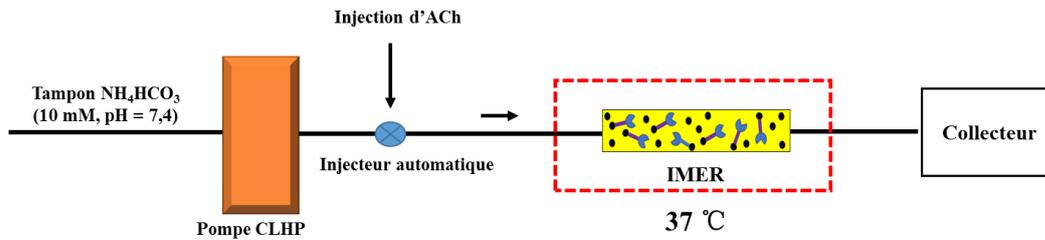


Figure 19 Dispositif utilisé pour collecter la fraction contenant les trois premières minutes de l'éluat chromatographique.

Les fractions collectées ont été analysées par un couplage CLHP-SM (**Figure 20**). Dans ce couplage, 10 µl de chaque fraction ont été injectés (n=3) dans une colonne de type Acclaim-Trinity-P1 parcourue par une phase mobile composée d'un mélange d'ACN/5mM NH₄OAc (60/40, v/v, pH=5,0) à un débit égal à 0,5 mL/min. La quantité de Choline formée dans l'IMER et retrouvé dans la fraction collectée a été calculée avec l'aide de la courbe d'étalonnage externe obtenue par injection une série de solutions d'étalons de Cho (0,01 – 0,8 mM).

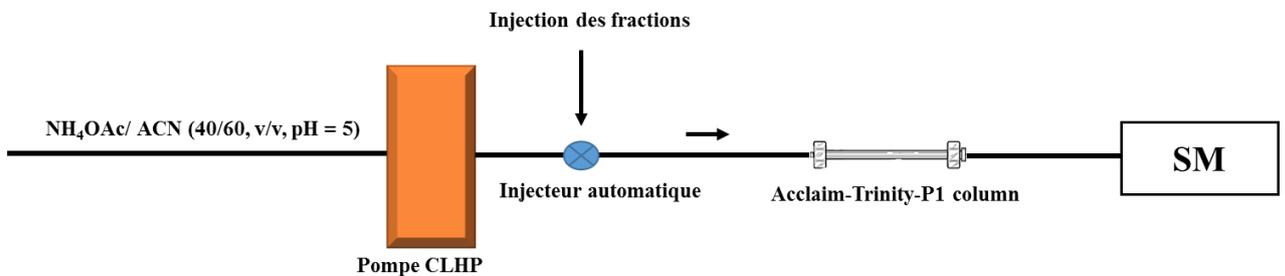


Figure 20 Couplage chromatographique CLHP-SM destiné à l'analyse des fractions collectées.

3.3.1.1.2. Utilisation de l'IMER en colonne conçu selon la méthode dite « in batch » dans le dispositif bioanalytique CLHP-IMER-SM.

L'IMER était testé dans le dispositif bioanalytique CLHP-IMER-SM par l'injection de trois étalons d'inhibiteurs de l'AChE (GL, HuA et TA). Les conditions d'analyse sont les suivantes:

- 1) Dans la partie de séparation chromatographique, la phase mobile était composée d'un mélange de MeOH/eau/acide formique (25/75/0,01, v/v/v) qui circulait à travers la colonne à un débit de 0,1 mL/min. La colonne analytique était de marque Waters et de type Acquity UPLC BEH Phenyl (2,1 x 100 mm, 1,7 µm, 130

Å, Waters). Sa température a été thermostatée à l'aide d'un four CROCO-CILTM (Cluzeau Info Labo, Sainte-Foy-La-Grande, France) dont la température était régulée à 60 °C.

2) Dans la partie concernant la réaction enzymatique, une solution de tampon NH_4HCO_3 (10 mM, pH =7,9) contenant 600 μM d'ACh était pompée en continu à travers l'IMER à 0,2 mL/min. La détection a été réalisée par SM. Le monitoring a été réalisé à l'aide des chromatogrammes d'ions extraits (CIEs) de l'ACh (m/z 146), de la Cho (m/z 146), de la GL (m/z 288), de l'HuA (m/z 243) et de la TA (m/z 199). 20 μl d'une série de solutions aqueuses (5 - 100 μM) d'un mélange équimolaire des inhibiteurs (GL, HuA et TA) ont été injectés dans le dispositif bioanalytique CLHP-IMER-SM.

3.3.1.1.3. L'influence de la quantité d'enzyme immobilisé et de la concentration de l'ACh sur la sensibilité du dispositif bioanalytique CLHP-IMER-SM

Un total de trois IMERs ont été réalisés en utilisant des mélanges en proportions différentes de phase greffée avec des enzymes immobilisées (PE) et de phase témoin, non greffée (PT) (10% PE, 50% PE et 100% PE). 20 μl d'une série de solutions (5 - 100 μM) de mélanges de GL et TA ont été injectées dans le dispositif bioanalytique CLHP-IMER-SM avec chacun des trois IMERs contenant 10%PE, 50%PE et 100%PE respectivement. Ces trois IMERs ont été traversés par le tampon de bicarbonate d'ammonium contenant différentes concentrations d'ACh (1 - 625 μM). Les autres conditions opératoires ont été identiques à celles qui ont été présentées dans le § 3.3.1.1.2..

3.3.1.2 Résultats et discussion

D'après la courbe de Michaelis – Menten, le K_m et V_{max} de l'IMER 100% PE en colonne réalisé selon la méthode dite « in batch » sont $7,1 \pm 0,4$ mM et $4,5 \pm 0,1$ $\mu\text{mol}/\text{min}$ respectivement (**Figure 21**). Les valeurs précédentes ont été calculées d'après les données expérimentales et les calculs ont été réalisés à l'aide du logiciel Grah Pad®.

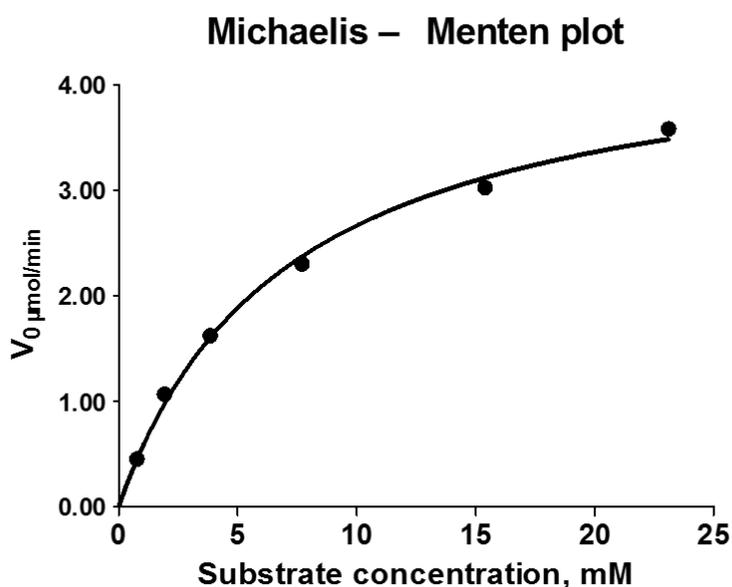


Figure 21 Courbe de Michaelis – Menten de l'IMER en colonne réalisé selon la méthode dite « in batch » (100% PE).

Quand le mélange des inhibiteurs était injecté dans le dispositif bioanalytique CLHP-IMER-MS, il apparaît clairement des pics positifs de l'ACh et des pics négatifs de la Cho qui correspondent aux inhibiteurs injectés (**Figure 22**).

Cependant, les pics d'ACh et de Cho étaient très larges et présentent des effets de *tailing* qui dégradent la résolution chromatographique des pics d'ACh ou de Cho. En effet les pics chromatographiques des inhibiteurs, avant leur passage dans l'IMER sont bien plus fins (voir § 3.1). Il était donc difficile de réaliser un criblage des inhibiteurs à haute résolution en utilisant cet IMER en colonne réalisé selon la méthode dite « in batch » dans ce dispositif bioanalytique CLHP-IMER-SM.

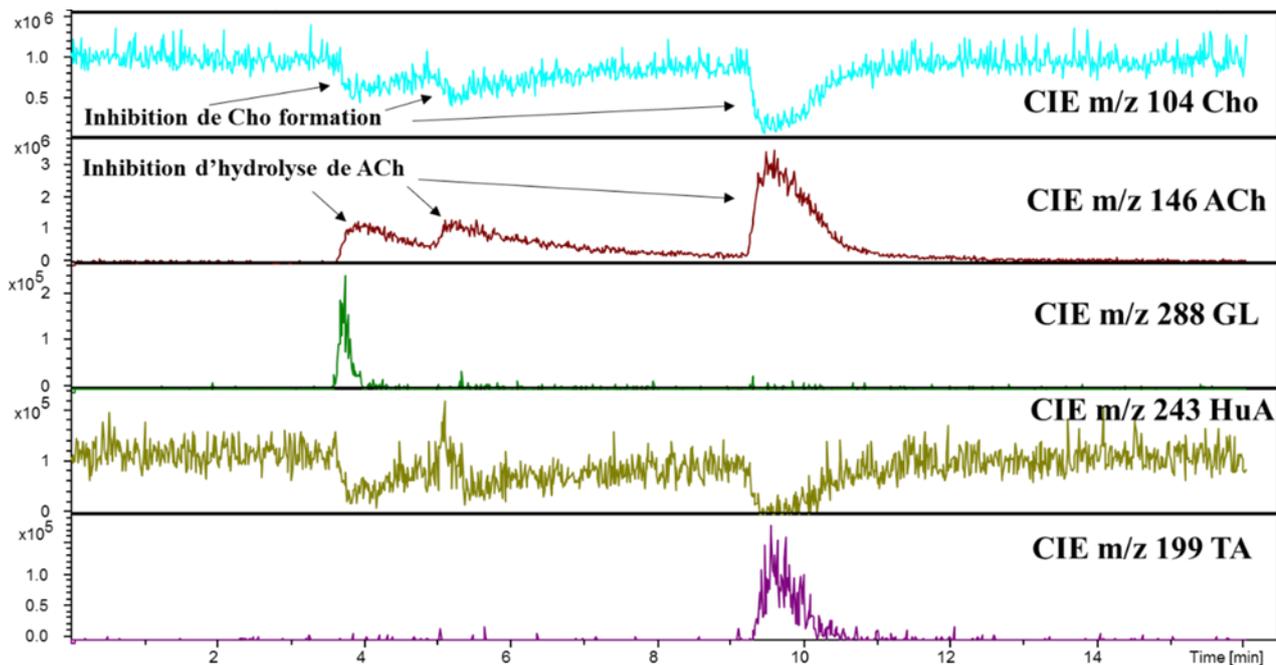


Figure 22 Chromatogrammes d'Ions Extraits (CIE) après avoir injecté 0,8 nmol des 3 inhibiteurs dans le dispositif bioanalytique CLHP-IMER-SM IMER AChE en colonne réalisé selon la méthode dite « in batch ».

Afin d'étudier l'influence de la quantité d'enzyme (AChE) et de la concentration du substrat (ACh) sur la sensibilité de ce dispositif bioanalytique CLHP-IMER-MS, 3 IMERs avec différentes quantités d'AChE immobilisée ont été testés. La relation qui lie la LoD des pics d'ACh avec la quantité d'inhibiteurs injectés a été étudiée.

Pour ce qui en est de l'IMER (10% PE), on remarque (**Tableau 3**) qu'en augmentant la concentration de l'ACh de 1 à 25 μM , la LoD des pics d'ACh diminue et la sensibilité de détection des inhibiteurs étudiés augmente. Donc dans cet intervalle de concentration, plus la concentration de l'ACh est importante, plus la sensibilité de détection des activités inhibitrices est élevée. Pour les concentrations étudiées plus élevées (de 125 à 625 μM), même si la concentration d'ACh continue à augmenter, la sensibilité stagne et diminue même, et cela très certainement à cause de l'augmentation du bruit de fond élevé, issu de l'hydrolyse insuffisante de l'ACh dont la quantité apportée augmente et dont la catalyse reste constante à cause de la quantité limitée d'AChE immobilisée. Ce phénomène est également observé pour les IMERs 50% PE et 100% PE pour lesquels la sensibilité augmente avec l'accroissement de la concentration du substrat (ACh) de 1 à 125 μM , puis stagne et diminue pour les

concentrations supérieures. D'après le Tableau 3, la meilleure sensibilité est obtenue pour les IMERS 50% PE avec 125 μM d'ACh ($\text{LoD}_{\text{GL}} = 0,1 \text{ nmol}$; $\text{LoD}_{\text{TA}} = 0,05 \text{ nmol}$).

ACh concentration	LoDs des IMERS	10% PE		50% PE		100% PE	
		LoD (GL)	LoD (TA)	LoD (GL)	LoD(TA)	LoD (GL)	LoD (TA)
1 μM		0,6 nmol	0,4 nmol	0,8 nmol	0,6 nmol	0,8 nmol	0,8 nmol
5 μM		0,3 nmol	0,2 nmol	0,4 nmol	0,4 nmol	0,4 nmol	0,4 nmol
25 μM		0,2 nmol	0,1 nmol	0,2 nmol	0,1 nmol	0,3 nmol	0,3 nmol
125 μM		0,3 nmol	0,2 nmol	0,1 nmol	0,05 nmol	0,3 nmol	0,2 nmol
625 μM		> 1,0 nmol	> 1,0nmol	0,8 nmol	0,3 nmol	>1,0 nmol	0,8 nmol

Tableau 3 Influence de la concentration de l'enzyme (AChE) et du substrat (ACh) sur la sensibilité du dispositif bioanalytique CLHP-IMER-MS.

3.3.2. IMER CIM-disk

Les disques monolithiques basés sur un nouveau matériau macroporeux polymérique sont aujourd’hui disponibles sous la marque CIM (média à interaction convective) et sont considérés comme une nouvelle génération de phases stationnaires pour IMER. Leur particularité est la conversion enzymatique rapide due au manque de résistance à la diffusion lors du transfert de masse. L’ensemble du dispositif CIM-disk consiste en deux parties : *CIM-disk* et *disk-housing* (**Figure 23**). Le *disk-housing* consiste généralement en un cylindre en matière plastique (Peek, polyétheretherketone), des frittés en Peek (porosité 5 µm) et des connecteurs CLHP à vis. Il fonctionne comme une colonne de chromatographie vide. Le EDA (Éthylènediamine) CIM-disk (diamètre 12,0 mm, épaisseur 3,0 mm, porosité 1,3 µm) est placé dans le *disk-housing-cylinder* et peut être retiré par un *disk-extractor*. Il fonctionne comme une phase stationnaire.

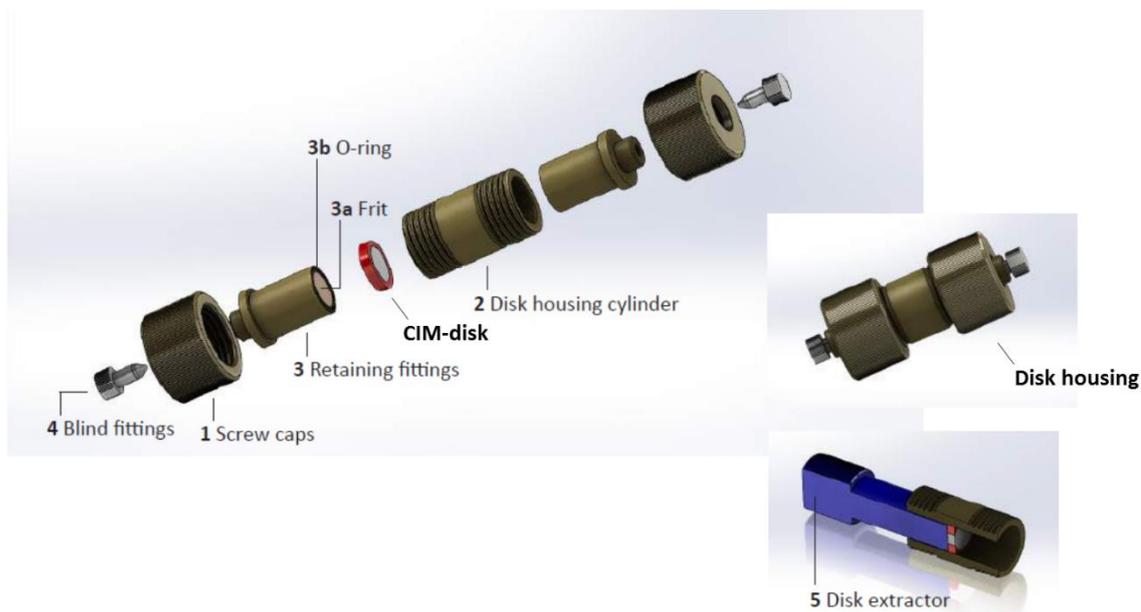


Figure 23 Assemblage du dispositif IMER CIM-disk

M. Bartolini et al. [47] ont montré que l’IMER AChE CIM-disk avait un temps de conditionnement plus court que celui d’un IMER AChE en colonne réalisé selon la méthode dite « in batch ». Les avantages de cette matrice très fines et rapide, devraient permettre de générer des chromatogrammes plus propres avec des pics

d'ACh plus fins, qui traînent moins que ceux produits par un IMER AChE en colonne réalisé selon la méthode dite « in batch ».

3.3.2.1. Mode Opérateur

3.3.2.1.1. Détermination de l'activité de l'IMER CIM-disk AChE

Pour déterminer l'activité de l'IMER CIM-disk AChE, 10 µl d'une série de solutions d'ACh (10 et 150 mM) ont été injectés dans l'IMER. Les étapes et les conditions analytiques ont été identiques que celles qui ont été décrites dans le § 3.3.1.1.1..

75

3.3.2.1.2. Utilisation du IMER CIM-disk AChE dans le dispositif bioanalytique CLHP-IMER-SM

L'IMER a été testé dans le dispositif bioanalytique CLHP-IMER-MS par injection de mélanges d'étalons inhibiteurs de l'AChE (GL, HuA et TA). Les étapes et les conditions analytiques ont été identiques que celles qui ont été décrites dans le § 3.3.1.1.2..

3.3.2.2. Résultats et discussion

D'après la courbe de Michaelis – Menten, le K_m et V_{max} de ce CIM-disk AChE IMER étaient respectivement de $3,87 \pm 0,57$ mM et $0,34 \pm 0,03$ µmol/min (**Figure 24**).

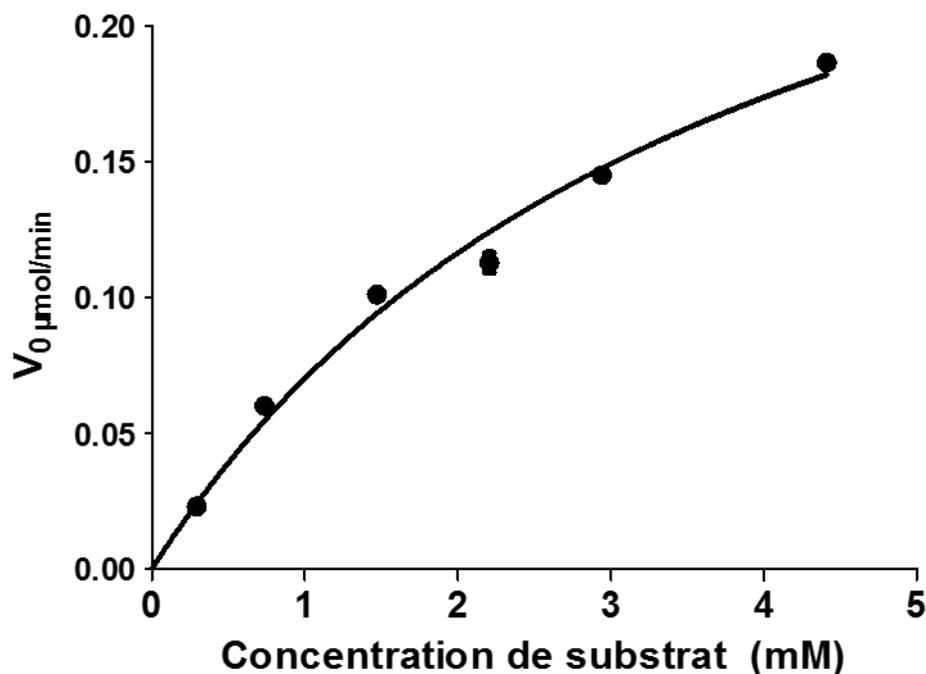


Figure 24 Courbe de Michaelis – Menten obtenue avec l'IMER CIM-disk.

Lors de l'injection d'un mélange équimolaire d'inhibiteurs dans le dispositif bioanalytique CLHP-IMER-MS utilisant l'IMER *CIM-disk*, il apparaît au sein du chromatogramme (**Figure 25**) des pics positifs provenant de l'ACh résiduelle et des pics négatifs provenant de la Cho qui se situent exactement aux temps de rétention des inhibiteurs correspondants. Les pics de l'ACh obtenus avec le *CIM-Disk* étaient moins larges que ceux qui ont été observés lors de l'utilisation de l'IMER en colonne conçu selon la méthode dite « in batch ». Cependant, le *CIM-disk* a généré des LoDs égales 0,5 nmol pour la TA et 0,8 nmol pour les GL et HuA. En termes de sensibilité, le *CIM-disk* était donc moins performant que l'IMER en colonne conçu selon la méthode dite « in batch ». Cette différence de sensibilité peut s'expliquer par un volume mort considérablement plus important dans le cas du CIM Disk (0,34 μL) par rapport à celui de la colonne « in batch » (0,026 μL , déterminé par l'injection d'isopropanol dans l'IMER et la mesure son temps de sortie). Ainsi, quand la même quantité d'inhibiteurs était éluée dans les deux IMERs, la concentration réelle de ceux-ci était près de 13 fois plus importante dans l'IMER en colonne conçu selon la méthode dite « in batch » que dans l'IMER de type CIM-disk.

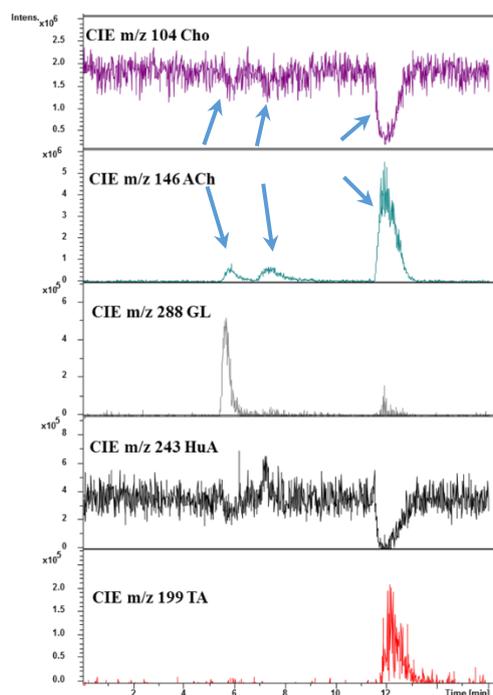


Figure 25 Chromatogramme d'Ions Extraits (CIE) après avoir injecté 0,8 nmol des 3 inhibiteurs dans le dispositif bioanalytique CLHP-IMER-SM quand l'IMER de type CIM-disk a été utilisé.

3.3.3. IMER en colonne conçu selon la méthode dite « in situ »

La méthode de fabrication dite « in situ » des IMERs est plus souvent utilisée que celle que nous avons décrite précédemment, dite « in batch ». En effet, lors du processus de conditionnement de la phase stationnaire dans la colonne vide (étapes de remplissage et de rinçages), il est souvent observé des pertes d'activité [49, 55] des enzymes immobilisées. Donc le mode de fabrication des IMERs en colonne conçus selon la méthode dite « in situ » peut donner de meilleures performances que le mode de fabrication dit « in batch » quand l'IMER est utilisé dans le dispositif bioanalytique CLHP-IMER-SM.

3.3.3.1. Mode opératoire

3.3.3.1.1. Détermination de l'activité de l'IMER en colonne conçu selon la méthode dite « in situ »

Pour déterminer l'activité de l'IMER en colonne conçu selon la méthode dite « in situ », 10ul d'une série de solutions d'ACh (5 – 60 mM) ont été injectés dans l'IMER. Les étapes et les conditions analytiques ont été identiques que celles de la partie

3.3.1.1.1.

3.3.3.1.2. Utilisation de l'IMER en colonne conçu selon la méthode dite « in situ » dans le dispositif bioanalytique CLHP-IMER-SM

L'IMER a été testé dans le dispositif bioanalytique CLHP-IMER-SM par injection de mélanges des étalons des inhibiteurs de l'AChE (GL, HuA et TA). Les étapes et les conditions analytiques ont été identiques que celles qui ont été présentées dans la partie 3.3.1.1.2..

3.3.3.2. Résultats et discussion

D'après la courbe de Michaelis – Menten, le K_m et V_{max} de l'IMER en colonne conçu selon la méthode dite « in situ » étaient $11,67 \pm 0,55$ mM et $6,76 \pm 0,15$ $\mu\text{mol}/\text{min}$ respectivement (**Figure 26**). Quand le mélange des inhibiteurs a été injecté dans le dispositif bioanalytique CLHP-IMER-MS en utilisant l'IMER en colonne conçu selon la méthode dite « in situ », il apparaît nettement des pics positifs d'ACh et des pics négatifs de Cho qui correspondent aux inhibiteurs injectés. La résolution des pics d'ACh était nettement meilleure que celle qui a été obtenue lors de l'utilisation de l'IMER en colonne conçu selon la méthode dite « in batch » (**Figure 27**). De plus, les LoDs des pics d'ACh étaient réduits à des valeurs de 0,3 nmol pour les GL et HuA ou de 0,1 nmol pour la TA. Cela montre que la meilleure sensibilité est obtenue quand l'IMER en colonne conçu selon la méthode dite « in situ » est utilisé dans ce dispositif bioanalytique CLHP-IMER-SM.

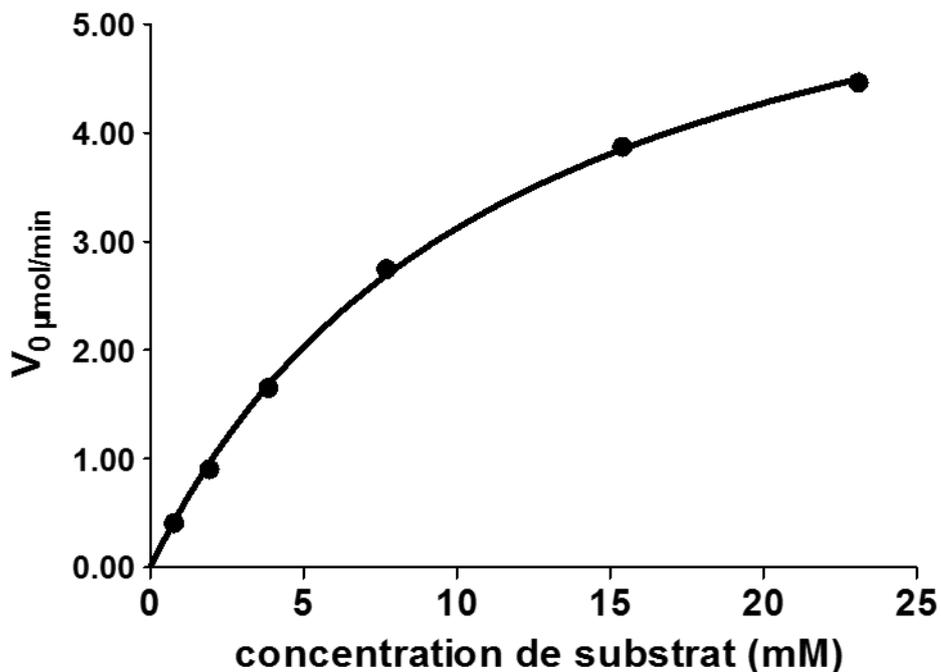


Figure 26 La courbe de Michaelis – Menten obtenue avec l'IMER en colonne conçu selon la méthode dite « in situ »

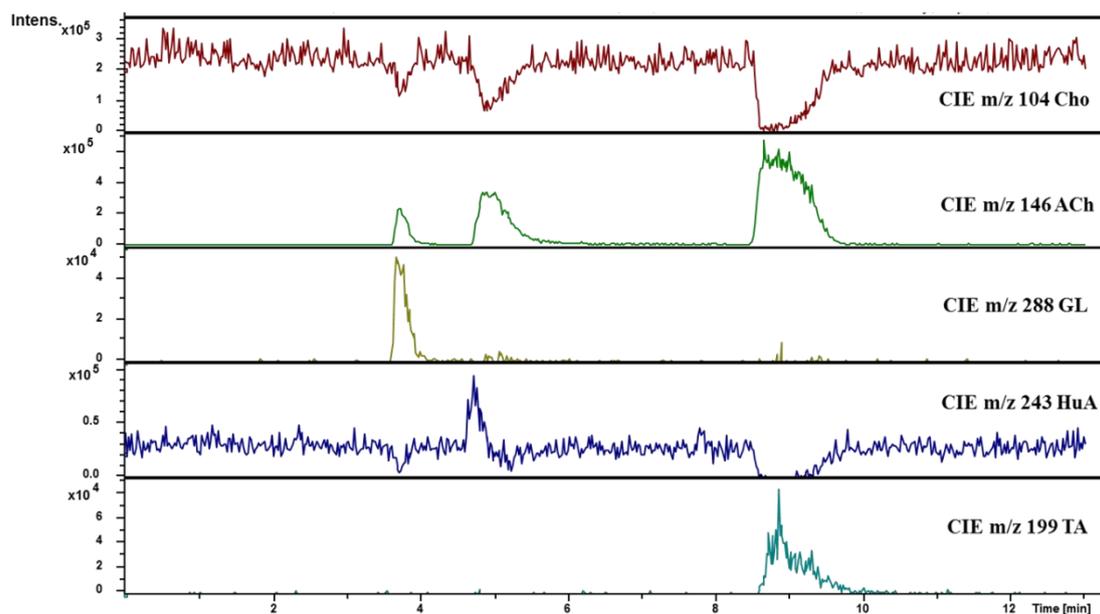


Figure 27 Chromatogrammes Ion Extraits (CIE) après avoir injecté 0,8 nmol des 3 inhibiteurs dans le dispositif bioanalytique CLHP-IMER-SM quand l'IMER en colonne conçu selon la méthode dite « in situ » est utilisé.

3.4. Concentration du Substrat (ACh)

3.4.1. Mode opératoire

Pour déterminer l'influence de la concentration en ACh sur la réponse de ce dispositif bioanalytique CLHP-IMER-SM, 20 μL d'un mélange équimolaire de différentes concentrations (5-100 μM) de galanthamine (GL), huperzine A (HuA) et tacrine (TA) ont été injectés, tandis que différentes concentrations (150 μM , 300 μM ou 600 μM) d'ACh étaient contenus dans le tampon NH_4HCO_3 . Les détails des conditions analytiques de ce dispositif bioanalytique CLHP-IMER-SM sont les suivantes :

1. Les étalons des inhibiteurs d'AChE (GL, HuA et TA) ont été séparés avec une colonne de type Acquity UPLC BEH Phenyl (2,1 x 100 mm, 1,7 μm , 130 Å, Waters) placée dans un four dont la température de consigne était de 60 °C. La phase mobile était un mélange de MeOH/eau/acide formique (25/75/0,01 v/v/v) et s'écoulait avec un débit de 0,1 mL/min.
2. La pompe d'apport de substrat fonctionnait en continu à un débit de 0,2 mL/min.
3. Le débit au sein de l'IMER était donc de 0,3 mL/min et formé par la réunion des deux flux (chromatographique : 0,1 mL/min et tampon contenant le substrat : 0,2 mL/min).
4. La détection par le spectromètre de masse a été réalisée sur les chromatogrammes d'ions extraits (CIEs) de l'ACh (m/z 146), de la Cho (m/z 146), de la GL (m/z 288), de l'HuA (m/z 243) et de la TA (m/z 199).

3.4.2. Résultats et discussion

La détection de l'activité inhibitrice est basée sur l'enregistrement de l'ion m/z 146, qui est le signal produit par l'ACh résiduelle, donc non hydrolysée, qui est rappelons-le, l'ion le plus facilement détecté par spectrométrie de masse.

L'IMER, tel que conçu, présente une capacité d'hydrolyse qui dépend de nombreux paramètres dus à la conception même de l'IMER (nombre de sites immobilisés, leurs expositions, orientations, accessibilités et activités, la longueur et le diamètre du dispositif, ...), mais aussi au mode d'utilisation qui en est fait (durée de contact entre

l'enzyme et le substrat, température et composition du milieu réactionnel se trouvant au sein de l'IMER au temps de rétention considéré, ...) et de la nature même de l'inhibiteur considéré (temps de rétention et donc teneur en phase organique du milieu réactionnel, encombrement chimique, pouvoir inhibiteur, ...).

Un signal d'ACh non hydrolysé ne devrait apparaître que lorsque la pompe de substrat injecte une concentration de substrat supérieure à la capacité de d'hydrolyse de l'IMER. Ce signal devrait être continu, puisque le substrat est injecté en permanence dans l'IMER. Par contre, il doit augmenter lors de l'élution d'un inhibiteur car ce dernier réduit la capacité d'hydrolyse de l'IMER. Cela se traduit par l'apparition d'un « pic » chromatographique qui se surimpose au fond continu du même signal. Elle sera d'autant plus importante que la concentration d'ACh injectée est élevée. Si la concentration injectée est très supérieure à la capacité d'hydrolyse de l'IMER, il apparaîtra un bruit de fond important d'ACh non hydrolysé qui diminuera la sensibilité de détection du dispositif bioanalytique CLHP-IMER-SM.

Si ce signal continu est nul, c'est que la concentration de substrat mis en circulation n'est pas suffisante pour saturer tous les sites d'hydrolyse de l'IMER. L'idéal serait bien entendu d'injecter une concentration d'ACh tout juste égale à la valeur de la capacité d'hydrolyse de l'IMER. La concentration d'ACh en sortie d'IMER serait alors égale à zéro et la moindre inhibition donnera lieu à un signal d'ACh. Cela est très difficile à obtenir car cette capacité évolue dans le temps et tend à diminuer avec l'utilisation du dispositif, son usure et sa contamination par les constituants des solutions analysées.

En fait, ce signal n'apparaît pas sur le chromatogramme, ni en début, ni à la fin des pics chromatographiques. Cela signifie déjà, dans une première approche, que le système n'injecte pas suffisamment de substrat pour saturer tous les sites d'hydrolyse de l'IMER.

Les résultats obtenus (**Tableau 4**) ont permis de mettre en évidence une claire augmentation de la sensibilité du dispositif avec la concentration en substrat (ACh). Quand la concentration d'ACh était augmentée de 150 μM à 600 μM , les LoDs des pics d'ACh observés, correspondant à l'activité des inhibiteurs, étaient réduites de

0,8 nmol à 0,3 nmol pour la GL et l'HuA, et de 0,6 nmol à 0,1 nmol pour la TA.

Concentration en ACh (μM)	LoD (nmol)		
	GL	HuA	TA
150	0,8	0,8	0,6
300	0,6	0,6	0,4
600	0,3	0,3	0,1

Tableau 4 Influence de la concentration de l'ACh sur la sensibilité du dispositif bioanalytique CLHP-IMER-SM.

Cette baisse de la LoQ, donc cette amélioration de la sensibilité de détection de la méthode liée à l'augmentation de la concentration de substrat injecté peut être expliquée par le fait qu'en augmentant la quantité de substrat dans la phase mobile, tout en restant en deçà de la limite de saturation de l'IMER, la capacité de libération de l'ACh (substrat) par un inhibiteur devient plus remarquable (plus on en met, plus le système peut en libérer).

Par contre, l'ACh et son hydrolysate, la Cho, sont des composés non volatils et donc peu compatibles avec l'utilisation d'un détecteur par spectrométrie de masse. Au laboratoire, il a été considéré que 600 μM d'ACh injectés de façon continue dans la source de l'Electrospray était un maximum à ne pas dépasser. Des valeurs supérieures à 600 μM ont en effet entraîné une importante contamination de la source accompagnée par un bouchage du capillaire. C'est la raison pour laquelle des concentrations d'ACh supérieures à 600 μM n'ont pas été étudiées pour éviter un bruit trop élevé dû à une surcharge du détecteur de masse et surtout une dégradation de la source due à des dépôts de matières non volatiles.

Si la capacité d'hydrolyse est égale à H moles d'ACh et que la quantité d'ACh pompée au travers de l'IMER est égale à P moles, l'IMER fonctionnera correctement si :

1. $P > H$ (figure 28A). L'IMER est saturé. Dans ce cas, on est face à un problème de bruit de fond important et donc d'une diminution de la sensibilité du dispositif et à un risque de pollution grave de la source du spectromètre.

2. $P < H$ (figure 28B). L'IMER n'est pas saturé. Dans ce cas, on limite le risque de contamination de la source du spectromètre. Par contre, comme la capacité d'hydrolyse est plus importante que l'apport de substrat, L'inhibiteur va devoir inhiber P-H avant que le dispositif bioanalytique puisse détecter un pic d'ACh non hydrolysé. On est donc face à une sensibilité affaiblie de par l'interdiction de dépasser la limite des 600 μmol d'ACh.
3. Si $P = H$ (figure 28C). C'est la situation idéale car la moindre inhibition pourra être détectée.

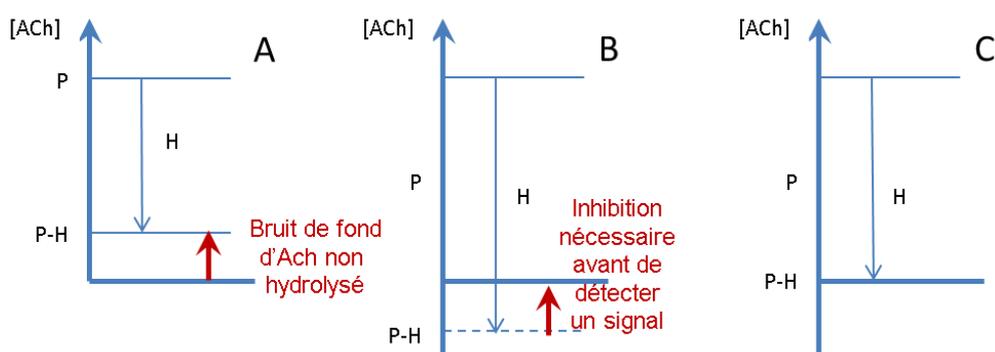


Figure 28 Relation entre la concentration du substrat (P), la capacité d'hydrolyse de l'IMER (H) et le pouvoir inhibiteur du composé élué.

Le dispositif se trouve donc dans la situation $P < H$. Pour augmenter la sensibilité du dispositif bioanalytique CLHP-IMER-SM, il conviendrait soit de diminuer la capacité d'hydrolyse de l'IMER (H) en y greffant moins de sites actifs par exemple, ou alors en augmentant la concentration de substrat (P) injectée.

3.5. Influence de la teneur en MeOH dans la phase mobile sur le fonctionnement de l'IMER

3.5.1. Mode opératoire

L'influence du pourcentage de MeOH présent dans la phase mobile chromatographique sur l'activité de l'IMER en colonne conçu selon la méthode dite « in situ » a été évaluée en reprenant le dispositif expérimental tel que décrit dans le § 3.3.1.1.1.. 10 μL d'une solution à 60 mM d'ACh ont été injectés ($n=3$) dans le dispositif bioanalytique (**Figure 19**) en utilisant comme phase mobile le tampon NH_4HCO_3 , contenant respectivement 0%, 15% et 25% de méthanol. Les fractions

collectées (0 – 3 min) par le collecteur après les injections d’ACh dans IMER ont été analysées par CLHP-SM. Les conditions analytiques étaient identiques à celles qui ont été présentées dans le § 3.3.1.1.1.. La quantité de Cho formée dans chaque fraction a été calculé avec l’aide de la courbe d’étalonnage externe obtenue par injection une série de solutions étalons de Cho de concentrations comprises entre 0,01 et 0,8 mM.

3.5.2. Résultats et discussion

L’influence de la présence de différentes concentrations de MeOH dans la phase mobile chromatographique sur la capacité d’hydrolyse de l’IMER a été évaluée par la mesure de l’activité résiduelle de IMER. Celle-ci peut être estimée par le ratio de la quantité de Cho formée avec différents pourcentages de MeOH sur la quantité de Cho formée avec 0 % MeOH (équation 5).

$$AR = \frac{[Cho]}{[Cho]_{(0\% MeOH)}} \times 100\% \text{ (Equation 5)}$$

Dans l’équation 5, AR est l’activité résiduelle d’IMER, [Cho] est la quantité de Cho formée dans chaque fraction collectée et $[Cho]_{(0\% MeOH)}$ est la quantité de Cho formée dans les fractions collectées avec 0% MeOH.

D’après la **Figure 29**, en augmentant le pourcentage de MeOH de 0% jusqu’à 25%, il est possible d’observer des différences significatives sur l’activité résiduelle de IMER ($F=19,889 > F_{0,05}=5,143$, $p=0,002$). De façon plutôt étonnante, la présence de 15% de MeOH dans la phase mobile semble augmenter de $16\pm 4\%$ l’activité hydrolytique de l’IMER. Par contre, une augmentation supplémentaire de cette teneur en MeOH réduit de 14% cette activité puisque seuls $86\pm 6\%$ de l’activité a pu être retrouvée dans l’IMER parcouru par une phase mobile contenant 25% de MeOH. Si on s’autorise une perte d’activité de 20% due au MeOH, il semble important de veiller à ne pas dépasser la concentration de 25% de MeOH dans l’IMER et donc de 75% de MeOH dans la phase mobile chromatographique.

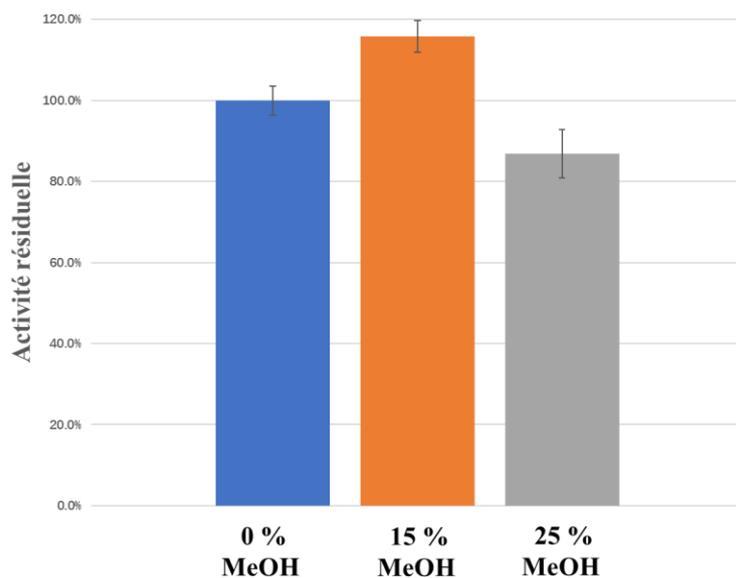


Figure 29 Influence du MeOH sur l'activité de l'IMER

3.6. Stabilité de l'IMER

3.6.1. Mode opératoire

10 µL de 60 mM d'ACh ont été injectés (n=3) dans l'IMER (**Figure 19**) pendant 91 jours et des fractions (0-3 min) ont été collectées et analysées par la chaîne chromatographique de CLHP-SM (**Figure 20**). La quantité de Cho formée dans chaque fraction a été calculée à l'aide de la courbe d'étalonnage externe obtenue par l'injection une série de solutions des étalons de Cho (0,01 – 0,8 mM). Les conditions analytiques ont été identiques que § 3.3.1.1.1..

3.6.2. Résultats et discussion

La courbe de l'activité enzymatique résiduelle a été tracée (**Figure 30**) en fonction du temps en utilisant l'équation suivante :

$$AR = \frac{[Cho]}{[Cho]_{(jour\ 0)}} \times 100\% \text{ (Équation 6)}$$

Dans l'équation 6, AR est l'activité résiduelle d'IMER, [Cho] est la quantité de Cho formée dans chaque fraction collectée et $[Cho]_{(jour\ 0)}$ est la quantité de Cho formée

dans les fractions collectées de la première jour que IMER a été utilisé.

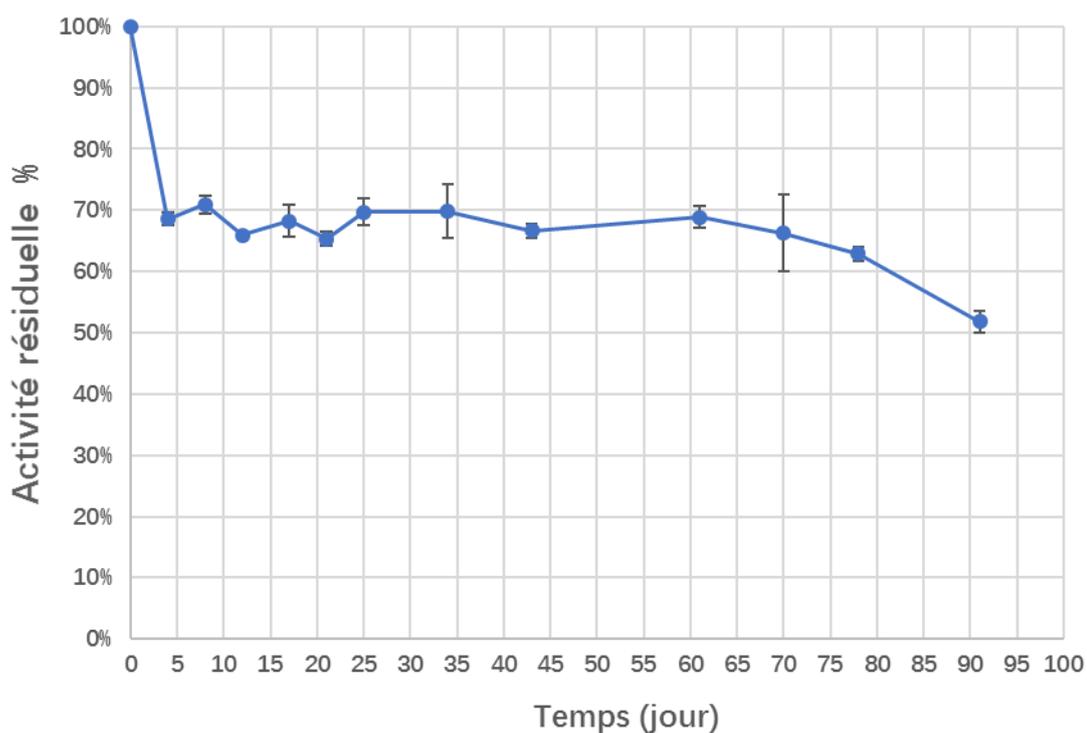


Figure 30 Activité enzymatique résiduelle de l'IMER en fonction du temps pendant 91 jours.

La courbe représentant l'activité enzymatique résiduelle en fonction du temps indique, pendant les premiers 4 jours, une diminution rapide de l'activité enzymatique jusqu'à atteindre 67% de l'activité initiale d'IMER. A partir du 4^{ème} jour, l'activité est restée relativement stable pendant plus de deux mois dans les conditions d'utilisation quotidienne. Après deux mois, l'activité enzymatique a lentement diminué jusqu'à atteindre environ 51% de son activité initiale. Ces résultats permettent de démontrer que l'IMER peut être utilisé pendant deux mois sans problème de stabilité de l'activité enzymatique, à condition toutes fois, de respecter une période de 4 jours de conditionnement, destinée à libérer les enzymes mal ou peu immobilisés sur la phase *Hypersil GOLD NH₂ chromatographic Silica*.

3.7. Conclusion

L'optimisation des conditions d'utilisation de fonctionnement de ce dispositif bioanalytique, a permis de déterminer que les conditions de fonctionnement optimal sont les suivantes :

1. Une phase mobile chromatographique constituée d'au plus 75% de MeOH avec 0,01% acide formique, s'écoulant avec un débit de 0,1 mL/min.
2. Un tampon constitué de NH_4CO_3 (10 mM, pH 7,9) contenant à maximum de 600 μM d'ACh et s'écoulant avec un débit de 0,2 mL/min
3. Un IMER en colonne conçu selon la méthode dite « in situ ».

Ces conditions analytiques ont été utilisées pour tester les 3 inhibiteurs de l'AChE connus (GL, HuA et TA). Ces conditions ont permis d'obtenir une sensibilité très satisfaisante ($\text{LoD}_{\text{HuA}} = 0,3 \text{ nmol}$; $\text{LoD}_{\text{GL}} = 0,3 \text{ nmol}$ et $\text{LoD}_{\text{TA}} = 0,1 \text{ nmol}$), de bonnes résolutions chromatographiques ($R_s > 1,5$), des pics d'ACh relativement fins et correspondant aux temps de rétention de chacun des inhibiteurs. Le principal résultat est que l'IMER développé semble supporter des concentrations de phases organiques (ici, du MeOH) pouvant s'élever jusqu'à 25%. Or, cette phase traversant l'IMER est constituée du mélange de la phase mobile et du flux de tampon de substrat, il apparait clair qu'en considérant les débits de chacun de ces deux flux (0,1 mL/min pour la phase chromatographique et 0,2 mL/min pour l'apport de substrat) que la séparation chromatographique pourra être réalisée avec des phases mobiles pouvant contenir jusqu'à 75% de MeOH. Enfin, l'activité de l'IMER se maintient de façon relativement stable pendant plus de deux mois, ce qui est favorable à l'utilisation de ce dispositif comme outil de screening à haute définition ou de *drug discovery* au moins pendant 60 jours.

4. Partie expérimentale 3

Utilisation du dispositif

4.1. Performances du dispositif bioanalytique CLHP-IMER-SM avec des étalons d'inhibiteurs de l'AChE.

Après avoir optimisé les conditions de ce dispositif bioanalytique CLHP-IMER-SM, les inhibiteurs d'AChE (GL, HuA et TA) ont été utilisés afin d'étudier la spécificité, la sensibilité, la relation dose-effet et la répétabilité de cette méthode bioanalytique innovante.

4.1.1. Spécificité

4.1.1.1. Mode opératoire

4.1.1.1.1. Remplacement de l'IMER par la colonne témoin

Avec les conditions analytiques dans § 3.3.3.1.2., 20 µL (n=3) d'une solution équimolaire (40 µM) des 3 inhibiteurs (GL, HuA et TA) ont été injectés dans ce dispositif bioanalytique CLHP-IMER-SM en remplaçant l'IMER par la colonne témoin. Les chromatogrammes d'ions extraits (CIE) ont été comparés avec ceux du § 3.3.3.2. (**Figure 27**) afin de vérifier s'il y a des interactions non-spécifiques entre la phase stationnaire utilisée pour fabriquer l'IMER et le substrat.

4.1.1.1.2. Injection de témoin négatif des inhibiteurs d'AChE

20 µL (n=3) de lycorine (100 µM), un alcaloïde sans activité inhibitrice de l'AChE, ont été injectés dans dispositif bioanalytique CLHP-IMER-SM, en utilisant l'IMER AChE en colonne conçu selon la méthode dite « in situ », avec les conditions analytiques dans § 3.3.3.1.2.. Les chromatogrammes d'Ions Extraits ont été comparés avec ceux du § 3.3.3.2. (**Figure 27**) afin de vérifier la spécificité des inhibiteurs d'AChE pour les pics d'ACh.

4.1.1.2. Résultats et discussion

Quand les inhibiteurs (GL, HuA et TA, 0,8 nmol) ont été injectés dans ce dispositif bioanalytique CLHP-IMER-SM équipé de la colonne témoin (**Figure 31**), l'intensité du signal d'ACh restait très élevée (environ $1,25 \times 10^7$), le signal de la Choline restait limité à un faible bruit de fond ce qui indique qu'aucune hydrolyse de l'ACh ne

s'opérait dans la colonne témoin et que, par conséquent, il n'y avait pas d'interaction non-spécifique entre l'ACh et le support « *NH₂ chromatographic Silica* » non greffé par l'AChE.

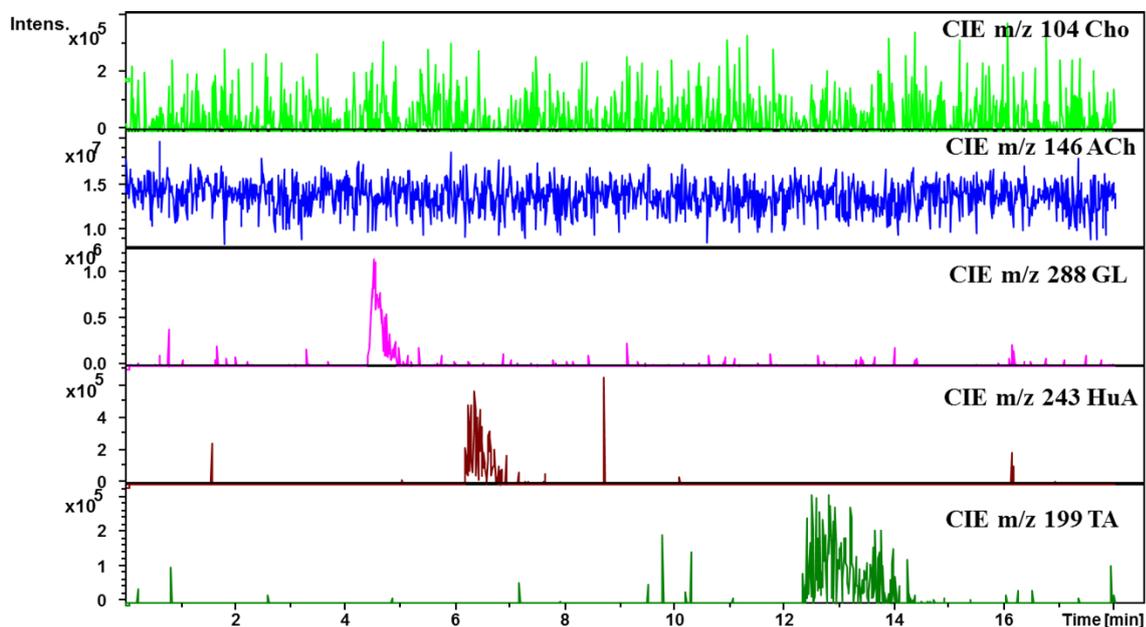


Figure 31 Chromatogramme d'Ions Extraits (CIE) après avoir injecté 0,8 nmol des inhibiteurs dans le dispositif bioanalytique CLHP-IMER-SM équipé de la colonne témoin.

Pour confirmer si seul un inhibiteur de l'AChE pouvait déclencher le pic d'ACh, 2 nmol de lycorine, une quantité plus importante de témoin négatif que les inhibiteurs (0,8 nmol), ont été injectés dans le dispositif bioanalytique CLHP-IMER-SM. Aucun pic d'ACh n'a été constaté (**Figure 32**), ce qui montre que ce dispositif bioanalytique présente une bonne spécificité pour les inhibiteurs de l'AChE.

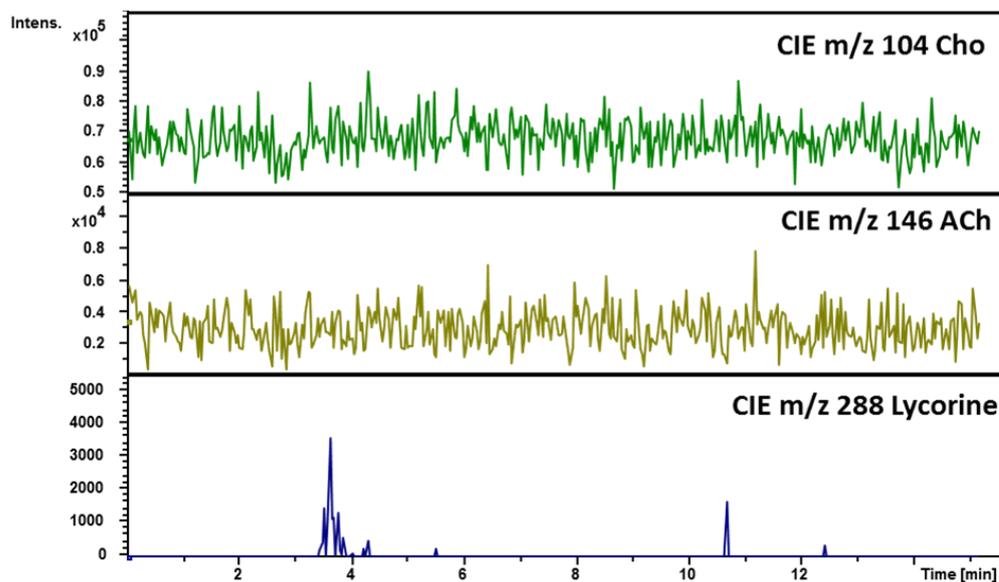


Figure 32 Chromatogramme d'Ions Extraits (CIE) après avoir injecté 2 nmol de lycorine dans ce dispositif bioanalytique CLHP-IMER-SM équipé de l'IMER en colonne conçu selon la méthode dite « in situ ».

4.1.2. Sensibilité et relation dose-effet

4.1.2.1. Mode opératoire

20 μ l d'une série de solutions (5 - 100 μ M) de mélanges équimolaires des trois inhibiteurs étudiés (GL, HuA et TA) ont été injectés dans ce dispositif bioanalytique CLHP-IMER-SM. Les conditions analytiques ont été identiques à celles qui ont été présentées dans § 3.3.1.1.2.. La sensibilité du dispositif bioanalytique CLHP-IMER-SM a été évaluée par l'établissement de la limite de détection (LoD) définie comme la quantité minimale d'inhibiteur d'AChE injectée qui permet de déclencher le pic d'ACh ayant le rapport signal sur bruit (S/N) supérieur à 3. La relation dose-effet a été étudiée en traçant l'aire de pic d'ACh en fonction de la quantité injectée de chaque inhibiteur.

4.1.2.2. Résultats et discussion

Les LoDs de GL et HuA étaient 0,3 nmol, celui de TA était 0,1 nmol, d'après la courbe de présentant la relation dose-effet (**Figure 33**). L'augmentation de la quantité des inhibiteurs injectés (jusqu'à 1,2 nmol pour les GL et HuA et 1,6 nmol pour la TA) conduit à une augmentation de l'aire des pics d'ACh. Au-delà de ces valeurs la

quantité d'ACh résiduelle (non hydrolysée) n'augmente plus (présence d'un plateau). Les trois inhibiteurs étudiés présentent des valeurs de surface maximales de pic d'ACh résiduel différentes. Les inhibiteurs plus forts (TA : 47 ua) ont présenté des valeurs plus élevées que les inhibiteurs plus faibles (HuA : 14 ua et GL : 10 ua).

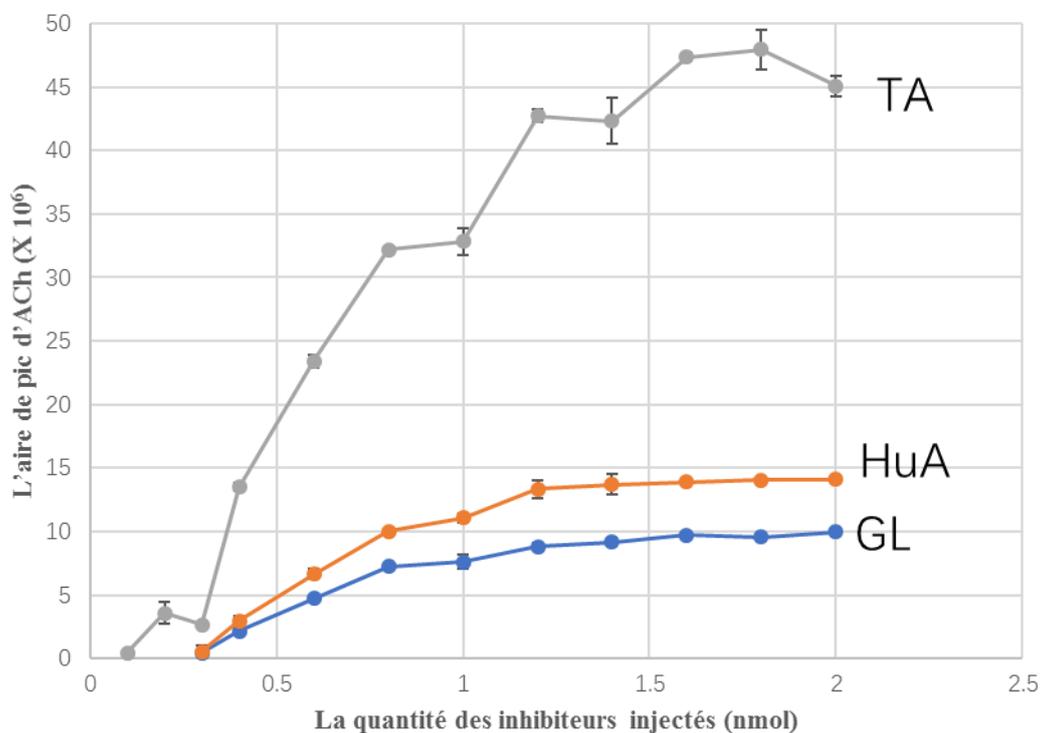


Figure 33 Courbe relation dose-effet.

4.1.3. Répétabilité

4.1.3.1. Mode opératoire

La répétabilité a été déterminée en injectant 20 μ L (n = 6) d'un mélange équimolaire (40 μ M) des trois inhibiteurs (GL, HuA et TA) dans une même journée et en calculant le coefficient de variation (RSD) de l'aire des pics d'ACh observés pour chacun des inhibiteurs étudiés.

4.1.3.2. Résultats et discussion

Les RSDs observés des aires des pics d'ACh sont égaux à 4,8%, 3,6% et 3,4% pour GL, HuA et TA respectivement, ce qui indique que ce dispositif bioanalytique CLHP-IMER-SM présente une répétabilité acceptable (intra-day) pour les 3 inhibiteurs.

4.2. Performance de ce dispositif bioanalytique CLHP-IMER-SM lors de l'analyse d'un extrait de *Lycoris Radiata*

Après avoir confirmé que ce dispositif bioanalytique CLHP-IMER-SM fonctionne de façon satisfaisante avec des étalons d'inhibiteurs de l'AChE, il a été utilisé pour analyser un échantillon réel afin de détecter une, ou plusieurs substances inhibitrices de l'AChE dans une matrice naturelle complexe. La plante choisie pour faire cette application a été *Lycoris Radiata* car d'après la littérature scientifique [78], cette plante est connue pour contenir de la GL. Elle appartient à la famille des *Amaryllidaceae* et est utilisée comme plante médicinale en Chine depuis des milliers d'années [79, 80]. Les principes actifs responsables de ses activités pharmacologiques sont les alcaloïdes d'*Amaryllidaceae* (AAs). D'après la littérature scientifique, en plus de GL, les AAs de l'extrait de *Lycoris Radiata* contiennent aussi de la lycoramine, un autre inhibiteur de l'AChE qui est connu pour avoir une activité inhibitrice plus faible que celle de la GL. Le dispositif bioanalytique CLHP-IMER-SM a donc été utilisé pour faire le criblage des inhibiteurs naturels présents dans l'extrait alcaloïdique de *Lycoris Radiata*. Les pics de l'ACh correspondant à la GL et à la lycoramine pourraient être recherchés.

4.2.1. Mode opératoire

4.2.1.1. Analyse de l'extrait par CLHP-SM²

Avant de l'injecter dans le dispositif bioanalytique CLHP-IMER-SM, l'extrait a été analysé par CLHP-SM selon le dispositif décrit dans § 3.1.1.. Il s'agissait de vérifier que les deux composés actifs, la GL et la lycoramine, ont été bien extraits de la plante. Pour la séparation des alcaloïdes, une méthode chromatographique à gradient a été utilisée avec, comme phase mobile A, un tampon acétate d'ammonium (5 mM, pH=6,3) et du MeOH comme la phase mobile B. La colonne analytique était une colonne de Waters ACQUITY UPLC BEH C18 (2,1 mm X 150 mm, taille des particules 1,7 µm, Saint-Quentin, France) et le gradient était comme suit : 0 min 20% B; 20 min 20% B; 21 min 50% B; 30 min 50% B; 31 min 75% B; 41 min 75% B; 42 min 20% B; 57 min 20% B. Les autres conditions étaient identiques à celles qui ont été présentées dans la partie 3.1.1.. Dans ces conditions, 20 µL d'une série de solutions du mélange

de GL et lycoramine (25 - 125 μM) et 20 μL de la solution de l'extrait alcaloïdique de *Lycoris Radiata* (1,78 mg/mL) ont été injectés. L'extrait a été détecté avec le *scan mode* et le mode MRM respectivement. Pour le mode MRM, les ions précurseurs m/z = 276, 288, 290 ont été sélectionnés pour être fragmentés par une amplitude de collision de 1 V.

4.2.1.2. Injection de l'extrait de *Lycoris Radiata* dans le dispositif bioanalytique CLHP-IMER-SM

20 μL de la solution de l'extrait (3,56 mg/mL) ont été injectés dans le dispositif bioanalytique CLHP-IMER-SM. La méthode de séparation chromatographique était identique à celle qui a été décrite dans le § 4.2.1.1. et les conditions de fonctionnement de l'IMER ont été identiques à celle qui ont été décrites dans le § 3.3.3.1.2., à part la valeur du pH du tampon qui a été ajustée à 7,5 au lieu de 7,9.

4.2.1.3. Influence du changement de phase mobile sur la sensibilité du dispositif bioanalytique CLHP-IMER-SM

Pour évaluer l'influence du changement de phase mobile (utilisation d'un gradient en remplacement d'une méthode isocratique), sur la sensibilité de détection par spectrométrie de masse, 20 μL d'une série de solutions de GL (5 – 100 μM) ont été injectés dans le dispositif bioanalytique CLHP-IMER-SM avec les conditions analytiques présentées dans les § 4.2.1.2..

4.2.2. Résultats et discussion

35,7 mg d'AAs ont été obtenus après avoir réalisé l'extraction avec 5 g de bulbes fraîches de *Lycoris Radiata*. Le rendement d'extraction était donc de 0,71%. Comme cela était très prévisible, la solution d'extrait alcaloïdique de *Lycoris Radiata* était beaucoup plus complexe que celle du mélange d'étalons de GL, HuA et TA qui ne présentait que 3 pics à séparer. La méthode de séparation isocratique utilisée pour les 3 étalons d'inhibiteurs ne convenait plus pour l'analyse de l'extrait de plante.

C'est pour cela, qu'une méthode de séparation avec gradient a été développée. La résolution requise a nécessité le changement des phases mobiles et stationnaires. La meilleure séparation a été obtenue en utilisant une colonne Waters ACQUITY UPLC BEH C18 (2,1 mm X 150 mm, taille des particules 1,7 μm , Saint-Quentin, France) et une phase mobile constituée de deux solvants A (tampon acétate d'ammonium) et B (MeOH) qui s'écoulaient dans la colonne chromatographique en gradient. D'après les chromatogrammes d'ions extraits (**Figure 34**), l'extrait de *Lycoris Radiata* contient plusieurs alcaloïdes différents, dont la GL et la lycoramine. Par contre, il est rapidement apparu qu'un autre alcaloïde naturel, la lycorine, coéluait avec la lycoramine ce qui n'est fort heureusement pas trop dérangeant puisque cet alcaloïde est sans activité inhibitrice et a même été utilisé comme témoin négatif dans le § **4.1.1**. pour prouver la spécificité du dispositif bioanalytique. Les natures chimiques des 3 alcaloïdes naturels (GL, lycorine et lycoramine) ont été confirmées par comparaisons des temps de rétention (t_R) des molécules retrouvées dans les extraits avec ceux des étalons chimiques achetés dans le commerce et des spectres de « MS/MS » par rapport aux spectres disponibles dans la littérature scientifique (**Figure 35**). Après avoir établi les courbes d'étalonnage de lycoramine ($y = 2.10^7x + 3.10^8$, $R^2 = 0,9984$) et de GL ($y = 2.10^7x + 2.10^8$, $R^2 = 0,9963$) dans la matrice *Lycoris Radiata*, les concentrations des inhibiteurs GL et lycoramine ont pu être évaluées à 37,6 $\mu\text{mol/g}$ et 64,0 $\mu\text{mol/g}$ d'extrait de *Lycoris Radiata* respectivement (77,0 $\mu\text{g/g}$ et 132,1 $\mu\text{g/g}$ de bulbe fraîches pour GL et lycoramine respectivement).

La présence d'autres composés présentant des m/z de 318, 272, 360 et 330 témoignent de la présence d'autres alcaloïdes qui n'ont pas été identifiés dans ce travail car ne présentant aucune activité inhibitrice de l'ACHé

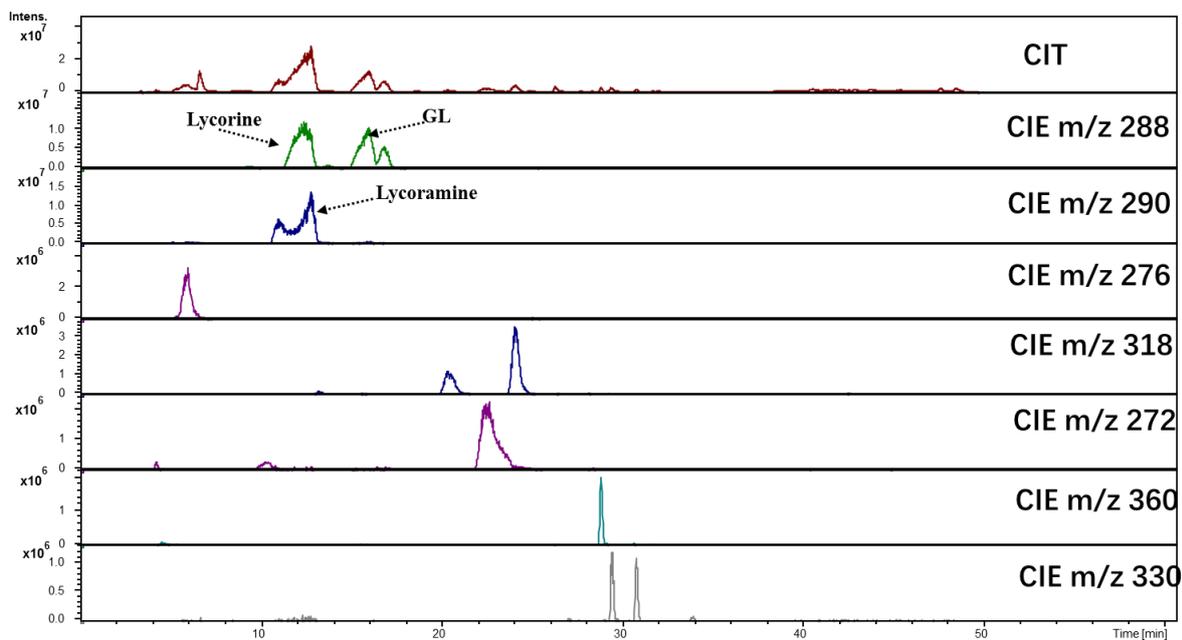


Figure 34 Chromatogrammes d'Ion Total (CIT) et d'Ions Extraits (CIE) de la fraction alcaloïdique de *Lycoris Radiata*.

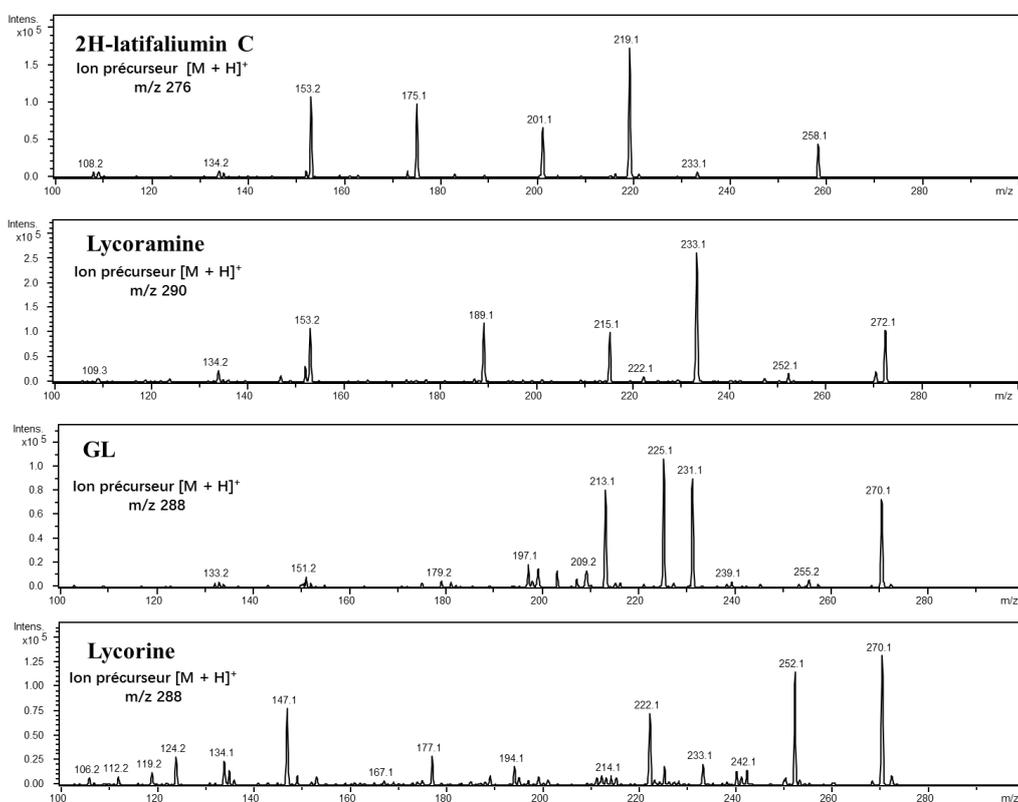


Figure 35 Spectres « MS/MS » des 2H-latifaliumin C, lycoramine, GL et lycorine retrouvés dans les extraits de *Lycoris Radiata*.

Toute modification de la nature des phases mobiles utilisées pour la séparation chromatographique est à même d'altérer sérieusement le bon fonctionnement de l'étape d'hydrolyse qui se déroule au sein de l'IMER. C'est pourquoi il a été nécessaire de vérifier le bon fonctionnement de l'IMER avec la nouvelle procédure de séparation utilisant un gradient de phase organique et un autre pH.

Le passage d'un pH 7,9 du tampon bicarbonate contenant l'ACh (méthode utilisée pour les étalons) à un pH 7,5 (méthode utilisée pour l'extrait alcaloïdique de *Lycoris Radiata*) a permis d'amener le pH au sein de l'IMER à une valeur de 7,5, valeur considérée selon la littérature afférente, comme optimale pour le fonctionnement de l'AChE immobilisée. Après l'injection de l'extrait dans le dispositif bioanalytique CLHP-IMER-SM, 3 pics d'ACh correspondant aux 3 alcaloïdes ont été observés

(Figure 36).

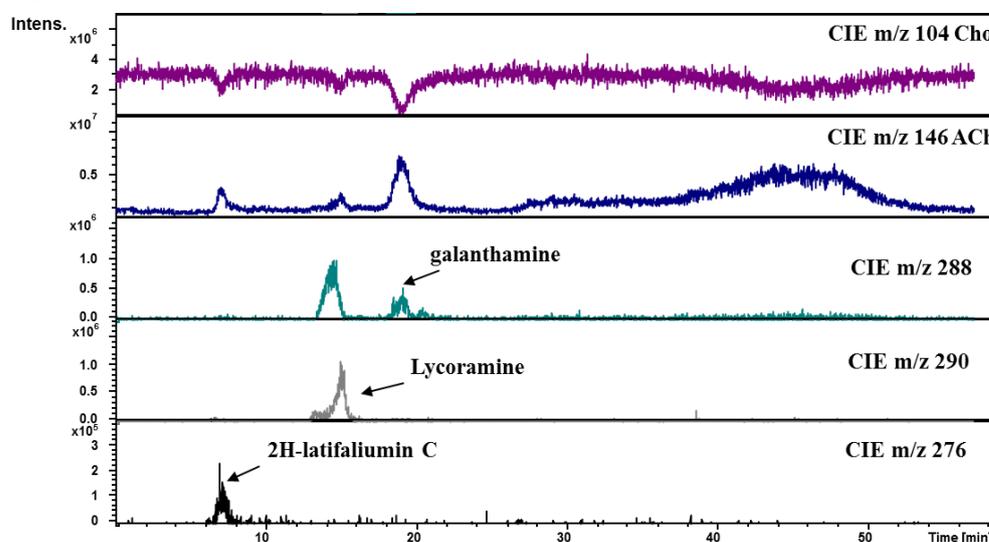


Figure 36 Les Chromatogrammes d'Ion Extraits (CIE) après avoir injecté l'extrait de *Lycoris Radiata* dans CLHP-IMER-SM dispositif bioanalytique.

La GL ($t_R = 19$ min) bien que présente à hauteur de $37,6 \mu\text{mol/g}$ d'extrait de *Lycoris Radiata*, soit presque la moitié de celle de la lycoramine ($64,0 \mu\text{mol/g}$ d'extrait de *Lycoris Radiata*; $t_R = 15$ min), a présenté un pic d'ACh plus grand que celui de la lycoramine, cela indiquait que l'activité inhibitrice de la GL est bien plus importante que celle de la lycoramine. Ce résultat sur les activités inhibitrices des GL et lycoramine étaient en bon accord avec ceux présents dans la littérature scientifique disponible [81]. En plus des deux inhibiteurs connus, un autre alcaloïde présentant

une activité inhibitrice de l'AChE a été détecté au début du chromatogramme ($t_R = 8,5$ min) et présentait un pic d'ACh significatif. Le spectre de masse tandem de cet alcaloïde (**Figure 35**) a permis de déterminer sa nature : le 2H-latifaliumin C qui a déjà été identifié par d'autres auteurs [78] dans cette plante mais sans jamais mentionner son activité inhibitrice de l'AChE. C'est grâce au dispositif bioanalytique CLHP-IMER-SM présenté dans ce rapport de thèse qu'il a été possible, pour la première fois, de rapporter cette activité inhibitrice du 2H-latifaliumin C. Par contre, une identification formelle de cette molécule n'a pas été possible car celle-ci n'a pas d'étalon chimique disponible dans le commerce. Il n'a donc pas été possible de comparer ses caractéristiques chromatographiques (spectres, t_R , etc.) à celle d'un standard chimique.

Le changement de phase mobile (composition et gradient) sur la sensibilité de détection du dispositif bioanalytique CLHP-IMER-SM a été aussi évalué en comparant les LoDs de la GL dans les deux conditions analytiques. Les nouvelles conditions chromatographiques imposées pour la séparation de l'extrait alcaloïdique de *Lycoris Radiata* ont eu comme conséquence une augmentation de la LoD de la GL de 0,3 nmol à 0,6 nmol. Cette augmentation de LoD était très certainement due à l'augmentation de la ligne de base de l'ACh, conséquence de l'augmentation de la concentration de MeOH dans le milieu réactionnel et donc de la baisse de l'activité catalytique de l'IMER.

Les résultats ont montré que malgré une perte de sensibilité (doublement de la LoD de la GL), le dispositif bioanalytique CLHP-IMER-SM peut être appliqué au criblage des inhibiteurs naturels de l'AChE dans des extraits de substances naturelles. Cependant il y a aussi des inconvénients qui ne peuvent pas être négligés. Dans la **Figure 36**, on remarque aisément que la ligne de base de l'ACh a augmenté après les 25 premières minutes d'analyse et cela à cause de l'augmentation de la concentration de MeOH dans le gradient. Cette augmentation de ligne de base réduit considérablement la sensibilité du dispositif et limite son application dans le cas des inhibiteurs de faible activité ou présents en faibles concentrations dans les extraits.

4.3. Ajout d'une pompe de contre-gradient

Afin de compenser l'augmentation de la ligne de base d'ACH issue du gradient, une pompe supplémentaire a été ajoutée dans la partie concernant la séparation chromatographique (Figure 37). En fait, l'ajout de cette pompe était destiné à compenser le gradient de MeOH qui augmente en fonction du temps dans la phase mobile et donc dans l'IMER également. La concentration en phase organique n'y est donc plus constante. La conséquence première est que la réaction d'hydrolyse de l'ACH suit l'évolution de la concentration en MeOH et donc change avec le temps. La pompe de contre-gradient est destinée à injecter à la sortie de la colonne de chromatographie, une concentration décroissante de MeOH afin de compenser l'augmentation de ce solvant imposée par les pompes chromatographiques. La concentration en MeOH reste donc constante au cours du temps dans l'IMER, tout en augmentant dans la colonne de séparation.

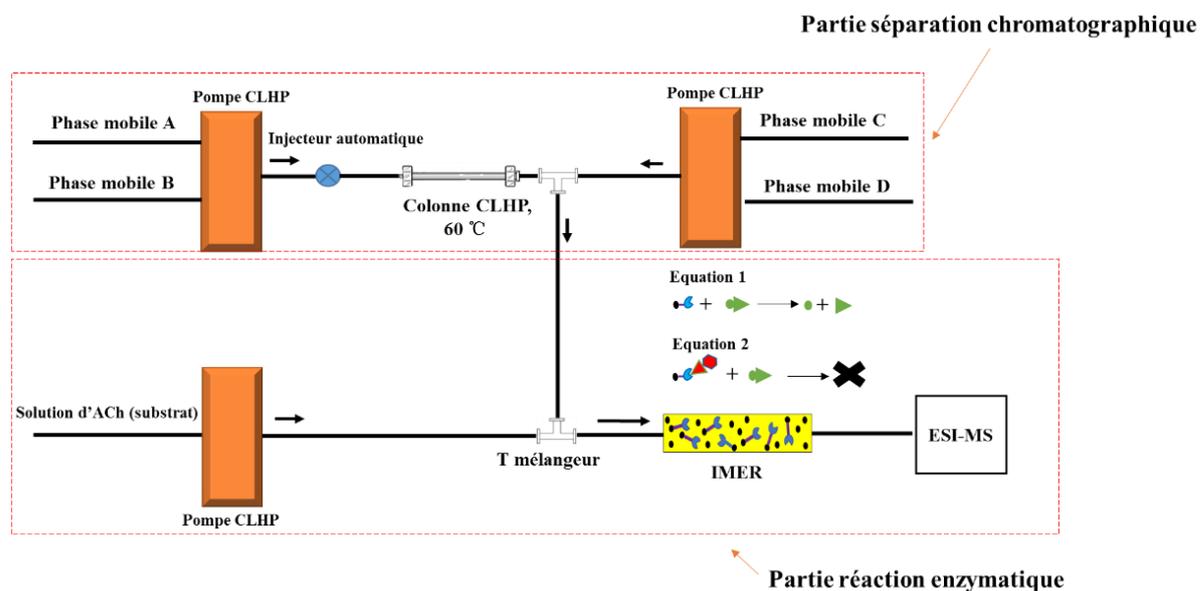


Figure 37 Ajout d'une pompe de contre-gradient dans le dispositif bioanalytique CLHP-IMER-SM

4.3.1. Mode opératoire

20 µL d'une série de solutions de GL (5 – 100 µM) et 20 µL de la solution de l'extrait (3,56 mg/mL) ont été injectées dans le dispositif bioanalytique CLHP-IMER-SM tel

que présenté dans la **Figure 37**. Comme décrit dans § 4.2.1.2. et § 4.2.1.3., le tampon acétate d’ammonium (5mM, pH=7,5 ; phase mobile A) et le MeOH (phase mobile B) étaient pompés avec un débit de 0,1 mL/min en utilisant un programme de gradient suivant : 0 min 20% B; 20 min 20% B; 21 min 50% B; 30 min 50% B; 31 min 75% B; 41 min 75% B; 42 min 20% B; 57 min 20% B. L’eau MilliQ (phase mobile C) et le MeOH (phase mobile D) étaient pompés avec un débit de 0,1 mL/min par la pompe de contre-gradient. Le programme de contre-gradient était le suivant : 0 min 55% B ; 23 min 55% B ; 24 min 25% B ; 33 min 25% B ; 34 min 0% B ; 44 min 0% B ; 45 min 55% B ; 60 min 55% B (**Figure 38**).

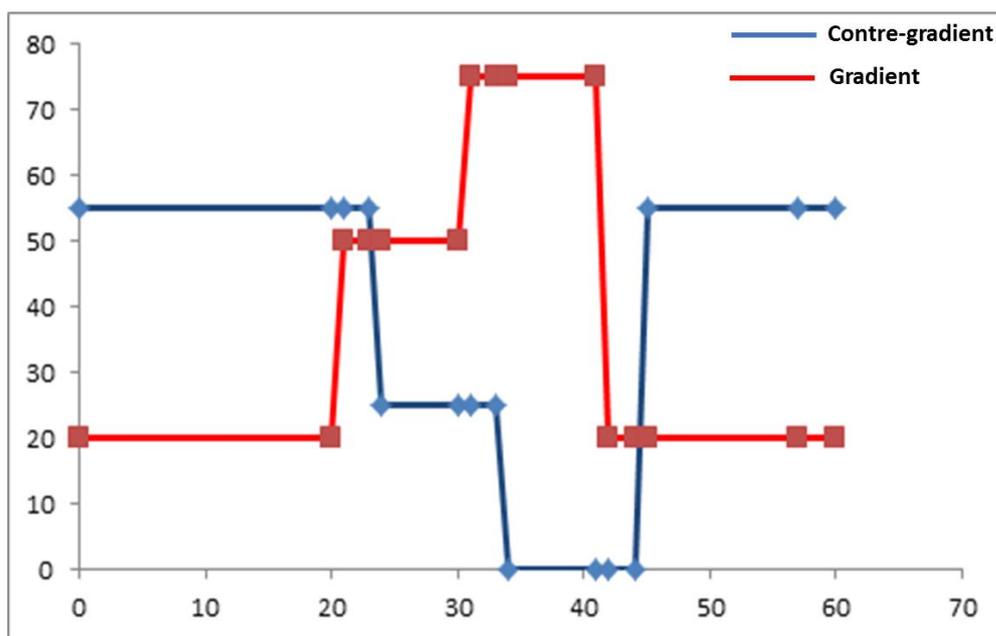


Figure 38 Profil des gradient et contre-gradient.

Le tampon NH_4HCO_3 (15 mM, pH = 7,4) contenant 1 200 μM d’ACh était pompé en continu à 0,1 mL/min par la pompe de substrat dans la partie de réaction enzymatique. Les autres conditions analytiques sont identiques à celles qui ont été présentées dans § 4.2.1.2..

4.3.2. Résultats et discussion

Il y a de 3 min de délai entre la pompe de gradient et la pompe de contre-gradient à cause du volume mort issue de la colonne CLHP et des connecteurs. La même

quantité d'extrait alcaloïdique de *Lycoris Radiata* a été injectée dans le dispositif bioanalytique CLHP-IMER-SM afin comparer ses performances avant et après ajout de la pompe de contre-gradient. Les CIEs présentés dans la **Figure 39** montraient une baisse de la sensibilité de détection. En effet, quand l'extrait a été injecté dans le dispositif équipé de la pompe de contre-gradient, seul le pic d'ACh correspondant à la GL a pu être détecté. Un très faible signal ($S/N < 3$) d'ACh correspondant à la 2H-latifaliumin C a pu être observé mais pas détecté. Le pic d'ACh correspondant à la lycoramine n'a pas été détecté. La LoD de la GL a augmenté jusqu'à 2 nmol (0,6 nmol sans pompe de contre-gradient). La perte de sensibilité observée après l'ajout de la pompe de contre-gradient était due à l'augmentation l'intensité de la ligne de base de l'ACh. En effet, lors du fonctionnement sans pompe de contre-gradient, ce dispositif bioanalytique CLHP-IMER-SM délivre une concentration de MeOH qui varie dans le temps à cause du gradient, mais qui vaut environ 7% au sein de l'IMER aux temps de rétention des GL, lycoramine et 2H-latifaliumin C. Ce pourcentage de MeOH moyen obtenu par le mélange des deux flux (chromatographique et contre gradient) est de 25% dans l'IMER tout au long de l'analyse lors de l'utilisation de la pompe de contre-gradient et correspond à la valeur maximale acceptable pour l'IMER lors de l'étude présentée au § 3.5.. Cette augmentation du pourcentage de MeOH a réduit l'activité catalytique de l'AChE et impliquait l'augmentation la concentration résiduelle d'ACh dans le chromatogramme et donc une forte augmentation de la ligne de base de ce composé qui, par conséquent, impliquait la perte de sensibilité observée.

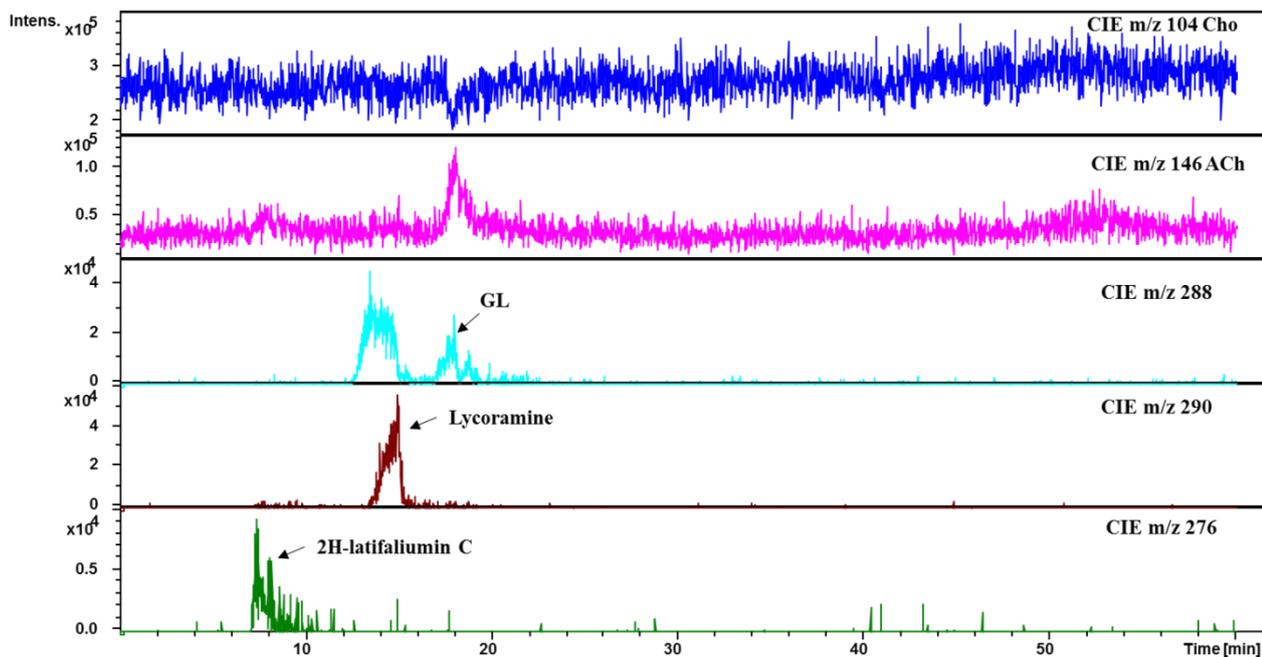


Figure 39 Chromatogramme d'Ions Extraits (CIE) de la fraction alcaloïdique de l'extrait de *Lycoris Radiata* après l'ajout de la pompe de contre-gradient

4.4. Criblage des inhibiteurs naturels dans les plantes médicinales de la médecine traditionnelle chinoise (MTC)

Les plantes médicinales de la médecine traditionnelle chinoise (MTC) sont utilisées dans le système de santé chinois depuis plus de 2 000 ans. Beaucoup de molécules bioactives ont pu être isolées de ces plantes, ce qui a permis de prouver sans ambiguïté leur effet pharmacologique au sein de la communauté scientifique et médicale. Elles ont ainsi été utilisées pour traiter de nombreuses maladies telles que le diabète, le cancer, Alzheimer, etc. Les plantes médicinales chinoises pourraient ainsi s'avérer être de riches ressources naturelles en inhibiteurs de l'AChE.

Une partie des travaux de recherche réalisés dans le cadre de cette thèse a été réalisée en Chine afin d'y trouver des plantes qui pouvaient potentiellement avoir des activités inhibitrices de l'AChE. Ce type d'activité métabolique est caractéristique des maladies neurodégénératives et c'est pourquoi les plantes sélectionnées étaient celles qui étaient connues pour avoir des effets sur les maladies neurologiques. La

plupart des inhibiteurs naturels identifiés aujourd'hui font partie de la famille des alcaloïdes [82, 83]. C'est pourquoi nos travaux d'extraction ont été focalisés sur la fraction alcaloïdique des plantes chinoises à notre disposition.

4.4.1. Mode opératoire

4.4.1.1. Extraction alcaloïdique des plantes médicinales

Le recueil « *Bencao gangmu* », rédigé par *Li Shizhen* durant la dynastie Ming, est encore aujourd'hui considéré comme l'ouvrage le plus complet et le plus compréhensible traitant de la médecine traditionnelle chinoise. Les plantes *Dendrobium nobile Lindl* (DNL), *Acorus tatarinowii Schott* (ATS), *Akebia quinata Decne* (AQD), *Radix Gentianae Macrophyllae* (RGM), *Clematis armandii Franch* (CAF), *Ligusticum chuanxiong hort* (LCH), *Rehmannia glutinosa Libosch* (RGL), *Paecilomyces cicadae Samson* (PCS) et *Asarum forbesii Maxim* (AFM) y sont enregistrés comme traitements pour les maladies neurologiques. Elles ont donc été sélectionnées et achetées sur le plate-forme officielle de vente en ligne des produits de MTCs (<https://www.zycst.com/>. Elles sont certifiées par le Ministère du Commerce de Chine) et ont été ramenées à Strasbourg pour en réaliser l'analyse par le dispositif bioanalytique CLHP-IMER-SM. 5 g de chaque plante sèche ont été utilisés et traités selon les mêmes étapes d'extraction que celles qui ont été utilisées pour analyser les bulbes de *Lycoris Radiata*.

4.4.1.2. Analyse des extraits par CLHP-SM

Avant d'injecter les extraits alcaloïdiques dans le dispositif bioanalytique CLHP-IMER-SM, le contenu moléculaire des extraits a été analysé avec la chaîne de chromatographie CLHP-SM telle que décrite dans § 4.2.1.1.. Le tampon acétate d'ammonium (5 mM, pH=6,3) et le MeOH ont été utilisés respectivement comme phases mobiles A et B. La colonne analytique était de marque Waters et de type ACQUITY UPLC BEH C18. La séparation a été réalisée par une méthode à gradient telle que suit: 0 min 20% B ; 15 min 75% B ; 30min 75% B ; 31 min 90% B ; 41 min 90% B ; 42 min 20% B ; 57 min 20% B. Les autres conditions analytiques étaient identiques

à celles qui ont été décrites dans § 4.2.1.1..

4.4.1.3. Criblage des inhibiteurs naturels.

20 µL des extraits alcaloïdiques de DNL (20 mg/mL), ATS (2,5 mg/mL), AQD (10 mg/mL), RGM (10 mg/mL), CAF (45 mg/mL), LCH (2,0 mg/mL), RGL (10 mg/mL), PCS (20 mg/mL), AFM (3,2 mg/mL) ont été injectées dans dispositif bioanalytique CLHP-IMER-SM. La méthode de séparation chromatographique des extraits alcaloïdiques de RGL et AFM étaient basée sur une élution isocratique de 75% B pendant 30 min. Par contre, les autres plantes ont nécessité un gradient tel que suit : 0 min 20% B ; 15 min 75% B ; 30 min 75% B ; 31 min 20% B ; 50 min 20% B. Les autres conditions analytiques sont identiques à celles qui ont été présentées dans § 4.2.1.2.. 20 µL d'eau Milli Q ont également été analysés dans comme un témoin négatif.

4.4.2. Résultats et discussion

Les poids de chaque plante et les taux d'extraction sont présentés dans le **tableau 5**. Les plantes CAF et AFM contenaient plus d'alcaloïdes que les autres plantes. La plante LCH était celle qui contenait le moins d'alcaloïdes.

	Poids de l'extrait alcaloïdique (mg)	Taux d'extraction
DNL	20	0,4 %
ATS	50	1,0 %
AQD	20	0,4 %
RGM	40	0,8 %
CAF	180	3,6 %
LCH	10	0,2 %
RGL	100	2,0 %
PCS	40	0,8 %
AFM	165	3,3 %

Tableau 5 Les poids et les taux des extraits alcaloïdiques des plantes étudiées.

Les chromatogrammes d'ion extraits présentaient de nombreux pics qui témoignaient de la présence de différents alcaloïdes dans ces extraits (**Figure 40 - 48**). Les figures 40 à 48 présentent les chromatogrammes extraits à partir des ions les plus intenses retrouvés dans l'analyse. Il s'agit des ions m/z 113, 130, 142, 157, 159, 163, 164, 169, 176, 181, 191, 192, 193, 194, 195, 197, 205, 207, 209, 211, 225, 227, 234, 256, 268, 274, 279, 290, 322, 327, 338, 384, 387, 398, 399, 401, 410, 414, 426 qui ne sont donnés ici que pour information et n'ont pas été utilisés pour tenter de déterminer la nature ou la structure des molécules correspondantes. En effet, tant qu'aucune activité inhibitrice n'a été mise en évidence, tout travail d'élucidation structurale est inutile.

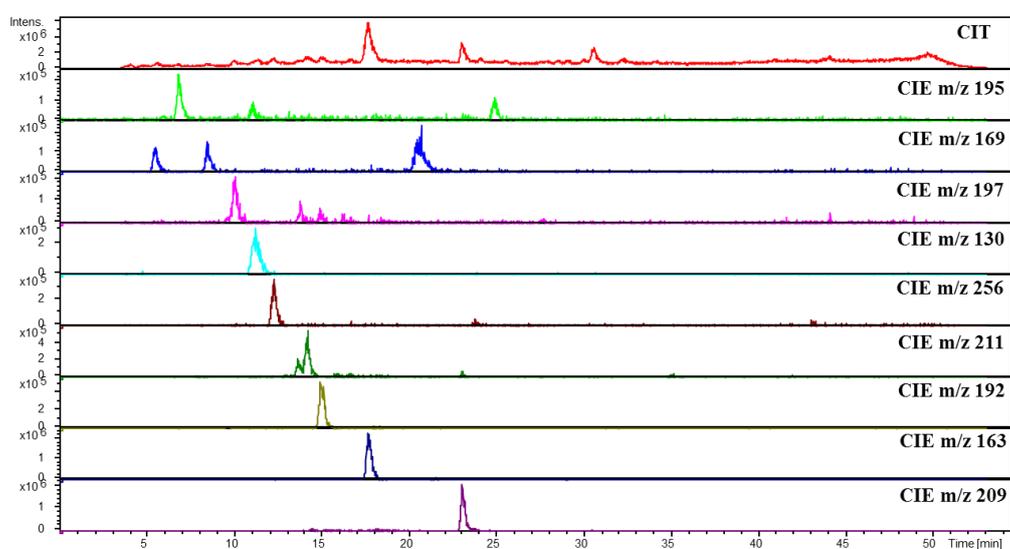


Figure 40 Chromatogramme d'ion Total (CIT) et Chromatogrammes d'Ions Extraits (CIE) de la fraction alcaloïdique de la plante DNL, 2 mg/mL.

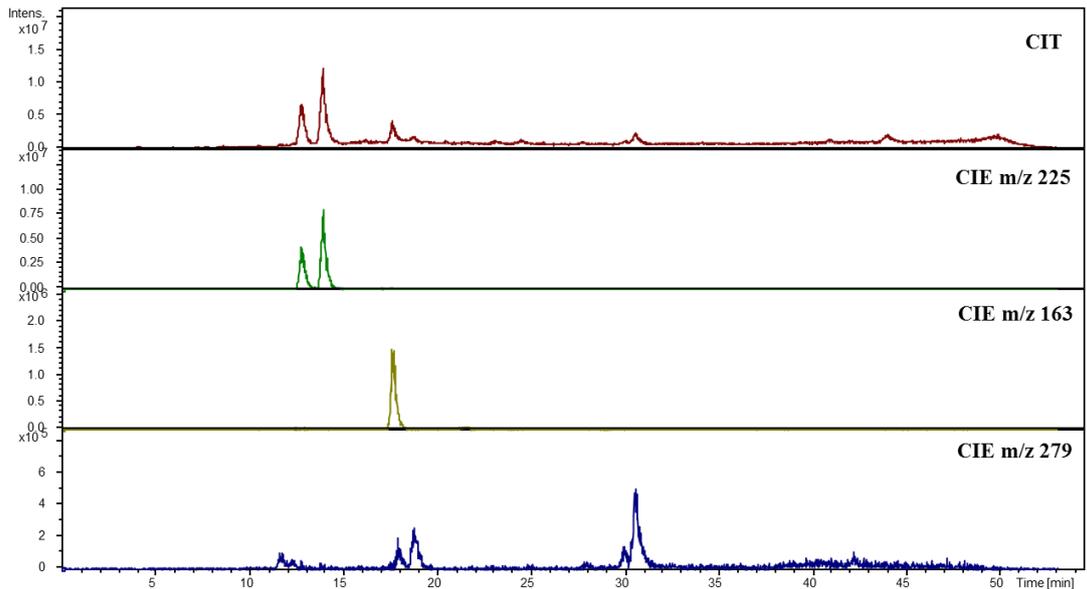


Figure 41 Chromatogramme d'Ion Total (CIT) et Chromatogramme d'Ions Extraits (CIE) de la fraction alcaloïdique de la plante ATS, 2,5 mg/mL.

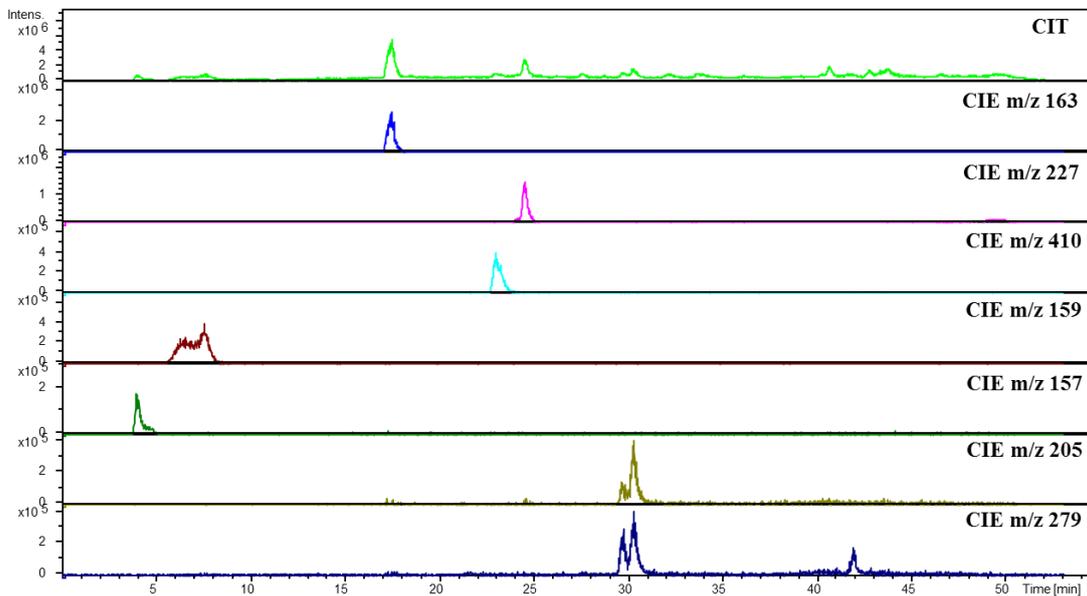


Figure 42 Chromatogramme d'Ion Total (CIT) et Chromatogrammes d'Ions Extraits (CIE) de la fraction alcaloïdique de la plante AQD, 2,0 mg/mL.

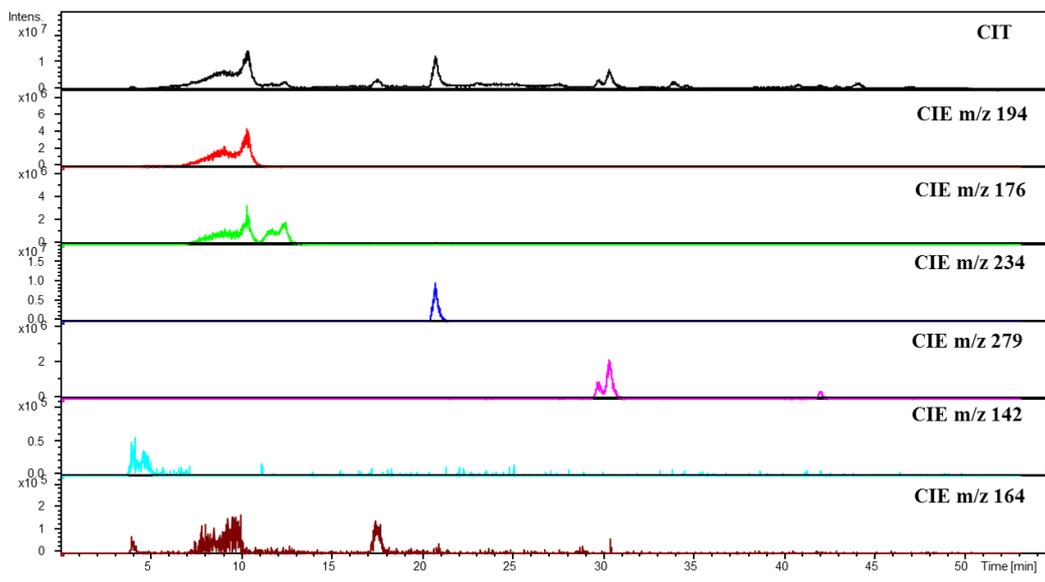


Figure 43 Chromatogramme d'Ion Total (CIT) et Chromatogrammes d'Ions Extraits (CIE) de la fraction alcaloïdique de la plante RGM, 2,0 mg/mL.

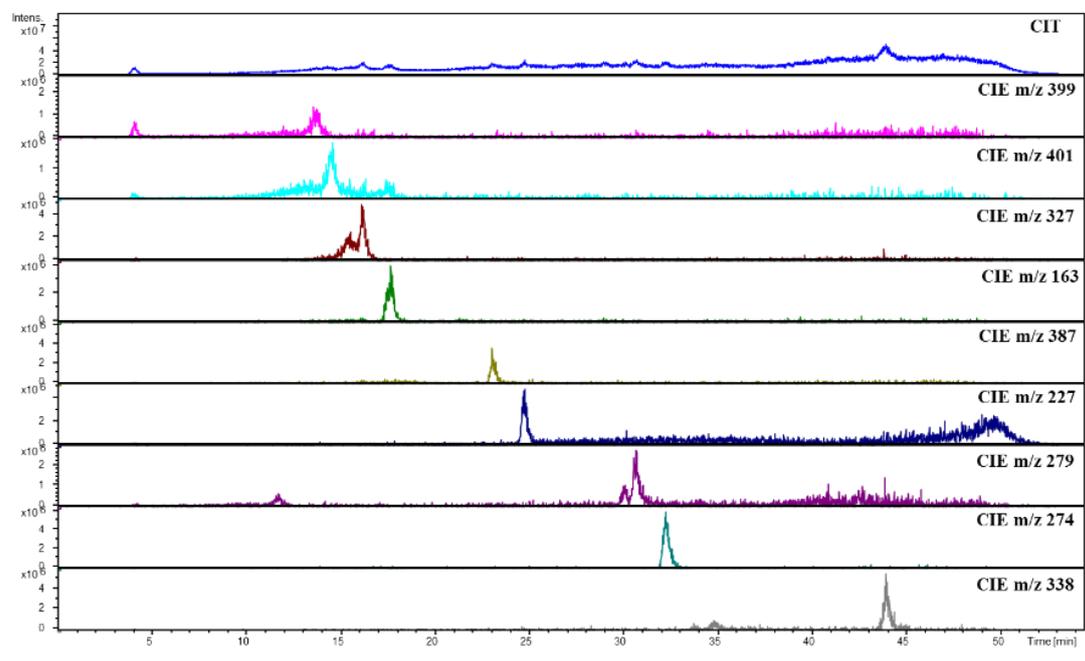


Figure 44 Chromatogramme d'Ion Total (CIT) et Chromatogrammes d'Ions Extraits (CIE) de la fraction alcaloïdique de la plante CAF, 4,5 mg/mL.

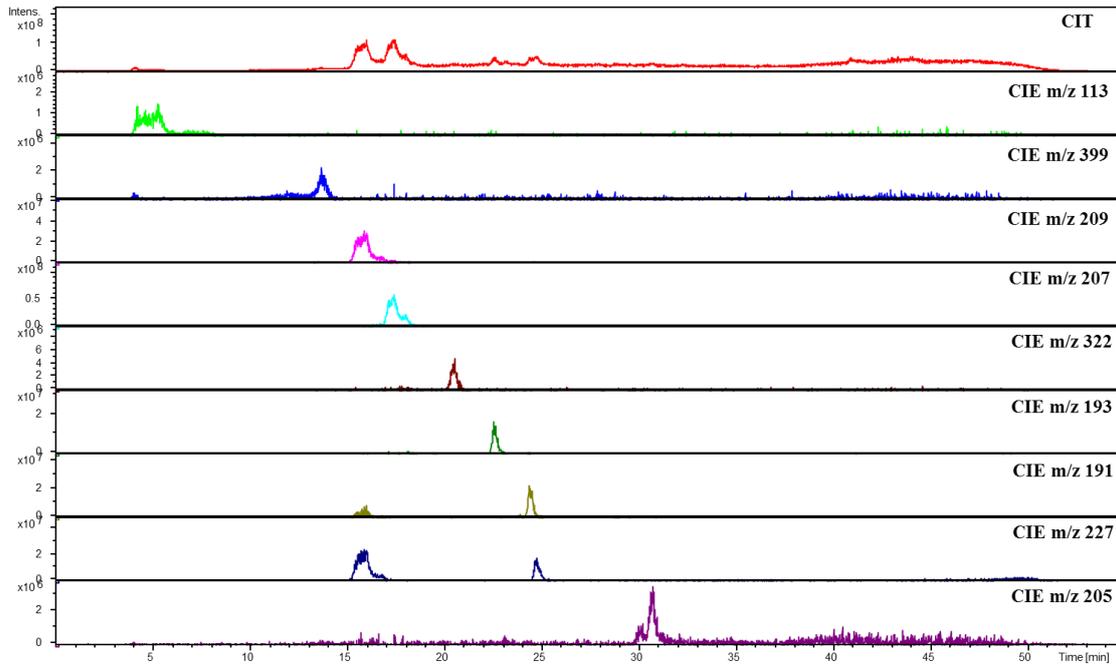


Figure 45 Chromatogramme d'Ion Total (CIT) et Chromatogrammes d'Ions Extraits (CIE) de la fraction alcaloïdique de la plante LCH, 1,0 mg/mL.

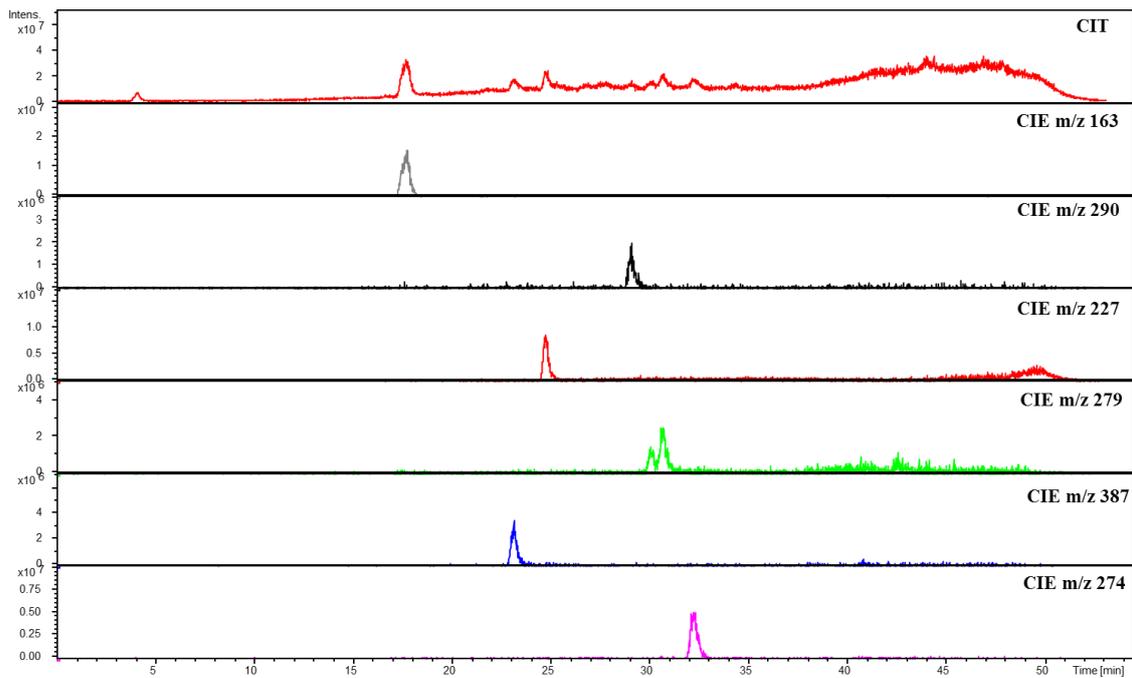


Figure 46 Chromatogramme d'Ion Total (CIT) et Chromatogrammes d'Ions Extraits (CIE) de la fraction alcaloïdique de la plante RGL, 5,0 mg/mL.

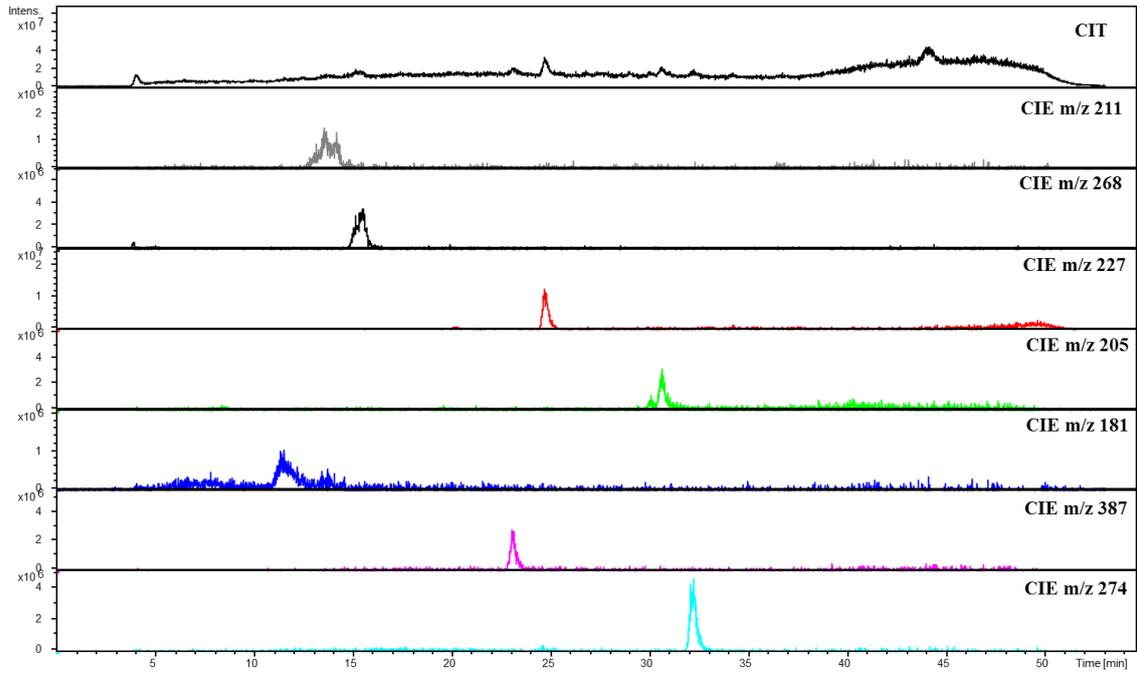


Figure 47 Chromatogramme d'ion Total (CIT) et Chromatogrammes d'Ions Extraits (CIE) de la fraction alcaloïdique de la plante PCS, 2,0 mg/mL.

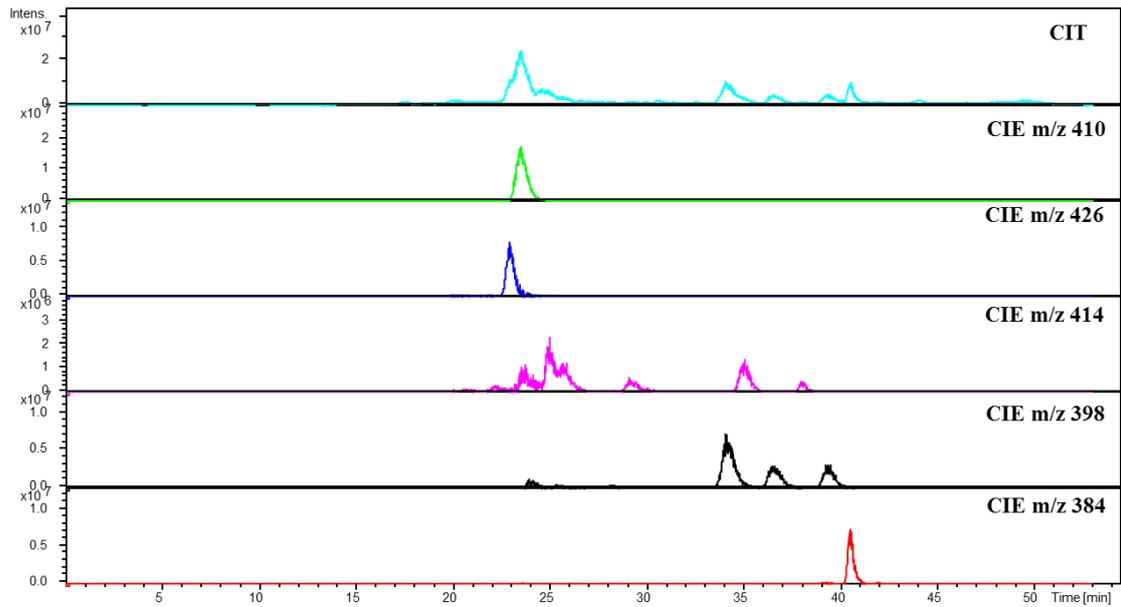


Figure 48 Chromatogramme d'ion Total (CIT) et Chromatogrammes d'Ions Extraits (CIE) de la fraction alcaloïdique de la plante AFM, 1,6 mg/mL.

L'injection de l'ensemble de ces extraits dans le dispositif bioanalytique CLHP-IMER-SM a permis de mettre en évidence deux composés qui présenteraient une activité inhibitrice de l'AChE. Ces deux signaux sont d'une amplitude très faible ($S/N < 3$) mais restent caractéristiques de l'ACh. Ils ont été retrouvés dans l'extrait alcaloïdique de AFM (**Figure 49**). Il s'agit des alcaloïdes qui présentent des ions majoritaires m/z 410 et 426. Les chromatogrammes de témoin négatif (eau ultrapure, **Figure 50**) indiquent que ces signaux ne proviennent pas d'un faux négatif et restent caractéristiques d'une inhibition de l'AChE. L'identification formelle tant de la nature, que de leurs activités, de ces deux alcaloïdes (m/z 410 et 426) sera nécessaire, mais n'a pas pu être réalisé dans le cadre de ce travail.

Dans les autres extraits, il n'y avait pas de signal caractéristique de l'ACh. Cela peut s'expliquer :

1. Les CMTs qui ont été utilisés étaient les plantes sèches et les alcaloïdes qui sont responsable à l'effet inhibiteur d'AChE, se trouvent plutôt dans les plantes fraîches comme les GL et lycoramine dans les bulbes fraîches de *Lycoris Radiata*. Si les inhibiteurs responsables de l'activité métabolique des plantes concernées sont des molécules volatiles ou thermolabiles, il reste possible qu'elles aient été détruites ou évaporées pendant le processus de séchage. Dans ce cas-là, il faudrait refaire l'extraction alcaloïdique sur les plantes fraîches des CMTs. Cependant cette éventualité semble peu probable étant donné que les plantes médicinales chinoises sont actives et commercialisée à l'état sec.
2. La sensibilité de notre dispositif bioanalytique CLHP-IMER-SM n'était pas suffisante (le gradient chromatographique a imposé une teneur en MeOH de 25% au sein de l'IMER) pour détecter les inhibiteurs faibles dans l'extrait. Dans ce cas-là, il faudrait continuer à optimiser ce dispositif pour pouvoir bénéficier d'une meilleure sensibilité de détection.
3. Les CMTs choisis ne contiennent pas du tout les inhibiteurs d'AChE et leur effet pharmacologique au niveau neurologique se réalise selon des voies métaboliques ne mettant pas en œuvre une inhibition de l'AChE. Dans ce

cas-là, il conviendrait refaire le choix des plantes pour le criblage des inhibiteurs naturels d'AChE.

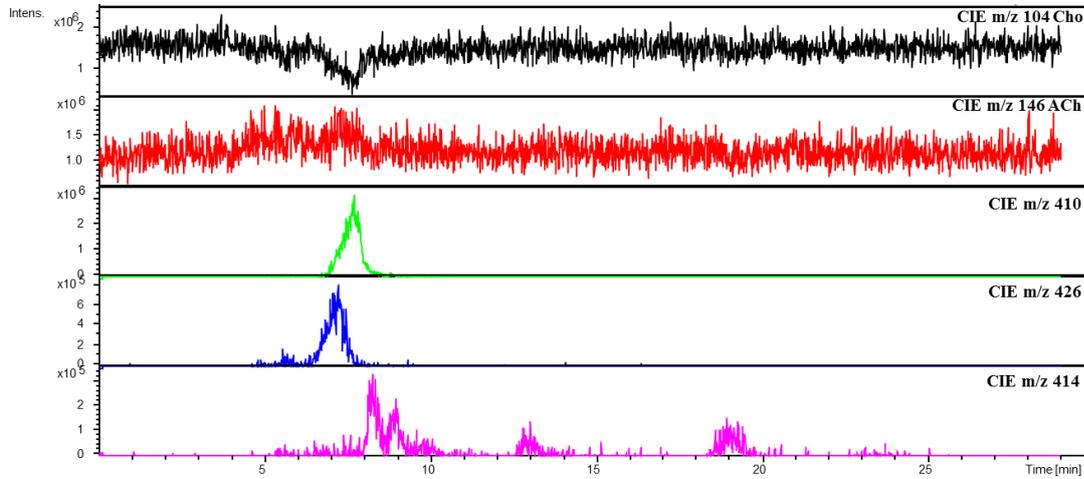


Figure 49 Chromatogrammes d'Ions Extraits (CIE) de la fraction alcaloïdique de la plante AFM injectée dans le dispositif bioanalytique CLHP-IMER-SM.

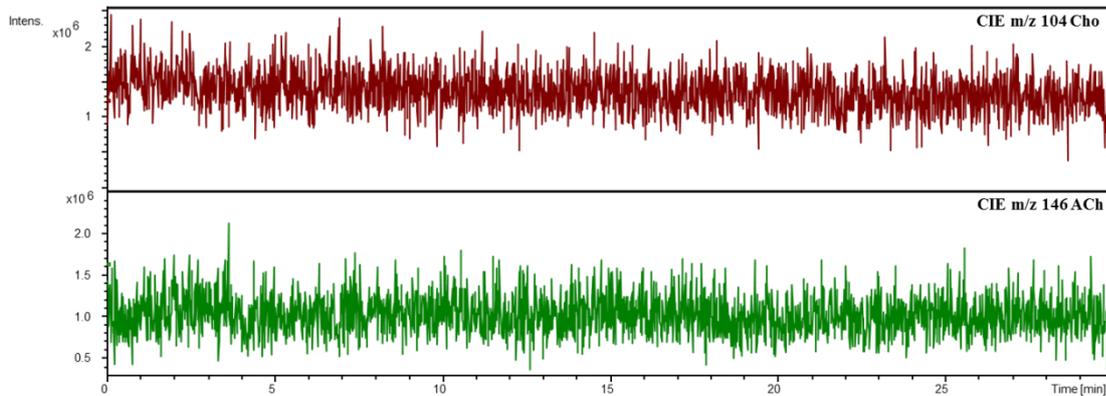


Figure 50 Chromatogrammes d'Ions Extraits (CIE) de l'eau MilliQ injectée dans le dispositif bioanalytique CLHP-IMER-SM comme le témoin négatif.

5. Conclusion

Dans ce travail, un dispositif bioanalytique destiné à découvrir de nouveaux inhibiteurs de l'acétylcholinestérase (AChE) a été mis au point. Ce dispositif est basé sur un montage chromatographique un peu complexe reposant sur un couplage original basé sur la Chromatographie Liquide à Hautes Performances (CLHP), un bioréacteur à enzymes immobilisées (IMER) et une détection par Spectrométrie de Masse (SM) (CLHP-IMER-SM). Les conditions analytiques ont été optimisées tant pour l'analyse de trois étalons d'inhibiteurs de l'AChE (GL, HuA et TA) que pour l'analyse d'extrait de plantes. Les 3 étalons d'inhibiteurs ont été choisis pour évaluer, tester et valider la méthode d'analyse. Le principe de fonctionnement du dispositif développé au cours de ce travail de Doctorat repose sur le fait qu'un inhibiteur élué hors de la colonne de chromatographie sera capable d'inhiber de façon très sélective et rapide la réaction d'hydrolyse catalysée par une enzyme immobilisée au sein d'un bioréacteur. Cette réaction est entretenue de façon constante par l'injection du substrat au sein de l'IMER. La sortie d'un inhibiteur hors de la colonne de chromatographie et donc son entrée au sein du bioréacteur ralentira la réaction d'hydrolyse et génèrera une augmentation de la concentration du substrat non hydrolysé et diminuera la concentration du produit de la réaction d'hydrolyse. Le système proposé repose sur l'immobilisation de l'AChE qui catalyse l'hydrolyse du substrat acétylcholine (ACh) en choline (Cho) et en acide acétique. Après avoir injecté les 3 étalons d'inhibiteurs, des pics d'ACh correspondant à chacun des trois inhibiteurs sont apparus sur le chromatogramme aux mêmes temps de rétention que les inhibiteurs, démontrant ainsi sans ambiguïté, la vérification des hypothèses précédentes. Le système ainsi développé présente la particularité très originale de détecter les inhibiteurs par leur activité inhibitrice et non pas par leur signature spectrale comme c'est usuellement le cas en chromatographie. La relation dose-effet des pics d'ACh liant la production d'ACh avec la quantité injectée des inhibiteurs a montré que l'aire des pics d'ACh augmente avec l'augmentation de la quantité des inhibiteurs injectés jusqu'à ce qu'elle atteigne une valeur maximale (1,2 nmol pour les GL et HuA et 1,6 nmol pour la TA) au-delà de laquelle la quantité d'ACh résiduelle (non hydrolysée) n'augmente plus (présence d'un plateau). Les trois inhibiteurs

étudiés présentent des valeurs de surface de pic d'ACh résiduel différentes, les inhibiteurs les plus forts ayant présenté des valeurs de surface de pics plus élevées que les inhibiteurs plus faibles. Si le dispositif mis en place n'est pas considéré aujourd'hui comme étant un outil quantitatif, il se révèle cependant tout à fait capable de comparer les activités inhibitrices des molécules candidates. La répétabilité de la méthode a été évaluée par l'injection multiple de la même quantité des inhibiteurs dans la même journée. Les RSDs des aires des pics d'ACh observés sont tous inférieurs à 5%, ce qui indique que ce dispositif bioanalytique CLHP-IMER-SM présente une bonne répétabilité (*intra-day*) pour les 3 inhibiteurs étudiés.

Après avoir validé cette méthode CLHP-IMER-SM avec les 3 étalons d'inhibiteurs, le dispositif a été utilisé pour découvrir de nouveaux inhibiteurs naturels dans des extraits alcaloïdiques de plantes. L'analyse de ces extraits a révélé la présence de pics d'ACh dans le chromatogramme aux mêmes temps de rétention que des inhibiteurs connus mais aussi de certaines molécules dont personne n'avait pointé le pouvoir inhibiteur de l'AChE jusqu'à présent. Ce dispositif CLHP-IMER-SM présente ainsi la capacité d'aider à la découverte de nouveaux inhibiteurs de l'AChE et de participer ainsi à la mise au point de potentiels nouveaux candidats médicaments qui pourraient être destinés à des patients souffrant de maladies neurodégénératives. La séparation des pics d'ACh générés par les inhibiteurs naturels est beaucoup plus compliquée que celle qui a été réalisée avec un mélange de trois inhibiteurs de synthèse. C'est pourquoi il a fallu utiliser un gradient de phase organique mobile. La variation dans le temps de la teneur en méthanol dans la phase dans laquelle s'opère la réaction d'hydrolyse enzymatique ne permet pas d'obtenir des réactions dont la complétion est constante du début à la fin du chromatogramme. Il a donc été envisagé d'utiliser une pompe de contre-gradient pour uniformiser la teneur en phase organique dans l'IMER tout en permettant un gradient au cours de la chromatographie. Cette solution n'a pas été satisfaisante à cause de la forte teneur en phase organique qui a été retrouvée de façon constante, certes, mais en concentration suffisamment élevée pour réduire de façon significative la sensibilité

de détection des activités inhibitrices recherchées.

Ce dispositif, tel que réalisé au cours de ce travail de Doctorat de l'Université de Strasbourg, n'est qu'un démonstrateur qui a permis de démontrer la véracité des hypothèses avancées. Ce dispositif est encore trop complexe à mettre en œuvre (il ne nécessite pas moins de 3 pompes chromatographiques), il est fragile (les enzymes nécessitent des conditions de stockage draconiennes et le dispositif nécessite un spectromètre de masse), il n'est pas assez sensible (trop affecté par les concentrations de phase organique présentes dans la phase mobile de chromatographie), il est non quantitatif (sa gamme de linéarité est très restreinte), et aujourd'hui il est encore limité à la recherche des inhibiteurs de l'acétylcholinestérase. Dans le futur, il conviendra de suppléer à ces défauts par la mise en place de solutions techniques mais aussi scientifiques et devra faire ses preuves par le criblage de nombreuses substances naturelles. Il conviendra aussi d'ouvrir le champ d'application de ce concept à d'autres enzymes responsables de pathologies chroniques actuelles qui rendent si compliquée, la vie de trop nombreux patients. Il serait en effet si élégant de trouver, dans une substance naturelle telle qu'un aliment, un inhibiteur d'une réaction biologique responsable de souffrances, pour permettre au concept de chimio-prévention nutritionnelle de se s'imposer dans notre vie. Son but n'est pas de soigner, mais de prévenir, donc de retarder une échéance ou simplement d'améliorer la qualité de vie, de permettre aux hommes de vieillir en paix...

6. Bibliographie

-
- [1] E. Giacobini, Cholinesterase inhibitors: new roles and therapeutic alternatives, *Pharmacol Res*, 50 (2004) 433-440.
- [2] S.-Y. Shi, Y.-P. Zhang, X.-Y. Jiang, X.-Q. Chen, K.-L. Huang, H.-H. Zhou, X.-Y. Jiang, Coupling HPLC to on-line, post-column (bio)chemical assays for high-resolution screening of bioactive compounds from complex mixtures, *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 28 (2009) 865-877.
- [3] C.F. de Jong, R.J.E. Derks, B. Bruyneel, W. Niessen, H. Irth, High-performance liquid chromatography-mass spectrometry-based acetylcholinesterase assay for the screening of inhibitors in natural extracts, *Journal of Chromatography A*, 1112 (2006) 303-310.
- [4] V. Andrisano, M. Bartolini, R. Gotti, V. Cavrini, G. Felix, Determination of inhibitors' potency (IC₅₀) by a direct high-performance liquid chromatographic method on an immobilised acetylcholinesterase column, *Journal of chromatography. B, Biomedical sciences and applications*, 753 (2001) 375-383.
- [5] R.R. Ramsay, K.F. Tipton, Assessment of Enzyme Inhibition: A Review with Examples from the Development of Monoamine Oxidase and Cholinesterase Inhibitory Drugs, *Molecules*, 22 (2017) 1192.
- [6] D.M. Quinn, Acetylcholinesterase: enzyme structure, reaction dynamics, and virtual transition states, *Chemical reviews*, 87 (1987) 955-979.
- [7] T.L. Rosenberry, Catalysis by acetylcholinesterase: evidence that the rate-limiting step for acylation with certain substrates precedes general acid-base catalysis, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 72 (1975) 3834-3838.
- [8] T.L. Rosenberry, Acetylcholinesterase, *Advances in enzymology and related areas of molecular biology*, 43 (1975) 103-218.
- [9] W.K. Summers, L.V. Majovski, G.M. Marsh, K. Tachiki, A. Kling, Oral tetrahydroaminoacridine in long-term treatment of senile dementia, Alzheimer type, *The New England journal of medicine*, 315 (1986) 1241-1245.
- [10] P.A. Thompson, D.E. Wright, C.E. Counsell, J. Zajicek, Statistical analysis, trial design and duration in Alzheimer's disease clinical trials: a review, *International psychogeriatrics / IPA*, 24 (2012) 689-697.
- [11] R.M. Lane, S.G. Potkin, A. Enz, Targeting acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase in dementia, *The international journal of neuropsychopharmacology*, 9 (2006) 101-124.
- [12] E. Giacobini, Cholinesterase inhibitors: new roles and therapeutic alternatives, *Pharmacol Res*, 50 (2004) 433-440.
- [13] J. Birks, Cholinesterase inhibitors for Alzheimer's disease, *The Cochrane database of systematic reviews*, (2006) CD005593.
- [14] C. Hyde, J. Peters, M. Bond, G. Rogers, M. Hoyle, R. Anderson, M. Jeffreys, S. Davis, P. Thokala, T. Moxham, Evolution of the evidence on the effectiveness and cost-effectiveness of acetylcholinesterase inhibitors and memantine for Alzheimer's disease: systematic review and economic model, *Age and ageing*, 42 (2013) 14-20.
- [15] M. Bond, G. Rogers, J. Peters, R. Anderson, M. Hoyle, A. Miners, T. Moxham, S. Davis, P. Thokala, A. Wailoo, M. Jeffreys, C. Hyde, The effectiveness and cost-effectiveness of donepezil, galantamine, rivastigmine and memantine for the treatment of Alzheimer's disease (review of Technology Appraisal No. 111): a systematic review and economic model, *Health Technol Assess*, 16 (2012) 1-470.
- [16] M.B. Colovic, D.Z. Krstic, T.D. Lazarevic-Pasti, A.M. Bondzic, V.M. Vasic, Acetylcholinesterase inhibitors: pharmacology and toxicology, *Current neuropharmacology*, 11 (2013) 315-335.
- [17] D. Galimberti, E. Scarpini, Old and new acetylcholinesterase inhibitors for Alzheimer's disease, *Expert Opin Inv Drug*, 25 (2016) 1181-1187.
- [18] L. S Schneider, A critical review of cholinesterase inhibitors as a treatment modality in Alzheimer's

- disease, *Dialogues Clin Neurosci*, 2 (2000) 111-128.
- [19] R.D. O'Brien, Enzyme Inhibitors as Substrates. Interactions of Esterases with Esters of Organophosphorus and Carbamic Acid. W. N. Aldridge, Elsa Reiner, *The Quarterly Review of Biology*, 49 (1974) 253-254.
- [20] G.W. Bruyn, Organophosphorus insecticides: A general introduction, environmental health criteria: No. 63, World Health Organisation, Geneva, 1986, 181 pages, ISBN 92 4 154263 2. US\$ 9.60, *Journal of the neurological sciences*, 83 (1988) 123.
- [21] Y. Boublik, P. Saint-Aguet, A. Lougarre, M. Arnaud, F. Villatte, S. Estrada-Mondaca, D. Fournier, Acetylcholinesterase engineering for detection of insecticide residues, *Protein engineering*, 15 (2002) 43-50.
- [22] E. Enan, I.G. Berberian, S. el-Fiki, M. el-Masry, O.H. Enan, Effects of two organophosphorus insecticides on some biochemical constituents in the nervous system and liver of rabbits, *Journal of environmental science and health. Part. B, Pesticides, food contaminants, and agricultural wastes*, 22 (1987) 149-170.
- [23] L.G. Costa, Current issues in organophosphate toxicology, *Clinica chimica acta; international journal of clinical chemistry*, 366 (2006) 1-13.
- [24] C. Bartolucci, E. Perola, C. Pilger, G. Fels, D. Lamba, Three-dimensional structure of a complex of galanthamine (Nivalin) with acetylcholinesterase from *Torpedo californica*: implications for the design of new anti-Alzheimer drugs, *Proteins*, 42 (2001) 182-191.
- [25] C. Pilger, C. Bartolucci, D. Lamba, A. Tropsha, G. Fels, Accurate prediction of the bound conformation of galanthamine in the active site of *Torpedo californica* acetylcholinesterase using molecular docking, *Journal of molecular graphics & modelling*, 19 (2001) 288-296.
- [26] N. Kitisripanya, P. Saparpakorn, P. Wolschann, S. Hannongbua, Binding of huperzine A and galanthamine to acetylcholinesterase, based on ONIOM method, *Nanomedicine : nanotechnology, biology, and medicine*, 7 (2011) 60-68.
- [27] G. Pacheco, R. Palacios-Esquivel, D.E. Moss, Cholinesterase inhibitors proposed for treating dementia in Alzheimer's disease: selectivity toward human brain acetylcholinesterase compared with butyrylcholinesterase, *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics*, 274 (1995) 767-770.
- [28] T. Thomsen, H. Kewitz, Selective inhibition of human acetylcholinesterase by galanthamine in vitro and in vivo, *Life sciences*, 46 (1990) 1553-1558.
- [29] A. Maelicke, T. Coban, A. Storch, A. Schratzenholz, E.F. Pereira, E.X. Albuquerque, Allosteric modulation of *Torpedo* nicotinic acetylcholine receptor ion channel activity by noncompetitive agonists, *Journal of receptor and signal transduction research*, 17 (1997) 11-28.
- [30] S.E. Freeman, R.M. Dawson, Tacrine: a pharmacological review, *Progress in neurobiology*, 36 (1991) 257-277.
- [31] P.B. Watkins, H.J. Zimmerman, M.J. Knapp, S.I. Gracon, K.W. Lewis, Hepatotoxic effects of tacrine administration in patients with Alzheimer's disease, *Jama*, 271 (1994) 992-998.
- [32] A.K. Desai, G.T. Grossberg, Rivastigmine for Alzheimer's disease, *Expert review of neurotherapeutics*, 5 (2005) 563-580.
- [33] H. Sugimoto, H. Ogura, Y. Arai, Y. Limura, Y. Yamanishi, Research and development of donepezil hydrochloride, a new type of acetylcholinesterase inhibitor, *Japanese journal of pharmacology*, 89 (2002) 7-20.
- [34] N.C. Inestrosa, M.C. Dinamarca, A. Alvarez, Amyloid-cholinesterase interactions. Implications for

- Alzheimer's disease, *The FEBS journal*, 275 (2008) 625-632.
- [35] L.A. Mohamed, H. Qosa, A. Kaddoumi, Age-Related Decline in Brain and Hepatic Clearance of Amyloid-Beta is Rectified by the Cholinesterase Inhibitors Donepezil and Rivastigmine in Rats, *ACS chemical neuroscience*, 6 (2015) 725-736.
- [36] F. Bai, Y. Xu, J. Chen, Q. Liu, J. Gu, X. Wang, J. Ma, H. Li, J.N. Onuchic, H. Jiang, Free energy landscape for the binding process of Huperzine A to acetylcholinesterase, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 110 (2013) 4273-4278.
- [37] M.d.M. Alcalá, N.M. Vivas, S. Hospital, P. Camps, D. Muñoz-Torrero, A. Badia, Characterisation of the anticholinesterase activity of two new tacrine–huperzine A hybrids, *Neuropharmacology*, 44 (2003) 749-755.
- [38] L.X. Tao, X.T. Huang, Y.T. Chen, X.C. Tang, H.Y. Zhang, Acetylcholinesterase-independent protective effects of huperzine A against iron overload-induced oxidative damage and aberrant iron metabolism signaling in rat cortical neurons, *Acta pharmacologica Sinica*, 37 (2016) 1391-1400.
- [39] M.S. Rafii, S. Walsh, J.T. Little, K. Behan, B. Reynolds, C. Ward, S. Jin, R. Thomas, P.S. Aisen, S. Alzheimer's Disease Cooperative, A phase II trial of huperzine A in mild to moderate Alzheimer disease, *Neurology*, 76 (2011) 1389-1394.
- [40] G. Yang, Y. Wang, J. Tian, J.P. Liu, Huperzine A for Alzheimer's disease: a systematic review and meta-analysis of randomized clinical trials, *PloS one*, 8 (2013) e74916.
- [41] R.R. Neubig, M. Spedding, T. Kenakin, A. Christopoulos, N. International Union of Pharmacology Committee on Receptor, C. Drug, International Union of Pharmacology Committee on Receptor Nomenclature and Drug Classification. XXXVIII. Update on terms and symbols in quantitative pharmacology, *Pharmacological reviews*, 55 (2003) 597-606.
- [42] T. Kakkar, Y. Pak, M. Mayersohn, Evaluation of a minimal experimental design for determination of enzyme kinetic parameters and inhibition mechanism, *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics*, 293 (2000) 861-869.
- [43] G.W. Caldwell, Z. Yan, W. Lang, J.A. Masucci, The IC(50) concept revisited, *Current topics in medicinal chemistry*, 12 (2012) 1282-1290.
- [44] B.F. Krippendorff, R. Neuhaus, P. Lienau, A. Reichel, W. Huisinga, Mechanism-based inhibition: deriving $K(I)$ and $k(inact)$ directly from time-dependent IC(50) values, *Journal of biomolecular screening*, 14 (2009) 913-923.
- [45] M. Yoshino, K. Murakami, A graphical method for determining inhibition constants, *J Enzyme Inhib Med Chem*, 24 (2009) 1288-1290.
- [46] N.R. Mohamad, N.H. Marzuki, N.A. Buang, F. Huyop, R.A. Wahab, An overview of technologies for immobilization of enzymes and surface analysis techniques for immobilized enzymes, *Biotechnology, biotechnological equipment*, 29 (2015) 205-220.
- [47] M. Bartolini, V. Cavrini, V. Andrisano, Choosing the right chromatographic support in making a new acetylcholinesterase-micro-immobilised enzyme reactor for drug discovery, *Journal of chromatography. A*, 1065 (2005) 135-144.
- [48] S.-M. Fang, H.-N. Wang, Z.-X. Zhao, W.-H. Wang, Immobilized enzyme reactors in HPLC and its application in inhibitor screening: A review, *Journal of Pharmaceutical Analysis*, 2 (2012) 83-89.
- [49] A.M. Girelli, E. Mattei, Application of immobilized enzyme reactor in on-line high performance liquid chromatography: a review, *Journal of chromatography. B, Analytical technologies in the biomedical and life sciences*, 819 (2005) 3-16.
- [50] A.M. Klibanov, Immobilized enzymes and cells as practical catalysts, *Science*, 219 (1983) 722-727.

- [51] S. Chakraborty, H. Rusli, A. Nath, J. Sikder, C. Bhattacharjee, S. Curcio, E. Drioli, Immobilized biocatalytic process development and potential application in membrane separation: a review, *Crit Rev Biotechnol*, 36 (2016) 43-58.
- [52] M.S. Eldin, E.I. Seuror, M.A. Nasr, H.A. Tieama, Affinity covalent immobilization of glucoamylase onto rho-benzoquinone-activated alginate beads: II. Enzyme immobilization and characterization, *Applied biochemistry and biotechnology*, 164 (2011) 45-57.
- [53] G. Massolini, E. Calleri, E. De Lorenzi, M. Pregolato, M. Terreni, G. Felix, C. Gandini, Immobilized penicillin G acylase as reactor and chiral selector in liquid chromatography, *Journal of chromatography. A*, 921 (2001) 147-160.
- [54] S. Tomer, J.G. Dorsey, A. Berthod, Nonionic micellar liquid chromatography coupled to immobilized enzyme reactors, *Journal of Chromatography A*, 923 (2001) 7-16.
- [55] G. Massolini, E. Calleri, E. De Lorenzi, M. Pregolato, M. Terreni, G. Felix, C. Gandini, Immobilized penicillin G acylase as reactor and chiral selector in liquid chromatography, *Journal of Chromatography A*, 921 (2001) 147-160.
- [56] C.W. Wu, J.G. Lee, W.C. Lee, Protein and enzyme immobilization on non-porous microspheres of polystyrene, *Biotechnol Appl Bioc*, 27 (1998) 225-230.
- [57] M. Bartolini, V. Cavrini, V. Andrisano, Monolithic micro-immobilized-enzyme reactor with human recombinant acetylcholinesterase for on-line inhibition studies, *Journal of chromatography. A*, 1031 (2004) 27-34.
- [58] M. Ono, N. Idei, T. Nakajima, Y. Itoh, N. Kawakami, K. Shimada, S. Yamato, Simultaneous determination of riboflavin phosphate and other ingredients in a multivitamin pharmaceutical preparation by on-line automated LC coupled with pre-column immobilized enzyme reactor, *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis*, 29 (2002) 325-334.
- [59] S. Yamato, N. Kawakami, K. Shimada, M. Ono, N. Idei, Y. Itoh, On-line automated high-performance liquid chromatographic determination of total riboflavin phosphates using immobilized acid phosphatase as a pre-column reactor, *Journal of Chromatography A*, 896 (2000) 171-181.
- [60] E. Calleri, C. Temporini, S. Furlanetto, F. Loiodice, G. Fracchiolla, G. Massolini, Lipases for biocatalysis: development of a chromatographic bioreactor, *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis*, 32 (2003) 715-724.
- [61] A.M. Girelli, E. Mattei, A. Messina, Immobilized tyrosinase reactor for on-line HPLC application - Development and characterization, *Sensor Actuat B-Chem*, 121 (2007) 515-521.
- [62] E. Vilanova, A. Manjon, J.L. Iborra, Tyrosine-Hydroxylase Activity of Immobilized Tyrosinase on Enzacryl-Aa and Cpg-Aa Supports - Stabilization and Properties, *Biotechnology and bioengineering*, 26 (1984) 1306-1312.
- [63] M. Bartolini, V. Cavrini, V. Andrisano, Characterization of reversible and pseudo-irreversible acetylcholinesterase inhibitors by means of an immobilized enzyme reactor, *Journal of chromatography. A*, 1144 (2007) 102-110.
- [64] K.L. Vanzolini, L.C.C. Vieira, A.G. Corrêa, C.L. Cardoso, Q.B. Cass, Acetylcholinesterase Immobilized Capillary Reactors—Tandem Mass Spectrometry: An On-Flow Tool for Ligand Screening, *Journal of medicinal chemistry*, 56 (2013) 2038-2044.
- [65] J.F. Jen, M.Y. Tsai, Determination of Phenol in Urine by High-Performance Liquid-Chromatography with Online Precolumn Enzymatic-Hydrolysis of the Conjugates, *J Chromatogr B*, 658 (1994) 87-92.
- [66] T.R. Tsai, T.M. Cham, K.C. Chen, C.F. Chen, T.H. Tsai, Determination of acetylcholine by on-line

microdialysis coupled with pre- and post-microbore column enzyme reactors with electrochemical detection, *Journal of Chromatography B-Biomedical Applications*, 678 (1996) 151-155.

[67] U.A.T. Brinkman, A Review of Reaction Detection in Hplc, *Chromatographia*, 24 (1987) 190-200.

[68] R. Honow, D. Bongartz, A. Hesse, An improved HPLC-enzyme-reactor method for the determination of oxalic acid in complex matrices, *Clinica Chimica Acta*, 261 (1997) 131-139.

[69] T. Kato, J.K. Liu, K. Yamamoto, P.G. Osborne, O. Niwa, Detection of basal acetylcholine release in the microdialysis of rat frontal cortex by high-performance liquid chromatography using a horseradish peroxidase-osmium redox polymer electrode with pre-enzyme reactor, *Journal of chromatography. B, Biomedical applications*, 682 (1996) 162-166.

[70] V.A. Davankov, L.A. Pavlova, M.P. Tsyurupa, D.R. Tur, Novel polymeric solid-phase extraction material for complex biological matrices. Portable and disposable artificial kidney, *Journal of chromatography. B, Biomedical sciences and applications*, 689 (1997) 117-122.

[71] E. Calleri, C. Temporini, S. Furlanetto, F. Liodice, G. Fracchiolla, G. Massolini, Lipases for biocatalysis: development of a chromatographic bioreactor, *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis*, 32 (2003) 715-724.

[72] G. Massolini, E. Calleri, A. Lavecchia, F. Liodice, D. Lubda, C. Temporini, G. Fracchiolla, P. Tortorella, E. Novellino, G. Caccialanza, Enantioselective hydrolysis of some 2-aryloxyalkanoic acid methyl esters and isosteric analogues using a penicillin G acylase-based HPLC monolithic silica column, *Analytical chemistry*, 75 (2003) 535-542.

[73] S. Yamato, H. Wakabayashi, M. Nakajima, K. Shimada, Amperometric determination of oxalate in plasma and urine by liquid chromatography with immobilized oxalate oxidase, *Journal of chromatography. B, Biomedical applications*, 656 (1994) 29-35.

[74] K. Hostettmann, J.L. Wolfender, C. Terreaux, Modern screening techniques for plant extracts, *Pharm Biol*, 39 (2001) 18-32.

[75] K. Robards, Strategies for the determination of bioactive phenols in plants, fruit and vegetables, *Journal of chromatography. A*, 1000 (2003) 657-691.

[76] U. Schobel, M. Frenay, D.A. van Elswijk, J.M. McAndrews, K.R. Long, L.M. Olson, S.C. Bobzin, H. Irth, High resolution screening of plant natural product extracts for estrogen receptor alpha and beta binding activity using an online HPLC-MS biochemical detection system, *Journal of biomolecular screening*, 6 (2001) 291-303.

[77] A.R. de Boer, T. Letzel, D.A. van Elswijk, H. Lingeman, W.M.A. Niessen, H. Irth, On-line coupling of high-performance liquid chromatography to a continuous-flow enzyme assay based on electrospray ionization mass spectrometry, *Analytical chemistry*, 76 (2004) 3155-3161.

[78] Y.Q. Tian, C.Y. Zhang, M.Q. Guo, Comparative Analysis of Amaryllidaceae Alkaloids from Three Lycoris Species, *Molecules*, 20 (2015) 21854-21869.

[79] J.J. Nair, J. van Staden, Pharmacological and toxicological insights to the South African Amaryllidaceae, *Food and Chemical Toxicology*, 62 (2013) 262-275.

[80] X. Zhou, Y.-b. Liu, S. Huang, Y. Liu, An LC-MS/MS method for the simultaneous determination of lycorine and galanthamine in rat plasma and its application to pharmacokinetic study of Lycoris radiata extract in rats, *Journal of Huazhong University of Science and Technology [Medical Sciences]*, 34 (2014) 861-868.

[81] R.L. Irwin, H.J. Smith, Cholinesterase inhibition by galanthamine and lycoramine, *Biochemical pharmacology*, 3 (1960) 147-148.

[82] T.C. dos Santos, T.M. Gomes, B.A.S. Pinto, A.L. Camara, A.M.D. Paes, Naturally Occurring

Acetylcholinesterase Inhibitors and Their Potential Use for Alzheimer's Disease Therapy, *Frontiers in Pharmacology*, 9 (2018) 1192.

[83] E.L. Konrath, C.d.S. Passos, L.C. Klein-Júnior, A.T. Henriques, Alkaloids as a source of potential anticholinesterase inhibitors for the treatment of Alzheimer's disease, *J Pharm Pharmacol*, 65 (2013) 1701-1725.

Mise au point d'un système chromatographique permettant de détecter en ligne la présence d'inhibiteurs de l'acétylcholinestérase et de comparer qualitativement leurs activités inhibitrices

Résumé

Notre projet porte sur la mise au point d'un système chromatographique couplant la chromatographie en phase liquide à haute performance (CLHP), un réacteur d'enzyme immobilisée (IMER) et une détection par spectrométrie de masse (SM) destiné à détecter les inhibiteurs de l'acétylcholinestérase (AChE) et de comparer leurs activités inhibitrices respectives. En utilisant ce couplage, les inhibiteurs d'AChE peuvent être séparés en ligne et leurs activités inhibitrices comparées directement par la simple mesure, par SM, de la surface des pics chromatographiques de l'acétylcholine (ACh) résiduelle, dont l'hydrolyse a été inhibée par les composés recherchés. 3 étalons connus d'inhibiteurs d'AChE (la galanthamine-GL, l'huperzine A-HuA et la tacrine-TA), ont été sélectionnés pour mettre au point les conditions analytiques de ce couplage original. Après avoir validé cette méthode avec les 3 étalons inhibiteurs de l'AChE, les extraits alcaloïdiques de différentes plantes ont été injectés dans le dispositif afin de cribler les nouveaux candidats inhibiteurs de l'AChE. Parmi les extraits injectés, il y a des inhibiteurs d'AChE ont pu être découverts grâce à la présence des pics d'ACh. Pour compenser la dérive de la ligne de base chromatographique (m/z 146), due au gradient de phase organique (MeOH), une pompe de contre-gradient a été ajoutée à la sortie de la colonne de CLHP. Les résultats montrent que cet ajout d'une pompe de contre-gradient améliore considérablement l'horizontalité de la ligne de base mais relève celle-ci à des valeurs trop importantes et réduit d'autant la sensibilité du dispositif par rapport à la méthode chromatographique réalisée sans contre-gradient.

Cette étude a permis la mise au point d'une méthode innovante en couplant la CLHP, un IMER et une détection par SM destinée au criblage des inhibiteurs de l'AChE. Grâce à cette méthode, l'activité des différents inhibiteurs peut être facilement évaluée en mesurant l'aire des pics d'ACh correspondant aux composés recherchés. 3 inhibiteurs connus de l'AChE ont été choisis pour valider cette méthode. Cette dernière a permis de mettre clairement en évidence une relation dose-effet croissante qui lie des pics des inhibiteurs de l'ACh en fonction de leurs quantités injectées. Cette méthode CLHP-IMER-SM a été appliquée au criblage des inhibiteurs de l'AChE dans des extraits de plante. Grâce à cette méthode, un nouvel inhibiteur de l'AChE a été découvert dans l'extrait de *Lycoris Radiata*.

Résumé en anglais

The project focuses on the development of a chromatographic system coupling high-performance liquid chromatography (HPLC), immobilized enzyme reactor (IMER) and mass spectrometry (MS) detection to detect acetylcholinesterase (AChE) inhibitors and compare their respective inhibitory activities. Using this device, the AChE inhibitors can be separated on-line and their inhibitory activities can be compared directly by the simple measurement of the chromatographic peaks of the residual acetylcholine (ACh) on MS whose hydrolysis was inhibited by the desired compounds. 3 widely known standards of AChE inhibitors (Galanthamine-GL, Huperzine A-HuA and Tacrine-TA), were selected to develop the analytical conditions of this coupling. After having validated this method with the 3 AChE inhibiting standards, the alkaloid extracts of different plants were injected into the device in order to screen the new AChE inhibitor candidates. Among the injected extracts, some AChE inhibitors could be discovered thanks to the presence of ACh peaks. To compensate for the drift of the chromatographic baseline (m/z 146), due to the organic phase gradient (MeOH), a counter-gradient pump was added to the outlet of the HPLC column. The results show that this addition of a counter-gradient pump considerably improves the horizontality of the baseline but raises it to high values and reduces correspondingly the sensitivity of the device compared to the chromatographic method performed without counter-gradient.

This study led to the development of an innovative method by coupling HPLC, IMER and MS detection for AChE inhibitor screening. Thanks to this method, the activity of the various inhibitors can be easily evaluated by measuring the area of the ACh peaks corresponding to the desired compounds. 3 known AChE inhibitors were chosen to validate this method and have clearly demonstrated a growing dose-response relationship that binds peaks of ACh according to the injected AChE inhibitor amounts. This method CLHP-IMER-SM was applied to screening for AChE inhibitors in plant extracts. Thanks to this method, a new AChE inhibitor has possibly been discovered in the *Lycoris Radiata* extract.